

Nova generacija sekvenciranja u veterinarskoj medicini - pregled II. dio

K. Vlahović*, G. Gregurić Gračner, M. Pavlak, D. Špoljarić, L. Pajurin i M. Popović



Sažetak

Nova generacija sekvenciranja predstavlja znatan tehnološki napredak koji omogućuje velik napredak u poznavanju genoma životinja te sve širu primjenu u različitim područjima veterinarske medicine. Danas se napredne tehnologije primjenjuju u sekvenciranju cijelog genoma životinja, sekvenciranju njihovih egzoma, ciljanom sekvenciranju DNK fragmenata i sekvenciranju RNK. Ovaj pregled usmjeren je na

trenutačna dostignuća, primjenu i izazove povezane s uporabom naprednih tehnologija sekvenciranja. Prikazana je i primjena tehnologije nove generacije sekvenciranja u genomici životinja kao i njezin daljnji razvoj i buduća primjena.

Ključne riječi: DNK, genomi životinja, nova generacija sekvenciranja, molekularna genetika, povijest

Primjena tehnologije nove generacije sekvenciranja u genomici životinja

Nova generacija sekvenciranja predstavlja nove alate koji se mogu primjenjivati u istraživačkim i dijagnostičkim postupcima. NGS se trenutačno razvija u smjeru molekularnog mikroskopa koji pronalazi svoju primjenu u gotovo svim područjima biomedicinskih istraživanja (Buermans i den Dunnen, 2014.). Rezultat značajnog tehnološkog razvoja NGS platformi je i njihova dostupnost u broj-

nim laboratorijima koji pružaju usluge sekvenciranja u animalnim znanostima i veterinarskim istraživanjima (Duniśławska i sur., 2017.). Glavne prednosti NGS su dobivanje velike količine informacija iz jednog uzorka, nisku cijenu po jedinici informacija (nukleotid), sposobnost izvođenja nepristranog sekvenciranja (tj. bez prethodnog znanja o sadržaju DNK u uzorku) ili ciljanog sekvenciranja, visokokvalitetno određivanje sljeda nukleotida i opsežna primjenjivost (Van Borm i sur., 2016.). Posebno ističemo da se razlikuje cijelogenomsko (engl. *Whole genome sequencing*, WGS) i cijeloegzomsko

Dr. sc. Ksenija VLAHOVIĆ* (dopisni autor, e-mail: vlahovic@vef.hr), dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Gordana GREGURIĆ GRAČNER, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Marina PAVLAK, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Daniel ŠPOLJARIĆ, dr. med. vet., docent, Luka PAJURIN, dr. med. vet., asistent na projektu Hrvatske zaklade za znanost, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

sekvenciranje (engl. *Whole exome sequencing*, WES) (Barišić, 2016.). WES omogućava uvid u 1 % ljudskoga genoma (egzoma) koji kodira bjelančevine bitne za naše funkcioniranje. Prilikom WGS-a izdvaja se cijela genomska DNK i određuje se njezina cjelovita sekvenca (Jeremić i Turzla, 2015.). Za sada su dostupni setovi samo za sekvenciranje egzoma čovjeka i miša. Ulažu se i naponi za stvaranje učinkovitih alata koji bi se mogli koristiti za analizu egzoma drugih eksperimentalnih životinjskih modela kao što su psi (Broeckx i sur., 2015.).

