

## **Titulli, Rezumeja, Fjalët kyçe shqip**

### **Ekspresioni i mikroARNve gjatë fazave të ndryshme të zhvillimit dhe funksionimit të trupit të verdhë (corpus luteum) te gjedhi**

Kandidatja: MSc. Rreze M. Gecaj, Fakulteti i Bujqësisë dhe Veterinarisë, UP

Mentori: Prof. dr. habil. Bajram Berisha, Fakulteti i Bujqësisë dhe Veterinarisë, UP

#### **REZYME**

Rregullimi i ekspresionimit të gjeneve paraqet një proces kompleks dhe implikon disa nivele të kontrollit. MikroARNtë (miARNtë) janë fije të shkurtëra një-zinxhirore jokoduese të ARNsë që marrin pjesë në rregullimin post-tranسكريپtiv të ekspresionimit të gjeneve. Deri tani është vërtetuar se miARNtë kontrollojnë ekspresionimin post-tranسكريپtiv të gjeneve në një varg procesesh qelizore si rritjen, zhvillimin dhe diferencimin, proliferimin dhe vdekjen qelizore. Është dokumentuar gjithashtu se ekspresionimi i miARNve është specifik për kohën, llojin qelizor dhe indet shtazore. Mes tjerash, te gjitarët miARNtë janë të implikuara edhe në kontrollin e ekspresionimit të disa veçorive riprodhuese. Megjithatë, rreth ekspresionimit dhe rolit të miARNve në trupin e verdhë (CL) te gjedhi deri më sot ka pak njohuri.

Për të sqaruar dinamikën e ekspresionimit të miARNve në CL te gjedhi, ne kemi sekuecuar tranسكريپtomën e miARNve dhe kemi analizuar ekspresionimin e tyre përgjatë ciklit estral dhe barrshmërisë.

Duke aplikuar sekuecimin e gjeneratës së ardhëshme (NGS), ekspresionimi i miARNve është profilizuar në CL nga këto ditë të ciklit respektivisht muaj të barrshmërisë: d 1-2, d 3-4, d 5-7 (eCL; CL i herëshëm); d 8-12 (mCL; CL i maturuar); d 13-16 (ICL; CL i vonë) dhe d >18 (rCL; CL i regresuar); si dhe muaji 1-2 (P1; barrshmëri e herëshme) dhe muaji 8-9 (P9; barrshmëri e vonë).

Rezultatet e kuantifikimit të ekspresionimit të miARNve nxorrën 42 miARN me ekspresionim diferencial signifikant (EDS) të vazhdueshëm në krahasimin e fazës eCL me fazat tjera të ciklit (mCL, ICL dhe rCL). Nga këto miARN, bta-miR-210-3p, -2898, -96, -7-5p, -183-5p, -182 dhe -202 ishin të mbishprehura me ndryshim prej  $\geq 2.0$  ( $P_{adj} < 0.01$ ) në fazën eCL krahasuar me fazat tjera të ciklit. Ndërsa vetëm bta-miR-146a ishte e nënshprehur në fazën eCL krahasuar me fazat tjera të ciklit. Në krahasimet e fazës eCL me fazat mCL, ICL dhe rCL janë identifikuar 24, 11 respektivisht 21 miARN të veçantë me EDS.

Pavarësisht fazës së ciklit, dy miARN (bta-miR-21-5p dhe bta-miR-143) u identifikuan si miARNtë me numrin më të lartë të leximeve. Këto dy miARN kanë trend të kundërt të ekspresionimit, derisa bta-miR-21-5p arrin kulmin e numrit të leximeve në fazën eCL dhe tregon rënje signifikante në fazën mCL dhe ICL, bta-miR-143 arrin kulmin e numrit të leximeve në fazën rCL dhe tregon rënje signifikante në eCL. Për të konfirmuar ekspresionimin diferencial të këtyre miARNve, ato janë validuar edhe përmes RT-PCR. Për gjashtë miARN (bta-miR-210, -96, -182, -183, -146a, -202) validimi i rezultateve të sekuencimit ishte i suksesëshëm. Nga krahasimi i fazës rCL me fazat mCL dhe ICL, janë identifikuar 24 respektivisht 12 miARN me EDS. Gjashtë prej tyre: bta-miR-142-5p, -3604, -199a-3p, -199a-5p, -199b-5p dhe -30d-5p tregojnë EDS në të dy krahasimet. Nga ky grup bta-miR-30d-5p është e nënshprehur në fazën rCL krahasuar me fazat mCL dhe ICL, derisa pesë miARNtë tjera janë të mbishprehura në këtë krahasim.

