



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Ardiaren 21 ehunetan
karakterizatutako eta
kuantifikatutako miRNA molekulen
adierazpenaren banaketaren
azterketa**

*Martin Bilbao Arribas,
Aitor Guisasola Serrano,
Endika Varela Martínez,
Laura Diez Fuentes eta
Begoña Marina Jugo*

225-232 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.28>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Ardiaren 21 ehunetan karakterizatutako eta kuantifikatutako miRNA molekulen adierazpenaren banaketaren azterketa

^{1,2}Martin Bilbao-Arribas, ¹Aitor Guisasola-Serrano, ¹Endika Varela-Martínez,

¹Laura Diez-Fuentes, ¹Begoña Marina Jugo

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

²Terapia Genikoa eta Gene-Adierazpenaren Erregulazioa Programa, CIMA Nafarroako Unibertsitatea, IdiSNA

aguisasola013@ikasle.ehu.eus, begonamarina.jugo@ehu.eus

Laburpena

MikroRNA molekulak (miRNA) eboluzioan zehar kontserbatuta dauden eta gene-adierazpena erregulatzen duten RNA ez-kodetzaile txikiak dira. Ardian, beste etxe-abereekin konparatuta, miRNA gutxi deskribatu dira. Lan honetan, datu-basetan argitaratuta dauden ardiaren 21 ehunetako 172 miRNA-seq lagin era uniformearen analizatu ditugu, miRNA berrien eta kontserbatuen adierazpen profilak aztertzeko. Aztertutako ardiaren artean, 270 miRNA molekulek ehun espezifikotasun indizearen balio altuak azaldu zituzten. Gainera, hausnarkarien espezifikoa den mir-2284/mir-2285 miRNA familiako 100 miRNA inguru detektatu ziren. Lan honek miRNA askoren kontserbazio maila altuaren ideiarekin bat dator, baina aldi berean hausnarkarien eboluzioan klado-espezifikokoak diren berrikuntzen potentziala azpimarratu du.

Hitz gakoak: miRNA, miRNA-seq, adierazpena, hausnarkariak, ehun espezifikoa

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are evolutionarily conserved small non-coding RNAs that regulate gene expression. In sheep, few miRNAs have been described compared with other livestock species. We uniformly analyzed 172 public ovine miRNA-seq datasets from 21 different tissues in order to predict conserved and novel miRNA precursors and profile their expression patterns. 270 miRNAs showed high tissue specificity index values. Strikingly, over 100 precursors from the ruminant-specific family of mir-2284/mir-2285 miRNAs were found. This work supports the known high evolutionary conservation of many miRNAs, but also highlights the potential of clade-specific innovations in ruminant evolution.