Pokušat ćemo, dakle, ovdje dati kratki pregled rezultata dobivenih primjenom novih generacija sekvenciranja u širim područjima veterinarske medicine. Teško je prikupiti sve pojedinosti o dobivenim rezultatima, stoga navodimo samo neke primjere primjene naprednih tehnologija NGS kao što su:

- a) *Primjena metode DNK barkodiranja u taksonomskoj identifikaciji životinja*
- b) *Primjena metoda NGS u genomici ugroženih vrsta*
- c) *Primjena metoda NGS u genskoj identifikaciji uzročnika bolesti*
- d) *Primjena metoda NGS u metagenomici*
- e) *Primjena metoda NGS u uzgoju životinja*
- f) *Primjena metoda NGS u epigenetici i transkriptomici*
- g) *Primjena metoda NGS u proteomici životinja*

- a) *Primjena metode DNK barkodiranja u taksonomskoj identifikaciji životinja*

Metoda DNK barkodiranja je alat molekularne taksonomije koji primjenjuje kratke univerzalne sekvence dovoljno različite u svih organizama koji nas zanimaju, kako bi omogućila preciznu identifikaciju biološkog materijala. Danas se molekularna taksonomija temelji na razlikama u kratkim genskim markerima koji su zajednički svim živim bićima, a metoda DNK barkodiranja temelji se na standardiziranim markerima (Moritz i Cicero, 2004.). Metoda DNK barkodiranja

životinja zasniva se na molekularnoj raznolikosti gena mitohondrijske DNK za podjedinicu citokrom coksidaze I (COI) ili citokrom b (cyt b) kao univerzalnim lokusima (Hebert i sur., 2003.a,b, Hanelt i sur., 2015., Hundt i sur., 2017., Kakioka i sur., 2018.).

Za identifikaciju različitih sojeva bakterija pokazali su se uspješni DNK barkodovi za male podjedinice gena ribosomalne RNK (16S) (Janda i Abbott, 2007.). Na temelju rezultata nekoliko studija, znanstvenici zaključuju da je za identifikaciju različitih sojeva bakterija moguće rabiti barkodove za podjedinicu citokrom coksidaze I (COI), tip 2 chaperonina (*cpn60*) ili β podjedinicu RNK polimeraze (*rpoB*) (Case i sur., 2007., Links i sur., 2012.).

U svrhu unapređenja metode DNK barkodiranja kao globalnog standarda za identifikaciju bioloških uzoraka životinja osnovan je konzorcij za barkodiranje života (*Consortium for the Barcode of Life*, CBOL) (Moritz i Cicero, 2004.). Međunarodni barkod života (*International Barcode of Life*, iBOL) najveći je projekt sa svrhom istraživanja molekularne bioraznolikosti života i DNK taksonomije s ciljem barkodiranja živih organizama. U njemu aktivno sudjeluju znanstvenici iz cijeloga svijeta (Ratnasingham i Hebert, 2007.). Od osnutka banke podataka 2010. godine pa do danas uspješno su barkodirane brojne vrste životinja i biljaka, odnosno oko 3 milijuna uzoraka koji uključuju 150 tisuća vrsta Arthropoda, 25 tisuća vrsta Chordata, 50 tisuća vrsta biljaka i 10 tisuća vrsta iz manjih svojiti biljaka. Barkodovi istraženih uzoraka životinja i biljaka danas su pohranjeni u *Barcode of Life Database* (BOLD), bazi podataka koja sadrži više od 450,000 BIN-ova (*Barcode index numbers*) u 2019. godini i Banci Gena (*GenBank*) pri Nacionalnom centru za biotehnoške informacije (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Baza podataka uglavnom sadrži BIN zapise životinja dobivene pomoću genskog mar-

kera COI. Navedene baze unaprijedile su istraživanja evolucijske povijesti te identifikaciju prethodno nepoznatih vrsta i biološkog materijala, uključujući i fosilne ostatke.

