

УДК 577.21

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ микроРНК В ГИПОТАЛАМУСЕ ОВЕЦ КАЗАХСКОЙ ПОРОДЫ, ПОМЕЩЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫЕ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

© 2021 Н. Yang^{1,2**}, L. Fu^{3#}, Q. Luo^{1#}, L. Li¹, F. Zheng¹,
X. Liu⁴, Z. Zhao⁴, Z. Wang¹, and H. Xu^{1*}

¹ College of Veterinary Medicine, Southwest University, 404100 Chongqing, China;
e-mail: yh20183007@swu.edu.cn, 280111842@qq.com

² Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, 404100 Chongqing, China

³ Research Institute of Herbivorous Livestock, Chongqing Academy of Animal Sciences, 404100 Chongqing, China

⁴ College of Animal Science and Technology, Shihezi University, 830000 Xinjiang, China

Поступила в редакцию 25.02.2021

После доработки 06.06.2021

Принята к публикации 21.07.2021

МикроРНК играют важную роль во многих биологических регуляторных процессах, принимая участие в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Тем не менее информация относительно микроРНК, ассоциированных с метаболическими путями, связанными с фотопериодизмом, который определяет сезонную активность животных, весьма ограничена. Для изучения влияния различных фотопериодических условий на экспрессию микроРНК мы разделили овец казахской породы на две группы. В одну группу вошли животные, помещенные в условия длинного фотопериода (LP – long photoperiod; 16L : 8D, 16 ч на свету и 8 ч в темноте). Другую группу составили овцы, находящиеся в условиях короткого фотопериода (SP – short photoperiod; 8L : 16D, 8 ч на свету и 16 ч в темноте), при этом животные также получали дополнительный корм. Далее в этих двух группах мы определили микроРНК и их гены-мишени, имеющие отношение к фотопериодизму. Всего нами было идентифицировано 15 дифференциально экспрессируемых микроРНК, ассоциированных с 310 регуляторными путями, охватывающими фотопериодизм, гормоны репродуктивной системы и питание. Пара miR-136–GNAQ была выбрана для исследования и валидирована как дифференциально экспрессируемая: методом двойной люциферазной детекции было показано, что между miR-136 и GNAQ существует отрицательная обратная связь. При исследовании профиля экспрессии было показано, что экспрессия GNAQ снижена у самок в состоянии эструса как в условиях LP, так и в условиях SP, в то время как повышенная экспрессия GNAQ наблюдалась в условиях LP у самок в период анэструса. Кроме того, при проведении функционального анализа было обнаружено, что в клетках гипоталамуса экспрессия KISS1 и GnRH повышается, а DIO2 и TSHB – снижается, в то время как экспрессия GNAQ оказывается сниженной. Таким образом, пара miR-136–GNAQ может действовать как переключатель в регуляции сезонного эструса (течки) при различных фотопериодических условиях. Полученные результаты дают новую информацию о связи между микроРНК и сезонной регуляцией репродуктивной активности. Кроме того, наша работа позволяет по-новому взглянуть на микроРНК-опосредованные регуляторные механизмы с целью преодоления фотоингибирования у сезонно размножающихся млекопитающих, таких как овцы казахской породы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микроРНК, гипоталамус, ген-мишень, нейроэндокринная регуляция, обратная связь.

DOI: 10.31857/S0320972521100122

ВВЕДЕНИЕ

Среди млекопитающих большинство племенных животных сохранили физиологические характеристики репродуктивной сезонности. На картину сезонного размножения в норме влияют различные факторы окружающей среды, такие как фотопериод и питание. Фотопери-

од рассматривается как главный фактор, определяющий начало полового сезона у племенных животных в умеренных широтах с сезонным циклом размножения [1–3]. В частности, типичные сезонные вариации характерны для овец казахской породы, разводимых в Китае. В соответствии с фотопериодической синхронизацией половой активности казахские овцы классифицируются как животные короткого дня: именно короткие дни стимулируют, в то время как длинные – тормозят половую актив-

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ность у представителей этой породы. Следовательно, сезон половой активности у этих овец приходится на короткий фотопериод (с июля по январь), и для него характерна определенная последовательность эстральных сигналов. И наоборот, овцы казахской породы вступают в межэстральный период, когда короткие дни сменяются длинными (с февраля по июнь), что характеризуется прекращением половой жизни [4, 5]. Следовательно, репродуктивная способность овец в животноводстве ограничена из-за фотоингибирования.

Учитывая те ограничения, которые накладывает фотопериод на репродуктивные циклы племенных животных, большой интерес для многих исследователей представляют способы преодоления фотоингибирования, ограничивающего период размножения. В начале 1930-х гг. Marshall и его коллеги впервые описали факт изменения сезонной половой активности у овец в зависимости от фотопериода. Более того, выяснилось, что перевозка овец в южное полушарие приводит к смене сезонности периодов размножения на противоположные [6]. С того момента многие исследователи использовали искусственно создаваемую фотопериодичность для изучения фотопериодического контроля сезонного размножения [7–10]. Тем не менее с развитием и усложнением исследовательских подходов в ряде работ на основе полученных данных было высказано предположение, что только лишь с помощью изменения фотопериода трудно достичь полного контроля над сезонными колебаниями способности к размножению и растянуть эстральный период на весь год. Chemineau et al. [11] перевезли сезонно размножающихся овец в условия тропического фотопериода, однако, несмотря на амплитуду фотопериодических изменений, сезонные колебания их производительности не поменялись по сравнению с самками, содержащимися в условиях умеренного фотопериода. Перевезенные овцы продемонстрировали лишь увеличение продолжительности сезона размножения на один месяц и соответствующее сокращение периода анэструса. Ряд научных групп продолжал поиск способов оптимизации или замены вышеупомянутых схем контроля над периодичностью размножения. Так, Estrada-Cortés [12] и Zarazaga [13] с коллегами обнаружили, что сезонный характер репродуктивной активности овец можно модулировать типом кормления. Они показали, что при улучшении питания репродуктивная активность овец начинается раньше и заканчивается позже. Другими исследованиями было дополнительно подтверждено, что оптимальный уровень питательных веществ, получаемый жи-

вотными, может улучшить репродуктивную функцию племенных особей, в то время как недостаток или избыток пищи может существенно подавлять их размножение [14, 15]. Ранее нами было показано, что в период анэструса при повышении качества питания овцы могут снова вступить в репродуктивный цикл [16]. При этом стоит отметить, что соотношение эстральных и анэстральных овец все же было не очень высоким. Тем не менее при неизменных условиях фотопериода, характеризующегося в норме отсутствием размножения, адекватное улучшение питания привело к характерному выраженному эстральному поведению у ряда овец. Таким образом, в этой работе было продемонстрировано не только изменение сроков начала и окончания сезона размножения, но также были представлены свидетельства в пользу того, что предложенный способ может быть более эффективен в достижении круглогодичного воспроизводства у сезонно размножающихся пород. Было бы интересно исследовать, имеют ли овцы в состоянии естественно эструса (в условиях короткого фотопериода) и овцы с индуцированным эструсом в условиях длинного фотопериода и при адекватном питании сходные профили эндокринных гормонов и молекулярный механизм регуляции, в частности, при участии микроРНК и их генов-мишеней.

МикроРНК – это некодирующие эндогенные одноцепочечные небольшие молекулы РНК (sRNA, small RNA) с длиной ~ 22 нуклеотидных остатка (н.о.). Впервые они были описаны в 1993 г. и характеризованы как консервативный класс биологических регуляторов в начале 2000-х гг. [17, 18]. Накопленные данные позволяют предположить, что большое число различных микроРНК экспрессируется и накапливается в репродуктивной оси, включая гипоталамус [19]. Гипоталамус регулирует эндокринную активность млекопитающих и интегрирует сигналы, поступающие из мозга и периферической нервной системы, которые играют основную регуляторную роль в механизме периодичности размножения. Таким образом, для исследования возможного механизма регулирования фотопериодического ингибирования у племенных животных с сезонным воспроизводством с помощью микроРНК мы создали две библиотеки микроРНК гипоталамуса, полученные от животных, помещенных в условия длинного фотопериода (LP – long photoperiod) и короткого фотопериода (SP – short photoperiod) при дополнительном питании. Мы исследовали различия в паттернах экспрессии микроРНК из этих двух библиотек с целью поиска пар микроРНК–мРНК в гипоталамусе овец,