Keywords: miRNA, miRNA-seq, expression, ruminant, tissue-specific

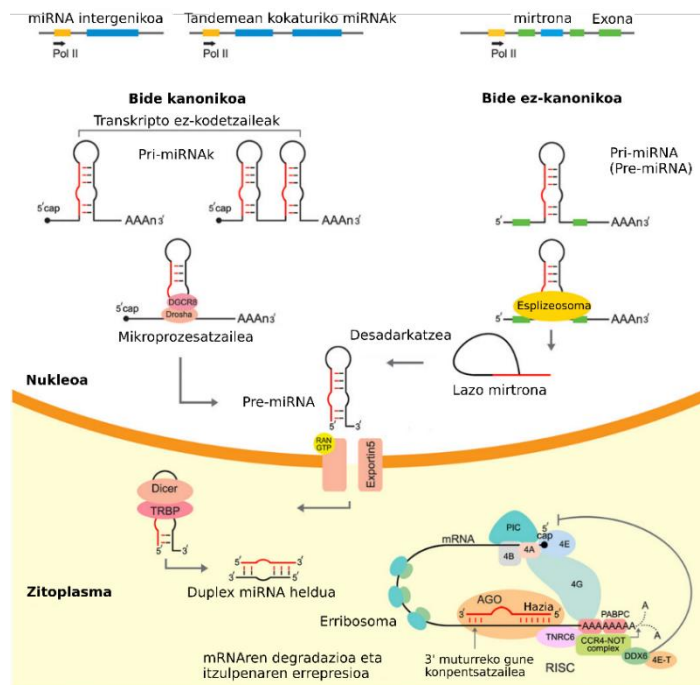
1. Sarrera eta motibazioa

MikroRNAk (miRNAk) eboluzioan zehar kontserbatuta dauden 22 base-pare inguruko RNA ez-kodetzaile txikiak dira eta geneen adierazpena erregulatzea dute helburu (Bartel, 2018). Lehen miRNA, Lin-4 izeneko, 1993. urtean aurkitu zen *Caenorhabditis elegans* nematodoan eta, garai batez, salbuespen gisa kontsideratu zen (Hammond, 2015). Gaur egun, ezagun da miRNAk landare eta animalien erregulazioan eginkizun garrantzitsu bat dutela eta proteinen adierazpenaren herena erregulatzen dutela estimatu da (Bartel, 2004).

MiRNA molekulak genoman kokapen ugari izan ditzakete, intronen barruan (mirtronak) edo exon ez-kodetzaileetan (miRNA intergenikoa), adibidez. MiRNA molekulen portzentaje txiki bat jarraian kokatuta dago (Saliminejad et al., 2018). MiRNA intergenikoak ez dira beste geneetatik gertu agertzen, beraz, promotore propioa duten transkripzio unitateak dira (Bartel, 2004). II RNA polimerasak (Pol II) miRNAen portzentaje handi bat transkribatzen du. Lehen irudian ikus daitekeen bezala, bide kanonikoan transkribatzen den lehen egiturari pri-miRNA deritzo (Bartel, 2018). Drosha eta DGCR8 izeneko azpiunitateak dituen mikroprozesatzaile izeneko konplexu batek pri-miRNA mozten du, gutxi gora behera 70 nukleotido dituen eta pre-miRNA deritzon begizta formako RNA molekula bat sortzen da (García-Lopez et al., 2013). Kanonikoak ez diren bide alternatiboetan bide kanonikoko zenbait urrats egin gabe pre-miRNA edo miRNA helduak sortzen dira. Mirtronak, adibidez, Drosha eta DGCR8 gabe

sortzen dira. Horien orde ez esplizeosomak pri-miRNAk prozesatzen ditu eta lazo mirtrona izeneko begizta formako egitura bat eratzen da. Egitura hau desadarkatzean pre-miRNA sortzen da (Westholm et al., 2011).

1. irudia: jarraian kokaturiko miRNAen, miRNA intergenikoaren eta mirtronen biogenesiaren diagrama. Zelula nukleo barruan eta zitoplasman gertatzen diren prozesuak bereizten dira (Saliminejad et al.-etik moldatua, 2018).



Pre-miRNA nukleotik zitoplasmara garraiatzen da eta bertan prozesaketa-komplexu batek pre-miRNA moztzen du begiztaren alboan. Mozketa honek 22 base-pare (bp) inguruko kate bikoitzeko miRNA heldua (duplex miRNA heldua) sortzen du (Bushati et al., 2007). Duplex miRNA helduaren harizpietako bat argonauta proteina (AGO) batekin lotu eta honek RISC deritzon konplexu erribonukleoproteiko baten eraketa indusitzen du. Azken konplexu horrek eragiten du transkripzio osteko isilpena (Saliminejad et al., 2018). RISC konplexuak bi mekanismo erabil ditzake mRNA isiltzeko: itu mRNAren degradazioa edo itzulpenaren errepresioa. MiRNA eta mRNAren arteko osagarritasunak bi mekanismoetatik zein gertatzen den determinatzen du (Pillai, 2005).