b) Primjena metoda NGS u genomici ugroženih vrsta

Očuvati vrste kojima prijeti izumiranje te istražiti već izumrle organizme jedna je od značajnih primjena NGS. Genomi egzotičnih životinja postali su predmet interesa velikog broja znanstvenika. Istraživanja su obuhvatila sekvenciranje genoma slonova, mamuta, koala, divovskih pandi i kornjača, njihove analize što je pridonijelo boljem razumijevanju evolucije (Li i sur., 2010., Rohland i sur., 2010., Shaffer i sur., 2013., Johnson i sur., 2014.). Primjera radi, sekvenciran je genom unutar pet ugroženih vrsta roda *Panthera* (afrički lav, afrički bijeli lav, azijski tigar, bijeli bengalski tigar i snježni leopard). Usporedne analize otkrile su bliski genetski odnos. Pritom je otkriven i gen SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) koji određuje bijelu boju dlake afričkog bijelog lava (TYR260G> mutacija) i genske promjene u EGLN1 odgovorne za prilagodbu na veliku nadmorsku visinu (Met39> Lys39) (Cho i sur., 2013.).

Kao odgovor na sve brži gubitak životinjskih genskih resursa svjetski je dogovor stvaranje nacionalnih banki gena. Tako se i Republika Hrvatska putem Hrvatske poljoprivredne agencije (HPA) uključila u izradu registara svih izvornih pasmina domaćih životinja u svrhu njihova očuvanja. Uslijedilo je utemeljenje Banke gena domaćih životinja Republike Hrvatske kao tijela od nacionalnog interesa. Njen Odjel Središnje banke animalnih gena provodi postupke organizacije, prikupljanja, obrade, pohrane i distribucije genskog materijala sukladno propisanim postupcima. Hrvatska baštini 27 izvornih i zaštićenih pasmina u 8 vrsta domaćih

životinja i to: goveda 3, konji 4, magarci 3, ovce 9, koze 3, svinje 2, perad 2 i jednu pasminu pčela (HPA, 2017., Čačić i sur., 2017.a). U bliskoj budućnosti očekuje se uspostava nacionalne banke gena divljih životinja (Čačić i sur., 2017.b).

c) Primjena metoda NGS u genetičkoj identifikaciji uzročnika bolesti

Središnju ulogu u dijagnosticiranju, sprječavanju i suzbijanju zaraznih bolesti i implementaciji svih preventivnih i protuepidemijskih mjera protiv zaraznih bolesti danas ima genetičko određivanje uzročnika bolesti. Napredna tehnologija NGS sve se više primjenjuje za proučavanje etiologije, genomike i epidemiologije zaraznih bolesti životinja, kao i međuodnosa domaćina i uzročnika. Njena primjena pruža nove uvide i ukazuje na izravan utjecaj primijenjene napredne tehnologije na naše razumijevanje pristupa sprečavanja i suzbijanja zaraznih bolesti (Van Borm i sur., 2015.). Na prvoj crti kontrole zarazne bolesti je brza, osjetljiva i pouzdana dijagnostika na temelju koje se potom mogu donositi najprikladnije kliničke odluke (Caliendo i sur., 2013.). Modifikacijom Sengerove metode te primjenom termostabilnih DNK polimeraza uz razvoj DNK amplifikacije uporabom lančane reakcije polimeraze (PCR), omogućeno je rutinsko utvrđivanje uzročnika infekcija u životinja (Van Borm i sur., 2016.). Najmodernije platforme za sekvenciranje DNK i RNK omogućuju uvid u cijeli genom virusa i bakterija. Navedeno omogućava širu primjenu novih epizootioloških i epidemioloških postupaka te nameće obvezu primjene novog pristupa pri mogućoj pojavi zaraznih bolesti danas i u budućnosti. Brojni javno dostupni podatci o bazama gena omogućiti će znanstvenicima da ih u budućnosti koriste s ciljem očuvanja zdravlja u životinja i ljudi (Moreno Switt i Toledo, 2015.). Uporaba naprednih tehnologija danas daje naslutiti buduće