вовлеченных в фотопериодический путь, контролирующей реинициацию сезонного эстрального цикла в нейроэндокринной системе. Получение такой информации могло бы обеспечить глубокое понимание механизма молекулярной модуляции инициации и окончания эстрального периода у животных с сезонностью размножения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и воздействие фотопериода. Овцы казахской породы в Китае являются типичными представителями породы овец с сезонностью размножения, которая в условиях LP находится в продолжительном анаэстральном периоде. В настоящей работе 36 здоровых овец казахской породы со сходными показателями массы тела (отклонения в весе не превышали 5%) были отобраны из общего места кормления и пронумерованы; они получали дополнительное питание в количестве 0,3 кг/овцу со следующим составом: общий белок – 18,0%, сырая клетчатка – 11,0%, зола – 11,0%, общий жир – 2,0%, кальций – 0,8–1,5%, фосфор – 0,4%, а также люцерну в количестве 1,5 кг/овцу. Овцы содержались в сарае экспериментального центра Университета Шихэцзы (Китай) [16]. Все овцы имели неограниченный доступ к воде. На протяжении всего эксперимента средняя температура в помещении поддерживалась на уровне 15–18 °С. Для создания условий двух различных фотопериодов овцы были случайным образом разделены на две группы: контрольные овцы размещались в блоке сарая в условиях LP (16 ч на свету и 8 ч в темноте) на протяжении 12 недель, в то время как экспериментальные животные размещались в другом блоке того же сарая в условиях SP (8 ч на свету и 16 ч в темноте) на протяжении тех же 12 недель. Для обеспечения фиксированной продолжительности светового дня применяли комбинированное искусственное и естественное освещение. На протяжении всего эксперимента через случайные временные интервалы осуществляли мониторинг интенсивности света в период дополнительного освещения для обеих групп животных. По окончании эксперимента все животные были идентифицированы и гуманным образом умерщвлены путем инъекции пентобарбитала натрия. Сбор образцов был проведен обученным персоналом и сертифицированными ветеринарами в соответствии с протоколами по уходу за животными Первой больницы медицинского колледжа университета Шихэцзы (номер регистрации разрешения A2018-114-01).

Мониторинг эструса, определение уровня гормонов и сбор образцов ткани. У каждой овцы контролировали эструс дважды в день, вводя барана в загон. В другое время барана держали в соседних загонах, чтобы избежать его влияния на эстральное поведение овцы [15]. За первый день эстрального цикла принимали дату, когда овца впервые приняла «дразнящего» барана, наряду с появлением отека вульвы и обильным выделением слизи. Динамические изменения в фолликулах фиксировали путем определения содержания гормонов в сыворотке крови. С этой целью у животных производили забор крови из яремной вены, измерения проводили каждое утро. Образцы сыворотки крови собирали и хранили при –20 °С до определения содержания прогестерона (P₄) и эстрадиола (E₂). Уровни стероидов определяли с помощью наборов для проведения ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; «Blue Gene Biotech», Китай). Чувствительность метода составила 0,2 нг/мл для P₄ и 1,0 пкг/мл для E₂. Затем были отобраны три овцы, находящиеся в состоянии индуцированного эструса в условиях LP. Для выделения гипоталамуса они были умерщвлены гуманным образом. Полученную ткань использовали для конструирования библиотеки микроРНК, обозначенной как «HEN». Аналогично, три другие овцы в естественном эстральном состоянии при нахождении в условиях SP были гуманно умерщвлены для выделения гипоталамуса, который был далее использован для конструирования библиотеки микроРНК, обозначенной как «HEB». Еще три овцы в анаэстральном состоянии, находящиеся в условиях LP, были гуманно умерщвлены с целью выделения гипоталамуса и определения профиля тканевой экспрессии (сокращенное название библиотеки – «HNN»). Все образцы сразу замораживали в жидком азоте до проведения экстракции тотальной РНК.

Экстракция РНК, секвенирование микроРНК и биоинформатический анализ. Препараты тотальной РНК из гипоталамуса шести овец казахской породы в состоянии эструса (по три овцы, содержащиеся в условиях LP и SP) получали путем экстракции с использованием хлороформа, изопропанола и 70%-ного этанола. После определения целостности РНК (RIN – total RNA integrity numbers) и подтверждения качества препаратов, низкомолекулярные РНК разделяли с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis). Собирали молекулы РНК с длиной от 18 до 30 н.о. Продукты лигировали с использованием коммерческих адаптерных молекул к 3'- и 5'-концам при предпочтительной температуре и амплифицировали с помощью

ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction). Для получения достаточных количеств продуктов был использован метод ПЦР. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле и затем растворяли в этидиум бромиде (EB – ethidium bromide). Для характеристики эстрального состояния овец при различных условиях, LP и SP, были сконструированы две библиотеки. Для их анализа были использованы системы Agilent 2100 Bioanalyzer и ABI StepOnePlus RealTime PCR System, затем образцы были секвенированы на платформе Illumina HiSeq 2500 («Beijing Genomics Institute», Китай).

После очистки от адаптерных последовательностей и примесей чистые риды были проанализированы. Тэги были картированы на геном (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002742125.1) с помощью программы Bowtie, для анализа экспрессии и распределения было произведено выравнивание с помощью BLAST (basic local alignment search tool) с использованием баз данных GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и Rfam (<http://rfam.janelia.org/>) с целью скрининга и удаления повторов и тэгов, ассоциированных с рРНК, scРНК (малая цитоплазматическая РНК), snoРНК (малая ядрышковая РНК), snРНК (малая ядерная РНК) и тРНК. Затем оставшиеся риды были проанализированы с использованием базы данных Sanger miRBase (Ver. 21.0) для идентификации уже известных микроРНК. Предсказание новых микроРНК основывалось на малых РНК (sRNA), которые были картированы на участках антисмысловых экзонов, интронов или межгенных участков генома и не были картированы на какие-либо другие РНК. Затем для предсказания генов-мишеней были использованы программы TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) и RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/RNAhybrid/>). Базы данных GO (онтология генов, <http://www.geneontology.org/>) и KEGG были использованы для определения роли этих генов в биологических процессах и анализа ассоциированных с ними метаболических или сигнальных путей. Гены с коэффициентом ложного обнаружения (FDR – false discovery rate) $\leq 0,05$ рассматривались как вероятные кандидаты в гены-мишени.

Количественная ПЦР в реальном времени (qPCR – Real-time quantitative PCR). МикроРНК и мРНК были обратно транскрибированы в соответствующие кДНК с помощью наборов miRcute microRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit («TianGen», Китай) и PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser («Takara», Япония) соответ-

ственно. В качестве внутреннего эндогенного контроля была выбрана РНК U6. Все праймеры были сконструированы с помощью программы Primer-BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Полученные праймеры для микроРНК и U6 представлены в табл. S1 в Приложении. Относительные уровни экспрессии рассчитаны в виде $2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_{t_{target}} - C_{t_{control}}$). ПЦР в реальном времени проводили трижды для каждой реакции на приборе Mx 3000p real-time qPCR system («Applied Biosystems», США) с использованием набора SYBR Green Realtime PCR Mix («TianGen»).

Валидация на основе двойной люциферазной репортерной системы. Для амплификации 3'-нетранслируемых участков (3'-UTR, содержащие сайты связывания микроРНК) кандидатов в гены-мишени в гипоталамусе использовали пары праймеров с различными сайтами рестрикции (табл. S2, Приложение). Затем проводили рекомбинацию с вектором psiCHECK-2 Dual-Luciferase microRNA Target Expression Vector («TianGen») в соответствии с инструкциями производителя. После проведения проверки с помощью расщепления ферментами и секвенирования репортерные плазмиды psiCHECKTM-2 с люциферазой светлячка и последовательностями 3'-UTR кандидата в гены-мишени (GNAQ) дикого (WT) или мутантного (MU) типа были временно котрансфицированы в клетки HeLa вместе с пустым вектором [20], миметиком miR-136 или миметиком отрицательного контроля и репортерным геном люциферазы Renilla для нормализации («RiboBio», Китай). Экспериментальные образцы были поделены на шесть групп: чистый контроль (BC, без обработки), нормальный контроль (NVC, трансфицированные пустым вектором), WT (котрансфицированные миметиком miR-136 и GNAQ), WT+NC (котрансфицированные миметиком отрицательного контроля miR-136 и GNAQ), MU (котрансфицированные миметиком miR-136 и мутированным GNAQ) и MU+NC (котрансфицированные миметиком отрицательной miR-136 и мутированным GNAQ). После 48 ч культивирования клеток в образцах измеряли люциферазную активность с помощью набора Dual-Luciferase Reporter Assay System («Promega», США) на люцинометре Smart Line TL Tube Luminometer («Titertek Berthold», Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Каждый эксперимент по котрансфекции выполняли три раза.