Beraien ugaritasuna eta aniztasuna dela eta, miRNA molekulen ikerketa gero eta garrantzi gehiago hartzen ari da. Izan ere, gero eta diagnostiko molekular gehiago egiteko erabiltzen ari dira miRNAk eta gaixotasun askorekin erlazionatu dira. Minbiziaren kasuan, adibidez, miRNA onkogeniko (OncomiR) ugari detektatu dira, minbizi baten garapena eragin edo areagotu dezaketenak, baina tumore supresore bezala parte hartzen duten miRNAak ere detektatu dira. Kasu batzuetan miRNA berberak oncomiR edo tumore supresore bezala jardu dezaketela ikusi da (Svoronos et al., 2016). Minbiziaren gain, miRNAk diabetesean, gaixotasun kardiobaskularretan eta patogeno birikoetan markatzaile molekular bezala erabil daitezke, eta molekula terapeutiko moduan erabiltzeko garapen prozesuan daude zenbait gaixotasunentzako (Saliminejad et al., 2018).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa-taldean RNA ez-kodetzaileak identifikatu, karakterizatu eta aztertzen ditugu eta etxe-abereak, batez ere ardiak, erabiltzen ditugu eredu biologiko bezala. Dagoeneko ardiaren entzefaloan, odol-zelula mononuklearretan (PBMC) eta birikietan adierazten diren miRNAk, RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) eta RNA zirkularrak (circRNAk) aztertu ditugu RNA-seq teknikaren bidez (Varela-Martínez et al., 2018; Bilbao-Arribas et al., 2019; Varela-Martínez et al., 2020). Ikerketa horiek txertoen eta patogenoen aurkako erantzun immunearen testuinguruan burutu dira.

Beste etxe-abereekin konparatuta, ardiaren miRNA molekulei buruzko informazio eta anotazio falta handiagoa ikus daiteke. Gizakian 2000 miRNA baino gehiago ezagutzen dira eta ahuntza, behia, zaldia eta txerria bezalako espezieetan ehunka miRNA daude deskribatuta miRBase datu basean, ardiaren ordea soilik 106 pre-miRNA (Kozomara et al., 2019). Ardiaren ehun ugari miRNA-seq teknikaren bidez, tamaina txikiko RNA molekulen sekuentziazio teknika, aztertu diren arren, ez dira hainbat ehun era integratuan aztertu. Honelako ikerketak garrantzitsuak dira miRNA ehun espezifikoak identifikatzeko eta ehun ugarietan zehar miRNA molekuleen adierazpenaren ikuspegi orokor bat izateko. Jadanik egin dira honelako ikerketak beste espezie batzuetan, adibidez gizakian (Ludwig et al., 2016), behian (Sun et al., 2019) edo zaldian (Pacholewska et al., 2016). MiRNA-seq datuek aukera bikaina eskaintzen dute datu base publikoetan gordeta dauden datuak bildu eta era integratuan ikertzeko. Modu honetan, ikerketa bakar batetarako bildutako laginek soilik erantzun ezin dituzten galdera zientifikoak erantzun daitezke (Sielemann et al., 2020).

Aurrekari hauek kontuan hartuta, lan honetan ardiaren ehun ugarietan eginiko miRNA-seq datuak bildu dira eta, ardiaren erreferentziazko genoma eguneratuena erabiliz, tresna bioinformatikoekin landu eta estatistikoki aztertu dira, era konparagarri eta uniformean. Lan honetan lortu nahi diren helburuak ondokoak dira: alde batetik, miRNAen azterketa deskriptiboa eta ebolutiboa egitea, eta bestetik ardiaren ehun bakoitzean miRNA ehun espezifikorik dagoen determinatzea, identifikatzea eta beste espezie batean ere identifikatu den ikustea.

3. Ikerketaren muina

3.1 Laginen bilketa eta miRNAen karakterizazioa

PubMed-eko “sheep” eta “miRNA-seq” hitzekin agertzen ziren ikerketa-lanak errebisatu ostean, ardiaren ehunetan miRNA-seq egiten duten eta sekuentziatutako laginak SRA, ENA edo GEO datu baseetara igo dituzten 20 lan aurkitu ziren (1. taula). Animalia hauetan ugalketak daukan garrantzi komertzialagatik, hautatutako 20 lanetatik 5 ardiaren ugal aparatuari buruzkoak ziren (endometria, obulutegia eta gorputz luteoa) eta beste lan batean (Salavati et al., 2020) aztertutako ehunen artean ugal aparatuko beste bi lagin agertzen ziren (obiduktua). Bareako lau lagin gehiago lortu ziren, gure lan taldeak aztertu zituenak eta datu baseetan igota ez zeudenak. Guztira 21 ehunetan banaturiko 172 lagin lortu ziren.