Të gjitha miARNtë e identifikuar me EDS në të paktën një fazë të ciklit u klasifikuan përmes SOTA në tetë klaster të ndryshëm, bazuar në ngjashmërinë e profilit të ekspresionimit të tyre. Gjysma e klasterëve përbëhet nga miARN me ekspresionim të lartë gjatë fazës eCL, ndërsa gjysma tjetër përmbajnë miARN me ekspresionim të ulët gjatë fazës eCL. MiARNtë me EDS nga krahasimi i fazës eCL me fazat tjera të ciklit sipas përlllogaritjeve *in silico* janë të involvuara në rregullimin e ciklit qelizor, proliferimit si dhe vdekjes qelizore të programuar.

Në CL nga barrshmëria e herëshme (P1) numri i miARNve të identifikuar me EDS në krahasim me fazat mCL, ICL dhe rCL ishte 50. Nga krahasimi i grupit P1 me fazat mCL, ICL dhe rCL numri i miARNve të veçanta me EDS ishte 16, 7 respektivisht 44. Dy miARN, bta-miR-3141 dhe -2484, treguan EDS  $\geq 2.0$  në grupin P1 krahasuar me fazat mCL dhe rCL. Numri i miARNve me EDS në CL nga barrshmëria e vonë (P9)

ishte 86, nga të cilat 29 miARN janë të ekspresionuara në të tri krahasimet e grupit P9 ndaj fazave mCL, ICL dhe rCL. Numri më i madh i miARNve të veçanta me EDS është identifikuar në krahasimin e grupit P9 me fazën rCL. Prej këtyre miARNve, 14 miARN kanë nivel më të lartë dhe 13 më të ulët të ekspresionimit në grupin P9. Në mesin e miARNve me nivel më të ulët të ekspresionimit: bta-miR-92, -183, -382, -432 dhe -409a janë të nënshprehura me diferencë  $\geq 2.0$  në grupin P9 krahasuar me tri fazat tjera. Ky rrejt i miARNve të identifikuar në CL nga grupi P9, përfundimisht mund të jetë me interes për të kuptuar fiziologjinë e CL gjatë kësaj faze të barrshmërisë. Megjithatë, kompleksiteti i rregullimit të ekspresionimit të miARNve në CL te gjedhi gjatë fazave më të avancuara të barrshmërisë, mbetet kryesisht i panjohur.

Të dhënat tona të gjeneruara përmes sekuencimit të thellë të miARNve në CL nga barrshmeria e vonë janë ndër të parat në literaturë, derisa rezultatet tona nga profilizimi i miARNve gjatë cikli estral në përgjithësi sugjerojnë rrol të rëndësishëm të miARNve në funksionin e CL në vezoren e gjedhit. Në të njëjtën kohë këto të dhëna zgjerojnë njohuritë tona mbi ekspresionimin e miARNve në CL te gjedhi dhe mund të përdoren tutje për validim funksional ose identifikim të biomarkerëve që ndërlidhen me sistemin riprodhues shtazorë dhe më gjërë.

**Fjalët kyçe:** Gjedhi, Sekuencimi i gjeneratës së ardhëshme, Transkriptoma, mikroARNtë, Trupi i verdhë, Cikli estral, RT-PCR, SOTA, HLC.

## **Title, Résumé, Key words**

### **The expression of microRNAs during different stages of development and function in the bovine corpus luteum**

PhD candidate: MSc. Rreze M. Gecaj, Faculty of Agriculture and Veterinary

Mentor: Prof. dr. habil. Bajram Berisha, Faculty of Agriculture and Veterinary

## **RÉSUMÉ**

Regulation of gene expression is a complex process and involves different levels of control. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding single stranded RNA molecules that participate in gene expression regulation at the post-transcriptional level of control. It has been established that miRNAs control post-transcriptional expression of genes in a number of cellular processes such as growth, development and differentiation, proliferation and cell death. It has also been documented that miRNA expression is time, cell type and animal tissues specific. In mammals, among others, miRNAs are implicated in controlling the expression of plenty reproductive traits. However, regarding the expression and the role of miRNAs in the corpus luteum (CL) of cattle to date there is limited knowledge available.