Проверка взаимодействий в клетках-мишенях между генами-мишенями микроРНК и генами, ассоциированными с эстральным циклом. Для определения биологической функции GNAQ в клет-

ках гипоталамуса мы провели эксперименты по трансфекции микроРНК с использованием miR-136, в том числе с группой миметиков miR-136 и группой ВС в качестве отрицательного контроля. Эксперименты были выполнены на культуре нейронов гипоталамуса, полученных от эмбрионов овец [21]. После 48 ч культивирования получали экстракты тотальной РНК клеток гипоталамуса как описано выше. Изменения в генах, ассоциированных с фотопериодом и сезонным эстральным циклом, определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Все эксперименты проводили по три раза с тремя повторами для каждого образца. Последовательности праймеров для целевых и контрольных (β -актин) генов представлены в Табл. S3 Приложения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ степени эстральности и гормонального профиля в условиях LP и SP. На основании морфологических, поведенческих и эндокринных данных мы определили, что все овцы в группе SP демонстрировали нормальное эстральное поведение. При этом доля овец в состоянии эструса была выше в условиях LP (10/18) по сравнению с SP. Кроме того, профили гормонов были сходными в условиях LP и SP, не было обнаружено значительных различий в уровнях гормонов между группами с различными фотопериодами ($p > 0,05$). На основании данных по P_4 и E_2 (рис. 1) продолжительность эстрального цикла овец казахской породы характеризовалась длиной 18–20 дней. Овцы вступили в состояние эструса на 17-й день нашего тестового эстрального цикла. Уровни E_2 достигали пиковых значений ($E_2 > 800$ пкг/мл) на следующий день, в то время как концентрации P_4 находились на более низком уровне ($P_4 < 1,0$ нг/мл). Для определения первого дня эстрального цикла овцы все эксперименты были выполнены по три раза. Образцы, полученные в начале эстрального состояния, были использованы для секвенирования микроРНК.

Профили экспрессии микроРНК в гипоталамусе овец. Образцы РНК со значением целостности РНК в диапазоне от 7,0 до 9,3 были отобраны для конструирования вышеупомянутых библиотек (см. рис. S1 в Приложении). Распределение результатов секвенирования в библиотеке HEN в сравнении с НЕВ показано в табл. S4 в Приложении. При секвенировании библиотек и анализе полученных данных нами были идентифицированы 493 микроРНК, включая 145 известных и 348 предсказанных новых микроРНК. В соответ-

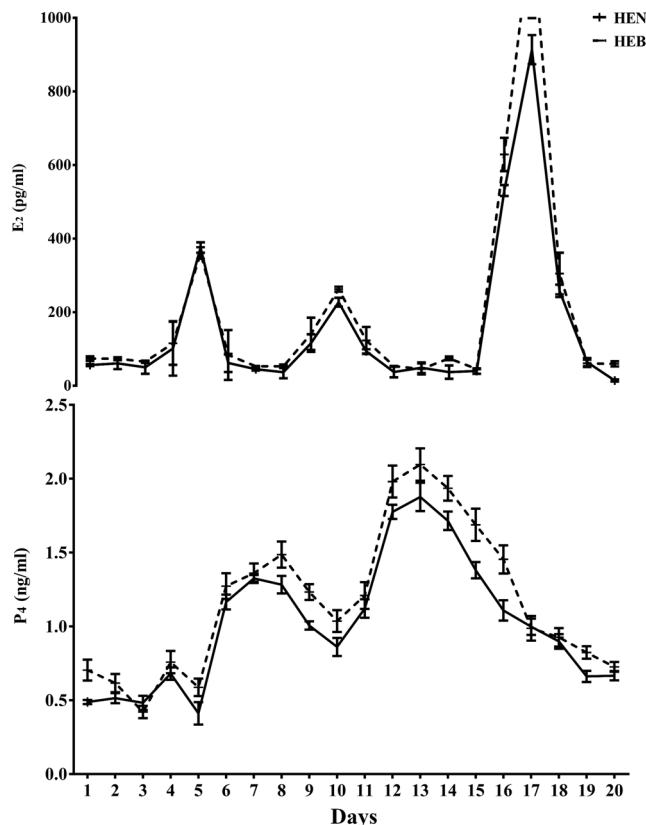


Рис. 1. Концентрации эстрогена (E_2) и прогестерона (P_4) в течение эстрального цикла овцы в условиях длинного фотопериода (LP) и короткого фотопериода (SP). Каждая точка представляет среднее значение концентрации гормона. Образцы крови отбирали каждое утро в течение эстрального цикла овцы. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM)

ствии с принятой системой установления семейства микроРНК (the miRbase family organization) эти микроРНК были классифицированы в 51 семейство. В двух библиотеках было проанализировано распределение длин различных типов РНК (рис. S2, Приложение) и точность определения нуклеотидов (рис. S3, Приложение). Для сравнения частот конкретной микроРНК в каждой группе (рис. 2, *a* и *b*) были получены соответствующие точечные диаграммы (scatter plots). В сравнении с профилями экспрессии микроРНК в библиотеке НЕВ, в библиотеке HEN было обнаружено значительное изменение уровня экспрессии 15 известных микроРНК (рис. 3), в частности, было отмечено значительное повышение уровня экспрессии одной микроРНК и снижение уровня экспрессии для 14 других микроРНК. Экспрессии трех микроРНК в библиотеке HEN (miR-148a, miR-29b и miR-136) значительно отличались от таковых в библиотеке НЕВ. Значительное повышение экспрессии было отмечено для miR-148a, сни-

жение экспрессии – для двух других микроРНК. Следует отметить, что результаты количественной ПЦР в реальном времени соответствовали результатам высокопроизводительного секвенирования (рис. 4), что указывает на достоверность результатов последнего.

Предсказание и анализ фотопериодических сигнальных путей. Были предсказаны гены-мишени для 15 дифференциально экспрессируемых в библиотеках HEN и HEВ микроРНК (4519 генов). Эти гены участвуют в 310 регуляторных путях, включая такие процессы, как фотопериодическая регуляция, мелатонин-опосредованные пути (такие как регуляция циркадного ритма, метаболизм тирозина и щелевые контакты), эстроген-зависимые сигнальные пути (сокращение гладких мышц сосудов, ретроградные эндоканнабиноидные сигнальные пути и ГАМКергический синапс), а также пищевая и эндокринная регуляция (контролируемая эндокринной системой и другими факторами реабсорбция кальция, прогестерон-опосредованное созревание ооцитов, метаболизм тирозина, глицина, серина и треонина). Все вышеупомянутые пути, в том числе пути, ассоциированные с фотопериодическим регулированием, питанием и эстральным циклом, показаны на рис. 5. Примечательно, что описано 5 путей, ассоци-

ированных с фотопериод-зависимой передачей сигнала. Это регулируемая эндокринной системой и другими факторами реабсорбция кальция (99 генов), щелевые контакты (gap junction) (45 генов), холинергический синапс (67 генов), сокращение гладких мышц сосудов (209 генов) и ретроградные эндоканнабиноидные сигнальные пути (62 гена) (рис. 6, *a* и *b*). В настоящей работе на пересечении групп этих генов-мишеней было обнаружено 12 генов (рис. 6, *a*). На основании результатов анализа с использованием GO и KEGG (KEGG enrichment) мы предположили, что ген *GNAQ* является ключевым узлом (hub), ассоциированным с фотопериодом и сезонным эстральным циклом через допаминергический синапс, циркадные ритмы, синтез тиреоидных гормонов, эстроген-зависимый сигнальный путь и GnRH-зависимый (гонадотропин-рилизинг-гормон) сигнальный путь. Соответственно данным о предсказании генов-мишеней, *GNAQ* является геном-мишенью для miR-136. Следует отметить, что также было показано, что некоторые зависимые от питательных веществ сигнальные пути задействованы в регуляции фотопериодических сигнальных путей, таких как метаболизм тирозина (рис. 6, *b*). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что пара miR-136–*GNAQ* играет ключевую роль в