Irakurketen kalitate kontrola eta adaptadoreen ezabatzea Trimmomatic programarekin egin zen. Datuen aurreprozesaketa egin baino lehen, laginek batez beste $15,37 \pm 0,53$ milioi irakurketa zituzten eta ostean $14,07 \pm 0,5$ milioi. MiRNAk ardiaren genomaren aurka mapeatu ziren miRDeep2 programarekin eta honek laginetako sekuentzien batezbesteko % $82,85 \pm 0,8$ mapeatu zuen ardiaren genomaren aurka. 1047 sekuentzia hautatu ziren benetako miRNA izateko $0,83 \pm 0,01$ eko probabilitatea zutenak miRDeep2 tresnaren arabera.

Adierazpen maila kuantifikatzeko orduan, miRNA berrien artean kopia anitzezko sekuentziak zeudenez, CD-HIT tresna erabili zen miRNA berrien pre-miRNAen sekuentziak 0,9ko identitatearen arabera batzeko. 1014 kluster lortu eta kuantifikatu ziren. Pre-miRNA bakoitzak bi miRNA heldu sor dezakeenez, kuantifikazio ostean 1985 miRNA heldu lortu ziren. Gutxienez ehun batean 10 irakurketa ez zituzten miRNAk kendu ostean 1082 miRNA heldu mantendu ziren. Modu esangarrian adierazten ziren miRNA horietatik 935 (% 86,4) anotatu gabeko miRNA berriak ziren ardiaren eta 147 (% 13,6) ardiaren ezagunak. MiRNA berrien artean 574 miRNA kontserbatuta agertu ziren gizakian, txerrian, ahuntzan, behian edo zaldian eta beste 361 ez ziren espezie horietan aurkitu.

1. taula. Lan honetarako hautatutako ikerketen BioProject zenbakiak, horiek azterturiko ehunak, ehun bakoitzeko lagin kopurua parentesien artean eta hautatutako ikerketen artikulua (izatekotan).

BioProject zenbakia	Ehunak eta lagin kopurua
PRJNA451237	Obulutegia (6), Endometrioa (2)
PRJNA354833	Ehun adipotsua (2)
PRJEB22101	Obulutegia (10)
PRJEB32852	Gorputz luteoa (10)
PRJEB32852	Endometrioa (10)
PRJNA392421	Hesteak (3)
PRJEB20781 ^a	Nodulu linfatikoa (6)
PRJNA505702	Obulutegia (6)
PRJNA474913	Birikiak (5)
PRJNA532808	Garuna (12)
PRJNA511987	Bihotza (6), Muskulua (6), Birikiak (6), Giltzurrunak (4), Gibela (5), Barea (6)
PRJNA414087 ^b	Behazun xixkua (2), Bihotza (2), Azala (2), Muskulua (2), Nodulo linfatikoa (2), Kolona (2), Omasoa (2), Errumena (2), Obiduktua (2), Ureterra (2)
PRJNA454385	PBMC (6)
PRJNA528259	Garuna (5)
	Barea (4)
PRJNA638028	Obulutegia (3)
PRJNA613135	Barrabila (8)
PRJNA608075	Bularreko guruina (6)
PRJNA694531	Epipidimoa (9)
PRJNA607580	Bularreko guruina (6)