To elucidate the dynamics of miRNAs expression in the CL of cattle, we have sequenced the miRNAs transcriptome and analysed their expression throughout the oestrous cycle and during the pregnancy.

Utilising next generation sequencing (NGS), the expression of miRNAs is profiled in CL from these cycle days respectively months of pregnancy: d 1-2, d 3-4, d 5-7 (eCL; early CL); d 8-12 (mCL; matured CL); d 13-16 (lCL; late CL) and d >18 (rCL; regressed CL); month 1-2 (P1; early pregnancy) and month 8-9 (P9; late pregnancy).

The quantification of miRNAs expression demonstrated a set of 42 miRNAs with continuous and significant differential expression (SDE) in the comparison of eCL phase to the other cycle phases (mCL, ICL and rCL). Out of these miRNAs, bta-miR-210-3p, -2898, -96, -7-5p, -183-5p, -182 and -202 were overexpressed in the eCL phase versus the other phases with a fold change  $\geq 2.0$  ( $P_{adj} < 0.01$ ). While only one miRNA, bta-miR-146a was down regulated in eCL phase compared to the other phases of the cycle. In the comparison of eCL phase to mCL, ICL and rCL phases, 24, 11, respectively 21 unique miRNAs with SDE were identified.

Regardless of the cycle phase, two miRNAs (bta-miR-21-5p and bta-miR-143) were identified with the highest number of reads throughout the cycle and show a reversed expression level. While bta-miR-21-5p reaches its maximum in the number of reads in eCL phase and shows a significant decrease in the mCL and ICL phase, bta-miR-143 reaches its peak in the number of reads at the rCL phase and shows a significant decrease in eCL phase. In order to confirm the SDE of these miRNAs, their expression was further validated by RT-PCR. For six miRNAs (bta-miR-210, -96, -182, -183, -146a, -202) validation of sequencing results was successful. In the comparison of rCL phase to mCL and ICL, 24 and 12 miRNAs with SDE were identified respectively. Six of them: bta-miR-142-5p, -3604, -199a-3p, -199a-5p, -199b-5p and -30d-5p are SDE in both comparisons. From this group only bta-miR-30d-5p is down regulated in rCL phase compared to mCL and ICL phases, while the other five mRNAs are found to be up regulated.

All miRNAs identified with SDE in at least one stage of the cycle were classified by SOTA into eight different clusters, according to their similarity in the expression profile. Half of the clusters are composed of miRNAs with high expression level during eCL phase, while the other half contain miRNAs with low expression level during the eCL phase. MiRNAs with SDE in eCL phase are *in silico* predicted to regulate the genes involved in the cell cycle, proliferation and programmed cell death.

In the CL from early pregnancy (P1) the number of miRNAs identified with SDE as compared to mCL, ICL and rCL phases was 50. From the comparison of P1 group to mCL, ICL and rCL phases the number of uniquely SDE miRNAs was 16, 7 and 44 respectively. Two miRNAs, bta-miR-3141 and -2484, were up regulated with a fold change  $\geq 2.0$  in P1 group compared to mCL and rCL phase. The number of SDE

miRNAs in the CL from late pregnancy (P9) was 86, out of them 29 miRNAs were commonly expressed across the three comparisons of P9 group versus mCL, ICL and rCL phases. The greatest number of uniquely SDE miRNAs was identified in the comparison of P9 group versus CL phase. Out of them 14 miRNAs were up regulated and 13 down regulated in the P9 group. Among them miRNAs: bta-miR-92, -183, -382, -432 and -409a were down regulated with a fold change  $\geq 2.0$  in the P9 group versus the other three phases. This network of miRNAs identified in CL from P9 group might be of interest to understand CL's physiology during this stage of pregnancy. However, the complexity of miRNAs expression regulation in CL during advanced stages of the pregnancy remains largely unknown.

Our data generated by the deep sequencing of miRNAs in CL from late pregnancy are among the first in the literature, while our results from the oestrous cycle in general implicate miRNAs to be of significant importance in the CL function in bovine ovary. At the same time these data expand our knowledge on the miRNA expression in the bovine CL and can be further used for functional validation or biomarker identification relevant to animal reproduction and beyond.

**Key words:** Bovine, NGS, Transcriptome, microRNA, Corpus Luteum, Estrous Cycle, RT-PCR, SOTA, HCL.