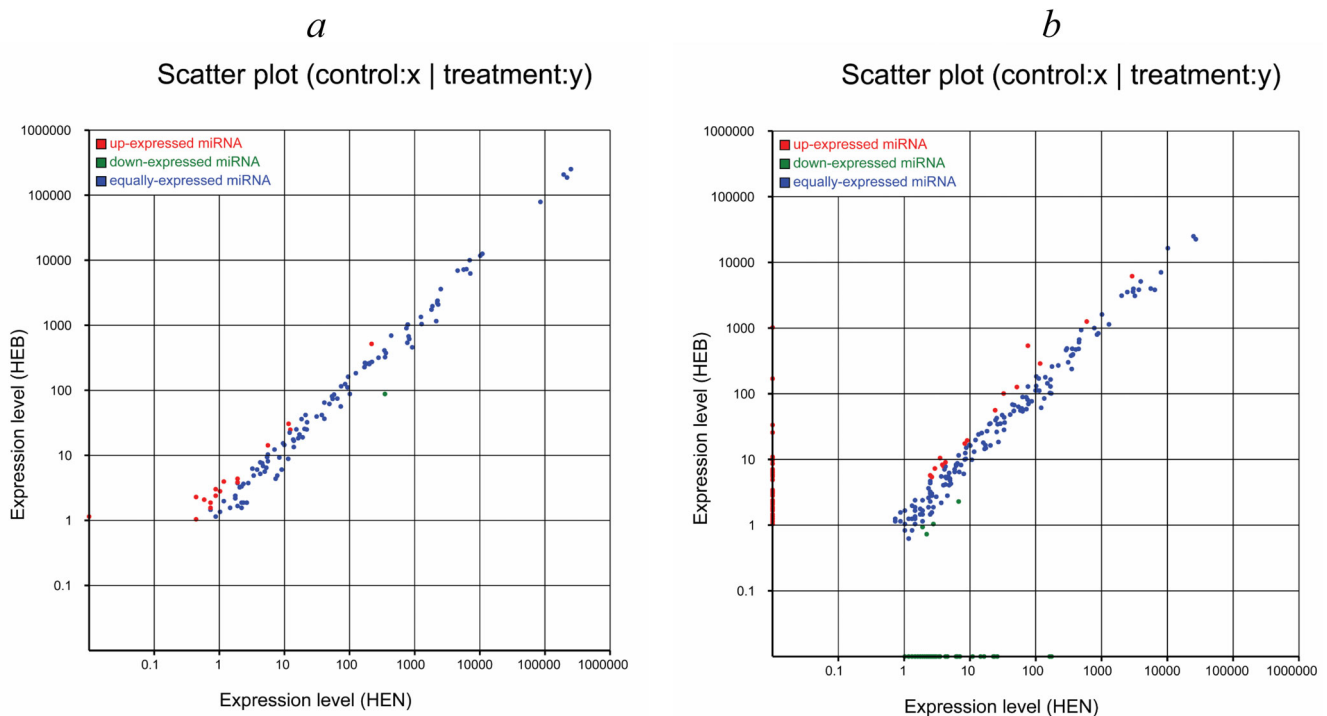


Рис. 2. Различные уровни экспрессии микроРНК между группами HEN и HEВ. *a* – Известные микроРНК; *b* – новые микроРНК. Ось X – уровни экспрессии микроРНК в группе HEN; ось Y – уровни экспрессии микроРНК в HEВ. Одна точка представляет одну микроРНК; точки красного цвета означают кратное изменение >2,2; синие точки >1/2; зеленые точки обозначают <1/2

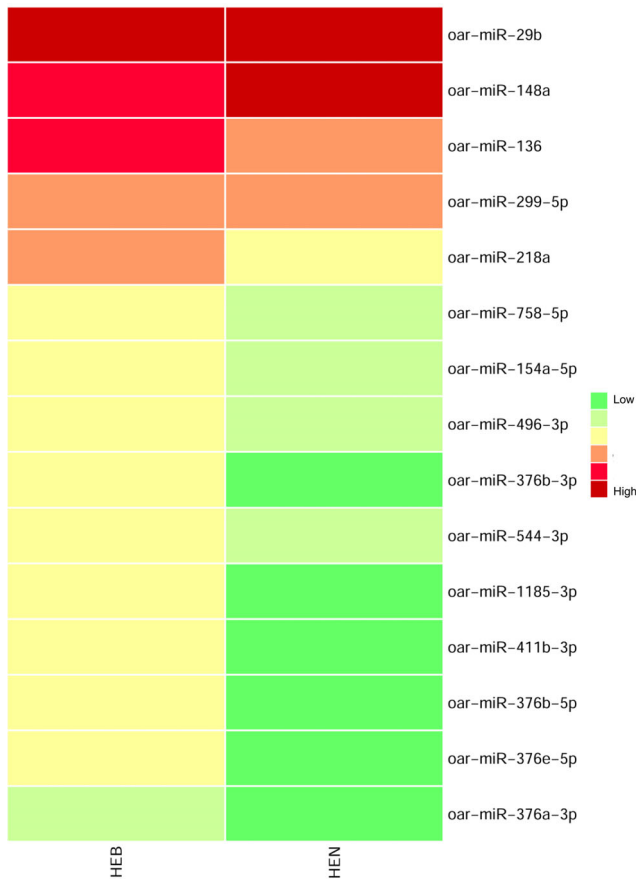


Рис. 3. Известные микроРНК с различной степенью экспрессии в образцах библиотек HEN и HEB

модуляции ингибирующего эффекта LP при улучшении питания.

Проверка регуляции с отрицательной обратной связью в паре микроРНК–мРНК. Нами были

изучены профили экспрессии miR-136 и GNAQ в гипоталамусе. Результаты ПЦР в реальном времени свидетельствуют о том, что экспрессия miR-136 в группе HEB в сравнении с HEN значительно снижена ($p < 0,01$). Напротив, экспрессия GNAQ была повышена на 283% ($p < 0,01$) в библиотеке HEN (рис. 7, a), что позволило предположить, что между miR-136 и GNAQ может существовать механизм регулирования с отрицательной обратной связью. Для анализа регуляторных связей между miR-136 и GNAQ рекомбинированные репортерные векторы с 3'-UTR гена GNAQ были котрансфицированы в клетки HeLa с миметиком miR-136. Активность люциферазы Renilla была значительно снижена в группе миметика miR-136 ($p < 0,01$) в сравнении с другими группами, подтверждая, что miR-136 и GNAQ представляют отрицательно регулируемую пару (рис. 7, b и c).

Функциональная верификация взаимодействий между генами-мишенями микроРНК и генами, ассоциированными с фотопериодическим эстральным циклом в целевых клетках. Мы стремились проанализировать показатели экспрессии GNAQ при различных схемах существования животных, включая эстральное и анэстральное состояние в условиях LP, а также эстральное состояние в условиях SP. Профили тканевой экспрессии показаны на рис. 8, a. Уровни экспрессии GNAQ были выше в ткани гипоталамуса при анэстральном состоянии (HNN), сниженные уровни экспрессии были зафиксированы в эстральном состоянии в условиях LP (HEN) и SP (HEB). Следовательно, уровни экспрессии GNAQ могут влиять на эструс при разных схемах воздействия на животных. Для дальнейшего подтверждения ингибирующего

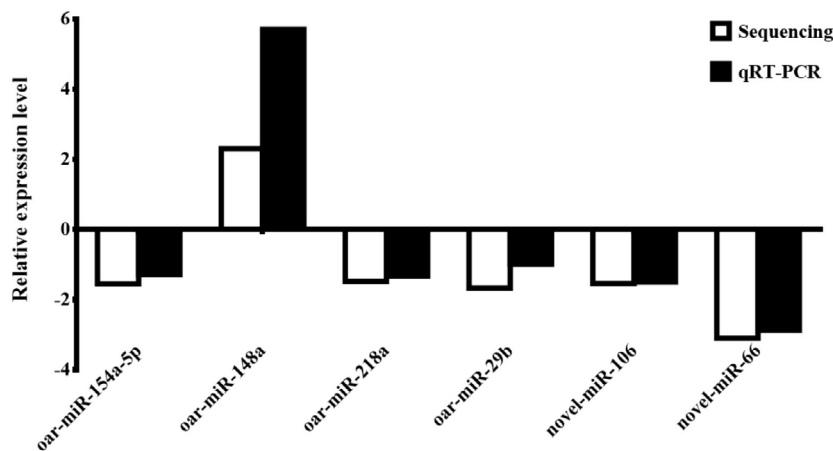


Рис. 4. Валидация результатов секвенирования по технологии Solexa образцов микроРНК из ткани гипоталамуса с использованием ПЦР в реальном времени. Предсказанные новые микроРНК были названы случайным образом с префиксом «novel». Изменения уровня экспрессии представляют изменения в библиотеке HEB в сравнении с HEN