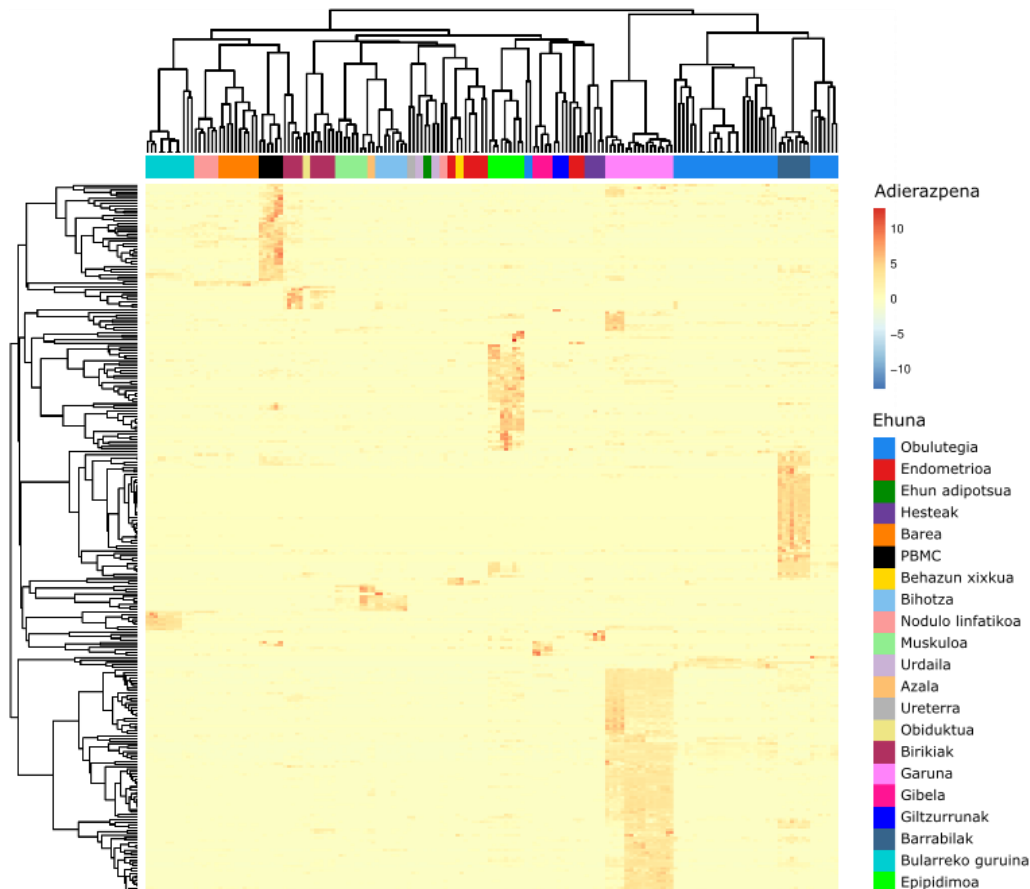
^a Egilearen baimenarekin ^b The Ovine FAANG Project

3.2 MiRNA ehun espezifikoak

MiRNA molekulen ehun espezifikotasuna aztertzeko Yanai eta bere lan taldeak garatutako tau (τ) ehun espezifikotasun indizea (EEI) erabili zen (Yanai et al., 2004). 0,9 baino EEI balio altuagoa zuten 270 miRNA ehun espezifiko bezala kontsideratu ziren. Garuna da miRNA ehun espezifiko gehien zituen ehuna eta jarraian PBMCak. Ile sustraiak eta behazun xixkuak bazituzten ere miRNA ehun espezifiko gutxi batzuk (2. irudia).

Lan honetan identifikaturiko zenbait miRNA ehun espezifiko beste espezie batzuetan ere ehun berdinetan miRNA ehun espezifiko bezala identifikatu izan dira. Gizakian, adibidez, hurrengo miRNAk identifikatu ziren ardiaren ehun beretan: miR-9, miR-7 eta miR-219a garunean; miR-133a muskuluan eta miR-215 hestean (Ludwig et al., 2016). Panda handiaren, zaldiaren, gizakiaren eta ardiaren gibelean mir-122-5p miRNA agertu zen miRNA ehun espezifiko bezala. MiRNA hau glukosa eta lipidoen metabolismoan parte hartzen duela ikusi da (Ludwig et al., 2016; Sun et al., 2019; Wang et al., 2020; Pacholewska et al., 2016). Lan honetan identifikaturiko ardiaren beste miRNA ehun espezifiko bat mir-138 izan da, ardiaren garunean adierazten dena. Arratoian MiR-138 garunean ere adierazten da, eta loaren erregulazioan parte hartzen duela egiaztatu da (Davis et al., 2012).

2. irudia. Ehun espezifikotasun indizea 0.9 baino altuagoa duten 270 miRNA molekulen adierazpen Heat Map-a, laginak korrelazio bidez taldekatzen direlarik. MiRNA molekulen adierazpena log₁₀-gatik transformaturiko milioiko irakurketetan (CPM) adierazita dago.