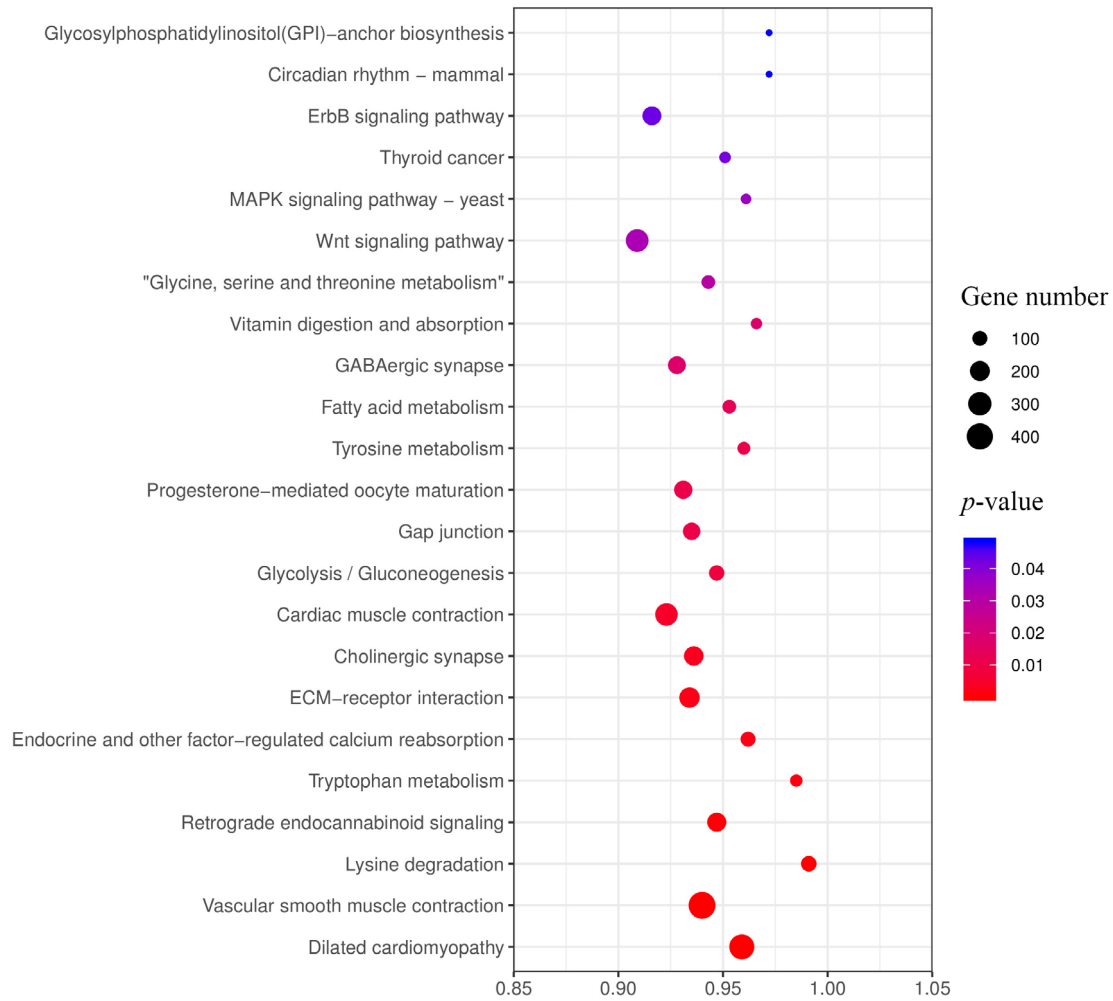


Рис. 5. Кластеризованная тепловая карта базы данных KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Показаны пути, обнаруживаемые в различных фотопериодических условиях при дополнительном питании. Интенсивность окраски характеризует оценку представленности для каждого пути KEGG

эффекта miR-136 в отношении GNAQ и изучения потенциальных регуляторных взаимодействий между фотопериодом и сезонным эстральным циклом были отобраны некоторые ключевые гены из классического сезонного репродуктивного пути и проанализирована их экспрессия в культуре клеток гипоталамуса. Экспрессия GNAQ была понижена в группе, трансфицированной миметиком miR-136 по сравнению с экспрессией этого гена в группе отрицательного контроля (miR-136-NC). Кроме того, было отмечено изменение уровня экспрессии генов, ассоциированных с эстральным циклом. Так, была повышена экспрессия генов KISS1 и GnRH ($p < 0,05$), а экспрессия генов DIO2 и TSHB была заметно понижена ($p < 0,05$) (рис. 8, b). Эти результаты свидетельствуют о том, что пара miR-136–GNAQ может играть важную роль в изменении эффекта фотопериодического ингибирования у племенных животных с сезонным циклом воспроизводства.

дического ингибирования у племенных животных с сезонным циклом воспроизводства.

ОБСУЖДЕНИЕ

В природных условиях фотопериод является важным фактором, который модулирует репродуктивную способность, в частности у мелких жвачных животных, и оказывает влияние на эстральный цикл и эффективность размножения. Тем не менее фотопериод также стал одним из основных лимитирующих факторов, предотвращающим круглогодичное размножение большинства млекопитающих. Овцы казахской породы хорошо известны в северном Китае как типичная порода с сезонным циклом воспроизводства. В предыдущей работе мы обнаружили, что улучшение питания может влиять на инги-

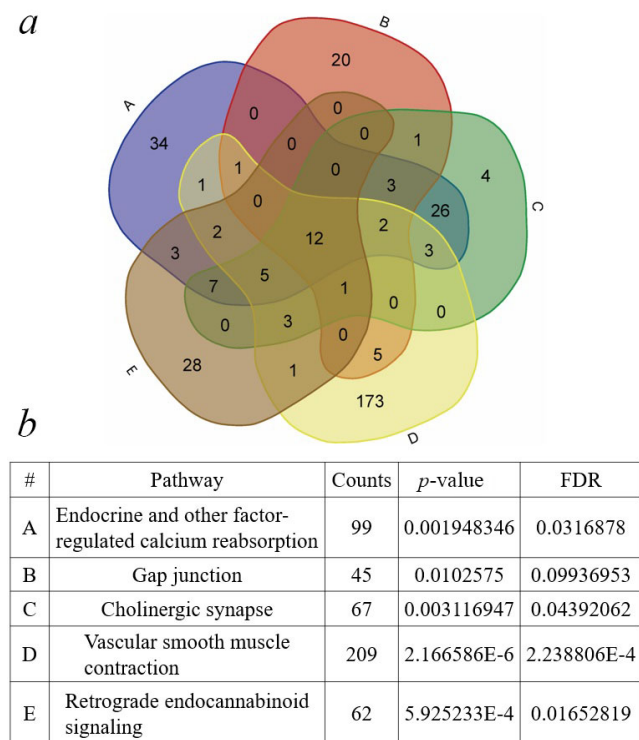


Рис. 6. Пять сигнальных путей, тесным образом ассоциированные с фотопериодом, питанием и эстральным циклом при дополнительном питании. Были посчитаны перекрывающиеся гены-мишени, относящиеся к этим сигнальным путям (a), и показано количество генов-мишеней в каждом пути (b)

бирующий эффект LP на эстральное поведение овец, приводя к удлинению продолжительности сезона размножения и соответствующему укорочению периода анэструса. Таким образом, улучшение питания подталкивает овец к инициации нового эстрального цикла вне сезона размножения [16, 22]. Примечательно, что мы не обнаружили никаких различий в поведении при естественном и индуцированном эструсе при различных фотопериодических условиях; в то же время наличие различий в молекулярном механизме регуляции инициации эструса оставалось под вопросом. Следовательно, для анализа механизма, лежащего в основе инициации эструса у этих овец, были необходимы дополнительные исследования. Настоящая работа способствует пониманию деталей молекулярного механизма инициации и окончания эструса у племенных животных.

В настоящей работе, основанной на моделировании условий сезонного фотопериода, нами были созданы две библиотеки микроРНК из гипоталамуса животных, помещенных в условия LP и SP при повышенном уровне питания (библиотеки HEN и HEV соответственно). С помощью анализа паттернов экспрессии мик-

роРНК мы идентифицировали 15 дифференциально экспрессируемых в библиотеках HEN и HEV известных микроРНК. Из них следует отметить три наиболее важные высоко экспрессируемые микроРНК, а именно miR-148a, miR-29b и miR-136. Ранее в ряде работ было показано, что miR-136 может ингибировать экспрессию рецептора лютеинизирующего гормона (LHR – luteinizing hormone receptor) в яичниках [23, 24]. LHR способен модулировать экспрессию генов биологических часов, ассоциированных с сезонным эстральным циклом [25–27], что позволяет предположить, что miR-136 играет важную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-овариальной оси (HPO axis). Анализ с использованием баз данных GO и KEGG показал существование важного хаба, гена *GNAQ*, опосредующего взаимосвязь между фотопериодом и ассоциированными с эструсом сигнальными путями, задействованными во многих биологических системах, таких как циркадные ритмы, допаминергический синапс, синтез тиреоидных гормонов, GnRH-опосредованный сигнальный путь, эстроген-опосредованный сигнальный путь, а также регулируемый эндокринной системой и другими факторами процесс реабсорбции кальция и сокращение гладких мышц сосудов (рис. 5). В настоящей работе с использованием программ TargetScan и RNAhybrid мы показали, что miR-136, предположительно, имеет возможность целенаправленно воздействовать на *GNAQ*. Кроме того, основываясь на полученных результатах, мы выбрали пару miR-136–*GNAQ* для проведения целевой проверки их связи путем трансфекции клеток HeLa миметиком miR-136 и отрицательным контролем. Полученные результаты подтвердили существование отрицательной обратной связи между miR-136 и *GNAQ*, что соответствовало профилям их тканевой экспрессии в тех же образцах. Поэтому мы пришли к выводу, что таргетирование *GNAQ* с помощью miR-136 может быть связано с фотопериодическим ингибированием, играя роль триггера для прекращения сезонного эстрального цикла в условиях LP.

В настоящее время описано два основных сигнальных пути, которые, предположительно, связаны с фотопериодизмом и эструс-ассоциированными сигнальными путями, а именно KISS1/GPR54 и TSH-DIO2/DIO3 [22, 28–32]. Для дальнейшего исследования биологической функции miR-136 в таргетировании *GNAQ* в регуляторных путях, ассоциированных с фотопериодом и сезонным эстральным циклом, нами были отобраны ключевые гены (*KISS1*, *GPR54*, *DIO2*, *DIO3*, *TSHB* и *GnRH*) для проведения ана-

лиза их функций в клетках гипоталамуса овцы. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что экспрессия *KISS1* и *GnRH* значительно повышается в клетках гипоталамуса овец при *miR-136*-инициированном снижении экспрессии *GNAQ*. Напротив, экспрессия *TSHB* и *DIO2* была существенно понижена, что позволяет предположить, что путь *KISS1/GPR54* активируется тогда, когда имеет место снижение экспрессии *GNAQ*, в то время как инициация пути *TSH-DIO2/DIO3* происходит при повышении экспрессии *GNAQ* в гипоталамусе. Более

того, в ряде работ показано, что путь *KISS1/GPR54* может участвовать в активации оси *HPO* в условиях *SP* или сезона размножения [33, 34]. Сходные результаты также получены при определении профиля экспрессии *GNAQ* в ткани гипоталамуса. Такой результат может объясняться большим содержанием *ERα* в нейронах *KISS1*, но не в нейронах *GnRH* [35–38], что приводит к появлению отрицательной обратной связи с эстрогеном. Описанные выше эффекты играют важную роль в опосредовании выброса *GnRH* и инициации нормального цикла раз-

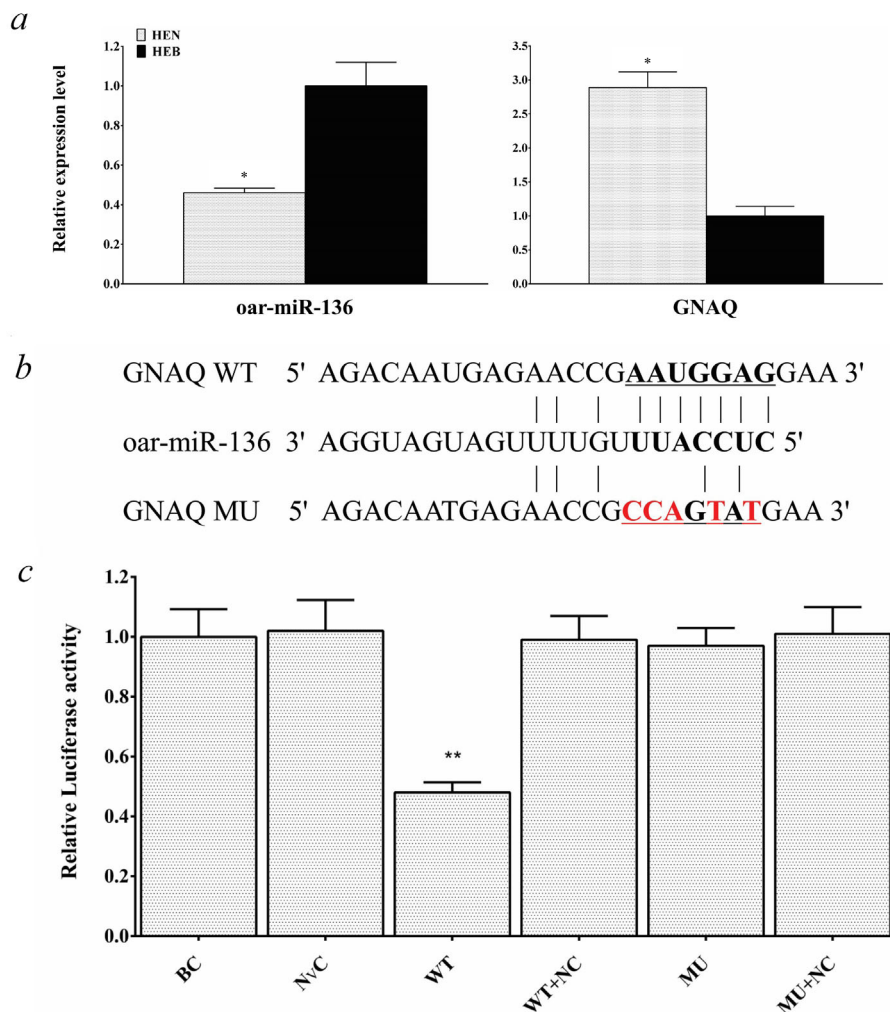


Рис. 7. *a* – Относительные уровни экспрессии *oar-miR-136* и её мишени *GNAQ* в гипоталамусе (сравнение HEN и HEB). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (SEM). * $p < 0,05$, статистически достоверные различия. *b* – Схематическое изображение целевой последовательности *oar-miR-136* в 5'-UTR гена *GNAQ*. Пять нуклеотидов (комплементарных нуклеотидам 1, 3, 5, 6 и 7 *oar-miR-136*) были модифицированы в 3'-UTR гена *GNAQ*. *c* – Активность гена люциферазы, связанного с 3'-UTR гена *GNAQ*. Плазмиды *psiCHECKTM-2* с репортерной люциферазой светлячка и с 3'-UTR дикого типа (WT) или мутированными 3'-UTR (MU) гена *GNAQ* были трансфицированы в клетки Hela вместе с пустым вектором, миметиком *oar-miR-136* или миметиком отрицательного контроля и геном-репортером люциферазы *Renilla* (для нормализации данных). Активность люциферазы измеряли через 48 ч. За 100% брали средние значения результатов по клеткам, трансфицированным контрольным вектором *psiCHECKTM-2*. Полученные данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD) ($n = 3$). ** $p < 0,01$, статистически достоверные различия