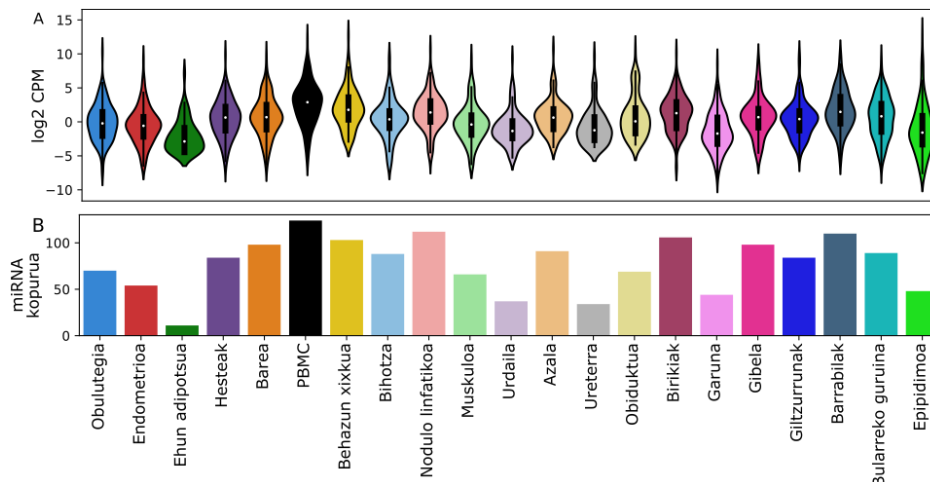
3.3 Hausnarkari espezifikoak den mir-2284/mir-2285 familia

Mir-2284/mir-2285 familiak azterketa sakonagoa behar du. Familia honen kideak behian detektatu ziren lehen aldiz, baina beste hausnarkari batzuen genoma aztertu ahala hausnarkarien espezifikoak dela baieztatu da, ardian, ahuntzan eta zebuan ere detektatu baita.

Lan honetan mir-2284/mir-2285 familiako miRNAen prekursoreak adierazten dituzten 146 loci detektatu dira. Filtroak pasa eta gero, 156 miRNA helduek guk ezarritako adierazpen minimoa gainditu zuten. Orokorrean, familia honetako miRNAek jadanik mirBasen anotatutako miRNAk baino adierazpen txikiagoa erakusten dute. Ordea, lan honetan aurkitutako miRNA berri eta ez-kontserbatuek baino adierazpen handiagoa dute. Zenbait ehunetan, familia honetako miRNAen adierazpena altuagoa da beste ehun batzuekin konparatuta, sistema immunearekin loturiko Odol periferikoko zelula nukleatuetan (PBMCetan) edo nodulo linfatikoetan kasu (3. irudia). Barrabiletan mir-2284/mir-2285 familiaren adierazpena altuagoa da ere. Barean, ordea ez da adierazpen altuagoa hau antzematen.

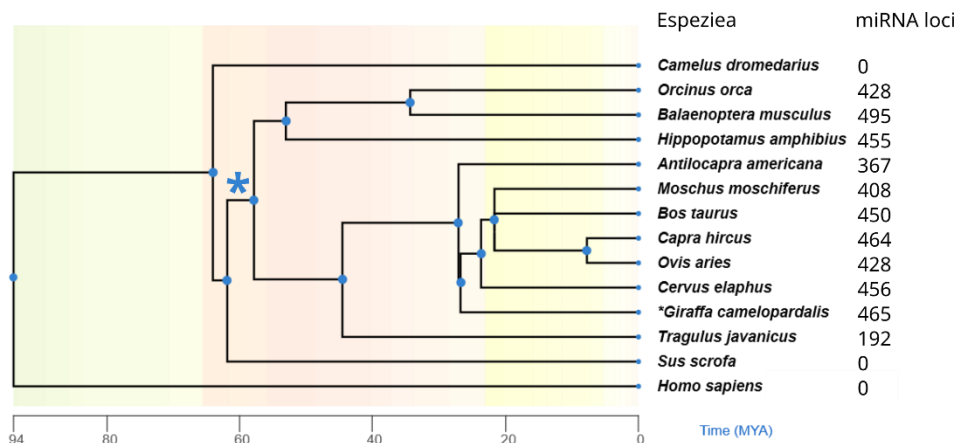
Mir-2284/mir-2285 familiako miRNAen sekuentziak tresna bioinformatikoekin aztertuz, zein geneetan eragiten duten auresan daiteke. TargetScan tresnarekin egindako analisisiek AP3S1 genea familia honetako 34 miRNA desberdinen itu-genea dela iradoki zuten, auresandako geneen artean miRNA gehiagoren itua izanik. AP3S1 geneak adierazten duen azpiunitate espezifikoak intsulinarren hartzailearen seinalizazioan paper garrantzitsu bat duela ikusi da (VanRenterghem et al., 1998). Osotara, 98 gene identifikatu ziren mir-2284/mir-2285 familiaren itu bezala. Gene Ontology datu baseko prozesu biologikoak aztertu ziren 98 gene horietan eta ikusi zen hormonon erregulazioarekin, emeen sexu organoen erregulazioarekin eta kanpo estimuluen erantzunarekin harremanak zeudela. Prozesu biologiko estatistikoki esangarriena hormonon mailaren erregulazioa izan zen, eta, esaterako, AFP, FSHB, VAMP7 edo ESR1 geneak auresandakoen artean daude.