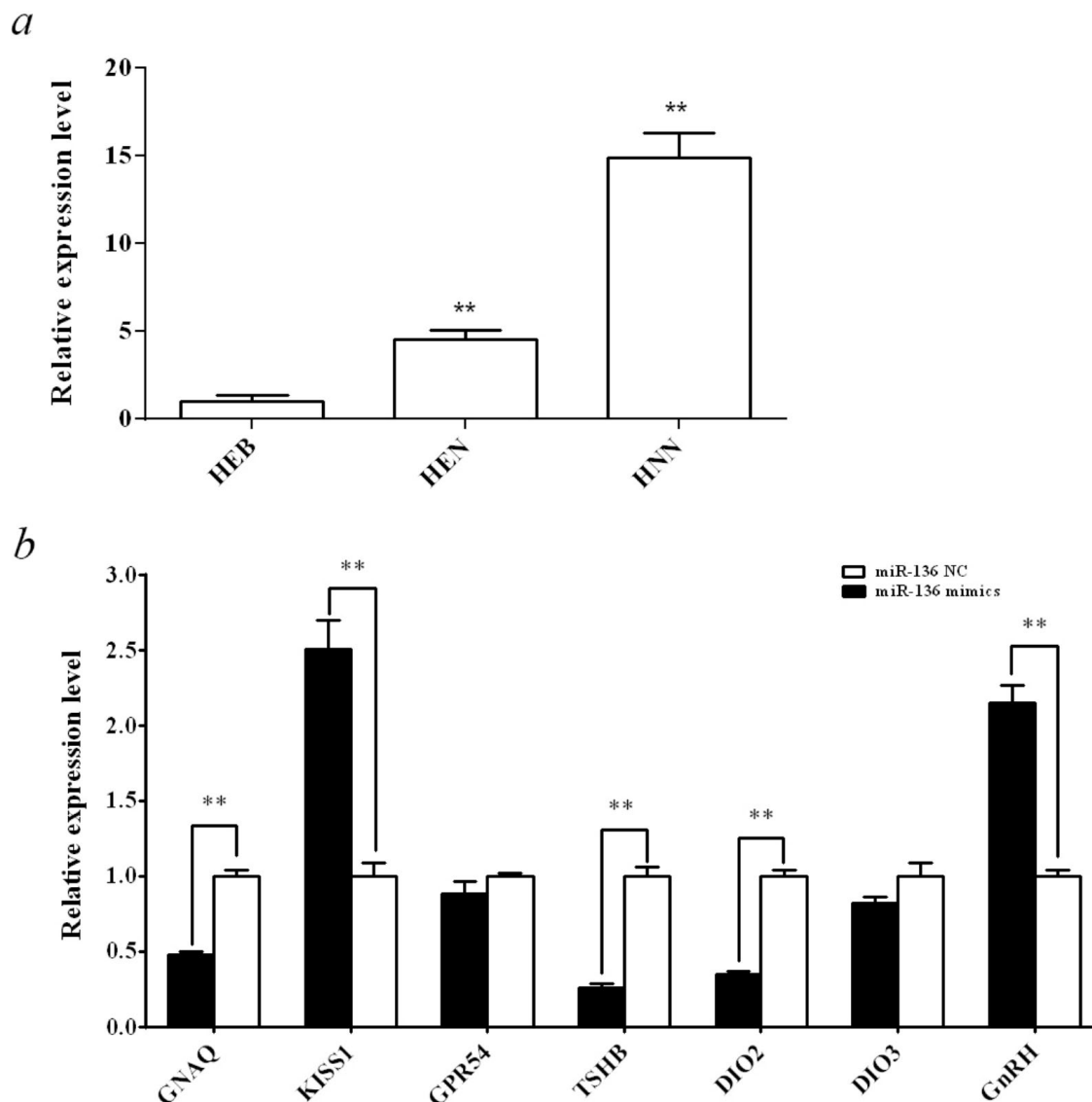


Рис. 8. *a* – Уровни экспрессии *GNAQ* у отдельных особей при различных схемах. *b* – Относительная экспрессия *GNAQ* и родственного ему гена в нервных клетках гипоталамуса овец от трансфицированных различным образом групп. Все эксперименты проводились независимо и как минимум три раза. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM. ** $p < 0,01$, статистически достоверные различия

множения, чей эффект, вероятно, передается в мозг через нейроны *KISS1*, а не через нейроны *GnRH* в гипоталамусе [39–41]. Напротив, в ряде других работ показано, что путь *TSH-DIO2/DIO3* скорее блокирует активность оси *HPG*, что обычно происходит в условиях *LP* или вне сезона размножения [42, 43]. Эти результаты соответствуют профилю тканевой экспрессии, определенному в настоящей работе. Такая картина может быть обусловлена повышенной экспрессией *DIO2*, который в гипоталамусе может превращать *T4* в *T3* для прекращения репродуктивной активности [4, 44, 45]. Следовательно, наши результаты свидетельствуют о том,

что в условиях обычного или недостаточного питания и длинного светового дня происходит усиление действия *miR-136* на *GNAQ*. С учетом того, что *GNAQ* преимущественно действует на путь *TSH-DIO2/DIO3*, можно предположить, что в таком случае путь *TSH-DIO2/DIO3* не может инициировать нормальный эстральный цикл и в конечном итоге особь остается в анэстральном состоянии в условиях *LP*. Напротив, при улучшенном питании в условиях *LP* экспрессия *GNAQ* понижается, что приводит к его сопряжению с путем *KISS1/GPR54* и активации эстрального цикла в условиях фотопериодического ингибирования.

В целом, с использованием биоинформатических методов анализа нами были идентифицировано 15 дифференциально экспрессируемых известных микроРНК в библиотеках HEN и HEV. Кроме того, мы установили, что пара miR-136–GNAQ может потенциально являться ключевым игроком в молекулярном механизме, с помощью которого модулируются начало эструса и её окончание у племенных животных с сезонным циклом. Эти результаты важны для лучшего понимания взаимосвязей между сезонно размножающимися сельскохозяйственными животными и их окружением. Они могут быть использованы в качестве комплексной технической поддержки для достижения круглогодичного воспроизводства у светочувствительных сезонно размножающихся млекопитающих.

Благодарности. Авторы выражают благодарность коллегам из лаборатории за предоставление экспертных мнений и рекомендаций, необ-

ходимых для проведения данного исследования.

Финансирование. Настоящая работа получила финансирование от Национального фонда естественных наук КНР (31802065), исследовательского проекта Фонда финансирования докторских стартапов проекта CQ Юго-западного Университета (SWU119013), поддерживаемого Фондом естественных наук (csc2020jcsj-msxmX0427).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные положения по уходу и использованию животных.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 10, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldman, B. D. (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement, *J. Biol. Rhythm.*, **16**, 283-301.
- Forcada, F., and Abecia, J. A. (2006) The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes, *Reprod. Nutr. Dev.*, **46**, 355-365.
- Greives, T. J., Mason, A. O., Scotti, M. A. L., Levine, J., Ketterson, E. D., et al. (2007) Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction, *Endocrinology*, **148**, 1158-1166.
- Shinomiya, A., Shimmura, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., and Yoshimura, T. (2014) Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone, *Front. Endocrinol.*, **5**, 12.
- Wodzicka-Tomaszewska, M., Hutchinson, J. C. D., and Bennett, J. W. (1967) Control of the annual rhythm of breeding in ewes: effect of an equatorial daylength with reversed thermal seasons, *J. Agr. Sci.*, **68**, 61-67.
- Marshall, F. H. A. (1937) On change over in oestrous cycle in animals after transference across equator, with further observations on incidence of breeding season and factors controlling sexual periodicity, *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B*, **122**, 413-428.
- Legan, S. J., and Karsch, F. J. (1983) Importance of retinal photoreceptors to the photoperiodic control of seasonal breeding in the ewe, *Biol. Reprod.*, **29**, 316-325.
- Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J. P., Thimonier, J., and Volland-Nail, P. (1988) Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod, *Aust. J. Biol. Sci.*, **41**, 69-86.
- Lincoln, G. A., and Clarke, I. J. (1994) Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams; evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland, *J. Neuroendocrinol.*, **6**, 251-260.
- Abecia, J. A., Chemineau, P., Flores, J. A., Keller, M., Duarte, G., et al. (2015) Continuous exposure to sexually active rams extends estrous activity in ewes in spring, *Theriogenology*, **84**, 1549-1555.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., and Delgado, J. A. (1992) Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod, *Small Ruminant Res.*, **8**, 299-312.
- Estrada-Cortés, E., Vera-Avila, H. R., Urrutia-Morales, J., Villagómez-Amezcuca, E., Jiménez-Severiano, H., et al. (2009) Nutritional status influences reproductive seasonality in Creole goats: 1. Ovarian activity during seasonal reproductive transitions, *Anim. Reprod. Sci.*, **116**, 282-290.
- Zarazaga, L. A., Guzmán, J. L., Domínguez, C., Pérez, M. C., and Prieto, R. (2005) Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats, *Anim. Reprod. Sci.*, **87**, 253-267.
- Lazarin, G. B., Alves, N. G., Perez, J. R. O., Lima, R. R. D., Garcia, I. F. F., et al. (2012) Plasma urea nitrogen and progesterone concentrations and follicular dynamics in ewes fed proteins of different degradability, *Rev. Bras. Zootec.*, **41**, 1638-1647.
- Zarazaga, L. A., Gatica, M. C., Celi, I., Guzmán, J. L., and Malpoux, B. (2011) Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity during the non-breeding season in Mediterranean goat females, *Anim. Reprod. Sci.*, **125**, 81-87.
- Yang, H., Liu, X. X., Hu, G. D., Xie, Y. F., Lin, S., et al. (2018) Identification and analysis of microRNAs-mRNAs

- pairs associated with nutritional status in seasonal sheep, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **499**, 321-327.
17. Rosalind, C. L., Rhonda, L. F., and Ambrost, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, **75**, 843-854.
 18. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., and Pasquinelli, A. E. (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **403**, 901-906.
 19. Meister, B., Herzer, S., and Silaharoglu, A. (2013) MicroRNAs in the hypothalamus, *Neuroendocrinology*, **98**, 243-253.
 20. Cui, W., Zhang, Y., Hu, N., Shan, C., Zhang, S., et al. (2010) miRNA-520b and miR-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3' UTR of CD46, *Cancer Biol. Ther.*, **10**, 232-241.
 21. Yang, H., Lin, S., Lei, X., Yuan, C., Yu, Y., et al. (2018) Nutritional status affects the microRNA profile of the hypothalamus of female sheep, *Reprod. Fert. Dev.*, **30**, 946-957.
 22. Yang, H., Lin, S., Lei, X. P., Yuan, C., Tian, Z. W., et al. (2016) Identification and profiling of microRNAs from ovary of estrous Kazakh sheep induced by nutritional status in the anestrus season, *Anim. Reprod. Sci.*, **175**, 18-26.
 23. Kishi, H., Kitahara, Y., Imai, F., Nakao, K., and Suwa, H. (2018) Expression of the gonadotropin receptors during follicular development, *Reprod. Med. Biol.*, **17**, 11-19.
 24. Kitahara, Y., Nakamura, K., Kogure, K., and Minegishi, T. (2013) Role of microRNA-136-3p on the expression of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovaries, *Biol. Reprod.*, **89**, 114.
 25. Shimizu, T., Watanabe, K., Anayama, N., and Miyazaki, K. (2017) Effect of lipopolysaccharide on circadian clock genes *Per2* and *Bmal1* in mouse ovary, *J. Physiol. Sci.*, **67**, 623-628.
 26. Shimizu, T., Hirai, Y., Murayama, C., Miyamoto, A., Miyazaki, H., and Miyazaki, K. (2011) Circadian Clock genes *Per2* and clock regulate steroid production, cell proliferation, and luteinizing hormone receptor transcription in ovarian granulosa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 132-135.
 27. Li, L., Zhang, Z., Peng, J., Wang, Y., and Zhu, Q. (2014) Cooperation of luteinizing hormone signaling pathways in preovulatory avian follicles regulates circadian clock expression in granulosa cell, *Mol. Cell. Biochem.*, **394**, 31-41.
 28. Guh, Y. J., Tamai, T. K., and Yoshimura, T. (2019) The underlying mechanisms of vertebrate seasonal reproduction, *P. Jap. Acad. Ser. B*, **95**, 343-357.
 29. Huang, D. W., Wang, J. X., Liu, Q. Y., Chu, M. X., Di, R., et al. (2013) Analysis on DNA sequence of TSHB gene and its association with reproductive seasonality in goats, *Mol. Biol. Rep.*, **40**, 1893-1904.
 30. Pineda, R., Aguilar, E., Pinilla, L., and Tena, S. M. (2010) Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction, *Prog. Brain Res.*, **18**, 55-77.
 31. Kauffman, A. S., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (2007) Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction, *Trends Neurosci.*, **30**, 504-511.
 32. Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena, S. M. (2008) New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function, *Front. Neuroendocrinol.*, **29**, 48-69.
 33. Clarkson, J., de Tassigny, X. D. A., Moreno, A. S., Colledge, W. H., and Herbison, A. E. (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge, *J. Neurosci.*, **28**, 8691-8697.
 34. Krsmanovic, L. Z., Hu, L., Leung, P. K., Feng, H., and Catt, K. J. (2009) The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms, *Trends Endocrinol. Metab.*, **20**, 402-408.
 35. Smith, J. T., Clay, C. M., Caraty, A., and Clarke, I. J. (2007) KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season, *Endocrinology*, **48**, 1150-1157.
 36. Dubois, S. L., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., and Levine, J. E. (2016) Estradiol restrains prepubertal gonadotropin secretion in female mice via activation of ER α in kisspeptin neurons, *Endocrinology*, **157**, 1546-1554.
 37. Mayer, C., Acosta-Martinez, M., Dubois, S. L., Wolfe, A., Radovick, S., et al. (2010) Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor α -signaling in kisspeptin neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22693-22698.
 38. Wintermantel, T. M., Campbell, R. E., Porteous, R., Bock, D., Gröne, H. J., et al. (2006) Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility, *Neuron*, **52**, 271-280.
 39. Smith, J. T., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (2006) Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling, *Reproduction*, **131**, 623-630.
 40. Piet, R., Boehm, U., and Herbison, A. E. (2013) Estrous cycle plasticity in the hyperpolarization-activated current I_h is mediated by circulating 17 β -estradiol in preoptic area kisspeptin neurons, *J. Neurosci.*, **33**, 10828-10839.
 41. Mittelman-Smith, M. A., Wong, A. M., Kathiresan, A. S., and Micevych, P. E. (2015) Classical and membrane-initiated estrogen signaling in an *in vitro* model of anterior hypothalamic kisspeptin neurons, *Endocrinology*, **156**, 2162-2173.
 42. Bechtold, D. A., and Loudon, A. S. (2007) Hypothalamic thyroid hormones: mediators of seasonal physiology, *Endocrinology*, **148**, 3605-3607.
 43. Fraire-Cordero, S., Salazar-Ortiz, J., Cortez-Romero, C., Pérez-Hernández, P., Herrera-Corredor, C. A., and Gallegos-Sánchez, J. (2018) External stimuli help restore post-partum ovarian activity in Pelibuey sheep, *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **48**, 2.
 44. Beltramo, M., Dardente, H., Cayla, X., and Caraty, A. (2014) Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin, *Mol. Cell Endocrinol.*, **382**, 387-399.
 45. Dardente, H., Wood, S., Ebling, F., and Sáenz de Miera, C. (2019) An integrative view of mammalian seasonal neuroendocrinology, *J. Neuroendocrinol.*, **31**, e12729.

COMPARATIVE ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED microRNAs IN THE HYPOTHALAMUS OF KAZAKH SHEEP EXPOSED TO DIFFERENT PHOTOPERIOD CONDITIONS**H. Yang^{1,2**}, L. Fu^{3#}, Q. Luo^{1#}, L. Li¹, F. Zheng¹, X. Liu⁴, Z. Zhao⁴, Z. Wang¹, and H. Xu^{1*}**

¹ College of Veterinary Medicine, Southwest University, 404100 Chongqing, China;
e-mail: yh20183007@swu.edu.cn, 280111842@qq.com

² Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, 404100 Chongqing, China

³ Research Institute of Herbivorous Livestock, Chongqing Academy of Animal Sciences, 404100 Chongqing, China

⁴ College of Animal Science and Technology, Shihezi University, 830000 Xinjiang, China

MicroRNAs (miRNA) plays an important role in several mammalian biological regulatory processes by post-transcriptionally regulating gene expression. However, there is little information on the miRNAs involved in the photoperiodism pathway that controls seasonal activity. To enhance our knowledge on the effect of different photoperiod conditions on miRNA, we divided Kazakh sheep into two groups: one exposed to a long photoperiod (LP, 16L:8D) and another – to a short photoperiod (SP, 8L:16D) under supplemental feeding conditions. Further we compared the related miRNAs and target genes between the two groups. Fifteen differentially expressed miRNAs were identified, which were associated with 310 regulatory pathways covering photoperiodism, reproductive hormones, and nutrition. The miR-136-GNAQ pair was selected and validated as a differentially expressed, and a dual-luciferase reporter assay showed that the negative feedback loop existed between them. Examination of the expression profile revealed that the GNAQ expression was low in the estrous females both under LP and SP conditions, but high expression of GNAQ was observed in the anestrus females under LP conditions. Moreover, functional analysis revealed that KISS1 and GnRH expression was upregulated when GNAQ expression was downregulated in the hypothalamic cells, whereas DIO2 and TSHB expression was downregulated. Thus, miR-136-GNAQ might act as a switch in the regulation of seasonal estrus under different photoperiod conditions. These findings further enrich our understanding of the relationship between miRNAs and seasonal regulation of reproductive activity. Furthermore, our study provides novel insights into the miRNA-mediated regulatory mechanisms for overcoming photoinhibition in the seasonally breeding mammals, such as Kazakh sheep.

Keywords: miRNA, hypothalamus, target gene, nerve-endocrine regulation, feedback loop