3. irudia. Mir-2284/mir-2285 familiako miRNAen adierazpen maila ehun bakoitzean. A. mir-2284/mir-2285 familiako miRNA adierazpena ehun bakoitzean, milioiko irakurketetan (CPM) adierazita B. CPM > 1eko adierazpena duten mir-2284/mir-2285 familiako miRNA kopurua ehun bakoitzean.



Familia honen jatorri taxonomiko zehatza aztertzeko, Artiodactyla ordeneko hausnarkariak diren eta ez diren 13 espeziaren genometan eta gizakiarenean familia hauetako miRNAen presentzia aztertu zen, genomen aurkako binakako lerrokaketak eginez. Espero bezala, hausnarkariak diren espezieetan miRNA familia-kide kopuru handiak aurkitu ziren. Bereziki interesgarria da zetazeoetan (*Orcinus orca* eta *Balaenoptera amphibijs*) ere aurkitu zirela sekuentzia hauek, baina ez hausnarkariak ez ziren beste bi espezieetan (gamelan eta txerrian). Informazio honetan oinarrituta, familiaren agerpena duela 60 milioi urte inguru datatu ahal izan dugu, hausnarkarien eta zetazeoen arteko banaketaren aurretik (4. irudia).

4. irudia. Hausnarkarietan eta hausnarkariak ez diren beste espezie batzuekin egindako akordiozko zuhaitz filogenetikoa, espezie bakoitzean aurkitzen diren mir-2284/mir-2285 familiako miRNAak erakusten dituena. Asteriskoz adierazi da miRNA familia honen proposatutako agerpena. (*)



4. Ondorioak

Lan honetan ardiaren miRNAen adierazpen atlas bat sortu dugu hainbat RNA ez kodetzailen txikien esperimenduak era integratuan aztertuz. Gainera, aurretik kontuan hartu ez diren eta gure lanean detektatu ditugun karakterizatu eta anotatu gabeko ehunka miRNA sartu ditugu gure analisisetan. Gure analisiak miRNA molekulen espeziaren zeharrekotako kontserbazioaren ideiekin bat datoz, baina baita ere azpimarratu nahiko genuke hausnarkarien eboluzioan klado-espezifikokoak diren miRNA molekulen espantzio eta berrikuntzen potentziala, mir-2284/mir-2285 familiaren kasua bezala. Lan honetan bildutako lagin eta datu guztiak eta egindako miRNA molekulen adierazpen banaketa eta espezifikitate

analisiak oso erabilgarriak izan daitezke ardiaren Genomika eta albaitaritza arloetan, izan ere ardiaren 21 ehunetako miRNA molekulen adierazpenari buruzko informazioa eskaintzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, hausnarkarietan gertaturiko mir-2284/mir-2285 familiaren hedapenean sakontzea komenigarria litzateke, bai eta familia honetako miRNA molekulek zein funtzio duten ikertzea. Gainera, ikerketa-lan desberdinen arteko konparagarritasuna handitzeko, RNA erauzketa, liburutegi prestaketa eta RNA-seq egiteko metodo estandarizatu bat finkatu beharko litzateke, datu base eguneratu eta fidagarri baten garapenarekin batera.

6. Erreferentziak

- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), pp.20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Varela-Martínez, E., Reina, R., De Andrés, D., & Jugo, B. M. (2019). Expression analysis of lung miRNAs responding to ovine VM virus infection by RNA-seq. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5416-0>
- Bilbao-Arribas, M., Guisasaola-Serrano, A., Varela-Martínez, E., & Jugo, B. M. (2023). The sheep mirnaome: Characterization and distribution of mirnas in 21 tissues. *Gene*, 851, 146998. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146998>
- Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). MicroRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 175-205. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406>
- Clauss, M., Hume, I.D. & Hummel, J. (2010). Evolutionary adaptations of ruminants and their potential relevance for modern production systems. *Animal* 4, 979–992. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000388>
- Davis, C. J., Clinton, J. M., & Krueger, J. M. (2012). MicroRNA 138, let-7b, and 125a inhibitors differentially alter sleep and EEG delta-wave activity in rats. *Journal of Applied Physiology*, 113(11), 1756–1762. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00940.2012>
- García-López, J., Briño-Enríquez, M. A., & Del Mazo, J. (2013). MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular Concepts*, 4(4), 367-380. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-001>
- Hammond, S. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47, D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., ... Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Research*, 44(8), 3865-3877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw116>
- Pacholewska, A., Mach, N., Mata, X., Vaiman, A., Schibler, L., Barrey, E., & Gerber, V. (2016). Novel equine tissue miRNAs and breed-related Mirna expressed in serum. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3168-2>
- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny rna? *RNA*, 11(12), 1753-1761. <https://doi.org/10.1261/rna.2248605>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H., Soleymani Fard, S. & Ghaffari, S., (2018). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Salavati, M., Caulton, A., Clark, R., Gazova, I., Smith, T.P.L., Worley, K.C., Cockett, N.E. & Clark, E.L., (2020). Global Analysis of Transcription Start Sites in the New Ovine Reference Genome (Oar rambouillet v1.0). *Front. Genet.* 11, 580580 <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.580580>
- Sielemann, K., Hafner, A. & Pucker, B. (2020). The reuse of public datasets in the life sciences: Potential risks and rewards. *Peer J*, 8, e9954. <https://doi.org/10.7717/peerj.9954>
- Sun, H.Z., Chen, Y. & Guan, L.L. (2019). MicroRNA expression profiles across blood and different tissues in cattle. *Sci. Data*, 6, 190013. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.13>
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). Oncomir or tumor suppressor? the duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666–3670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-0359>

- VanRenterghem, B., Morin, M., Czech, M.P. & Heller-Harrison, R.A. (1998). Interaction of insulin receptor substrate-1 with the σ 3A subunit of the adaptor protein complex-3 in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 29942–29949. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29942>
- Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M. M., Reina, R., ... Jugo, B. M. (2018). Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mrna and microrna transcriptome sequencing. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406>
- Varela-Martínez, E., Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Asín, J., Pérez, M., De Andrés, ... Jugo, B. M. (2020). Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71905-y>
- Wang, C., Li, F., Deng, L., Li, M., Wei, M., Zeng, B., Wu, K., ... Zhang, H. (2021). Identification and characterization of miRNA expression profiles across five tissues in giant panda. *Gene*, 769, 145206. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145206>
- Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Mirtrons: Microrna biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), 1897-1904. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.017>
- Yanai, I., Benjamin, H., Shmoish, M., Chalifa-Caspi, V., Shklar, M., Ophir, R., ... Shmueli, O. (2004). Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics*, 21(5), 650-659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti042>

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Gene izeneko aldizkarian argitaratu da aurtan (Bilbao-Arribas et al., 2023), eta UPV/EHUK babestutako Genomika eta Osasuna ikerketa-taldearen baitan burutu da. M. Bilbao-Arribasek UPV/EHUko doktorego aurreko kontratua izan du (PIF 17/306) eta E. Varela-Martínez-ek Europako Next Generation Funds-en bidezko finantziazioa du Margarita Salas kontratu baten bidez (MARSA21/83). Eskerrak eman nahi dizkiegu argitaratu gabeko emaitzak erabiltzen utzi dizkiguten ikertzaileei.