trendove u kojima će se tradicionalne metode zamijeniti WGS tehnologijom. WGS tehnologija danas je jedna od najmodernijih platformi za napredno određivanje molekularne osobitosti sojeva i epidemiološke analize uzročnika bolesti. Unatoč brzom razvoju naprednih tehnologija, široka primjena i kliničkim i javnozdravstvenim laboratorijima ipak je ograničena, jer tek treba uslijediti standardiziranje kontrola kvalitete i tumačenja rezultata, a što će se postići tek razvojem infrastrukture i ulaganjem u postizanje bioinformatičke stručnosti (Kwong i sur., 2015.). Međutim, predvidljivo je da će se vremenom tradicionalne mikrobiološke procedure zamijeniti određenim sveobuhvatnim postupcima koji bi omogućili istovremenu identifikaciju šireg spektra uzročnika bolesti (Gwinn i sur., 2017., Anis i sur., 2018., Gwinn i sur., 2019.). Visoka plastičnost nekih genoma, veličina njihovih pokretnih dijelova, plazmida s kodirajućim genima i područjima velike genske varijabilnosti često otežavaju očitavanje genoma i time pred znanstvenike postavljaju određene izazove (Glenn, 2011., Tritt i sur., 2012.). Zbog male veličine te nemogućnosti umnažanja izvan stanice domaćina, virusi i viroidi predstavljaju uzročnike čije je istraživanje i dokazivanje znatno otežano.

Danas uobičajene metode dokazivanja (serološke, molekularne i biološke) razvijene u zadnjih nekoliko desetljeća, osim što su usmjerene na točno određeno uzročnika, često nisu učinkovite u slučaju kad je infekcija prouzročena novim uzročnikom bolesti i/ili kombinacijom uzročnika koji genetički nisu slični već ranijim opisanima. NGS sekvenciranja omogućuje izravan dokaz i identifikaciju virusa i viroida bez ili uz vrlo ograničeno znanje o njihovom genomu (Vončina, 2017.).

Poznavanje virusnih genoma i njihovih mutacija od iznimne je važnosti

u izradi cjepiva i razvoju protokola liječenja virusnih bolesti (Pyrce i sur., 2008., Radford, 2012.). Same osobitosti virusa, neizbježne mutacije, kratko generacijsko vrijeme umnožavanja, globalizacija, klimatske promjene, veličina populacija određenih organizama te povećani broj imunokompromitiranih osoba značajno pogoduju brzom prilagodljivosti virusa (Scheuch i sur., 2015.). Danas su u porastu do sada nepoznate i naglo izbijajuće zarazne bolesti koje se očituju novim epizootičkim i epidemiološkim značajkama u životinja, ali i čovjeka (Gianella i sur., 2011.). Zajedničko djelovanje stručnjaka humane i veterinarske medicine, uz korištenje i primjenu napredne tehnologije NGS predstavlja potencijal za niz brzih prilagodbi koje bezbrojnim aspektima dijagnostičkih istraživanja. Ovaj sustav zajedničkog djelovanja se naziva „Jedno zdravlje“. Suvremenija dijagnostika podrazumijeva analizu ukupnog genoma, identifikaciju genske raznolikosti, transkriptomsku rutinsku dijagnostičku obradu te bolje razumijevanje interakcije virusa i transkriptoma domaćina i virusa (Singh, 2018.). Tijekom istraživanja prisustva i učestalosti bakterije *Chlamydophila felis* (*Cp. felis*) u populaciji domaće mačke u Hrvatskoj, pri Zavodu za veterinarsku biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Institutu za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani i tvrtki Makrogen u Koreji, kao uzročnik klamidioze u domaće mačke, inficirane prirodnim putem, dokazana je bakterija *Cp. felis*. Sekvenciran je gen bakterije za 16S rRNK i 23S RNK i time je po prvi puta u Hrvatskoj dijagnosticirana klamidioza u prirodno inficirane domaće mačke (Gregurić Gračner, 2008., Gregurić Gračner i sur., 2018.).

d) Primjena metoda NGS u metagenomici

Metodama metagenomike analiziraju se DNK genomi iz više različitih

organizama koji potječu iz mikrobioma, odnosno jedne „mikrobne zajednice“. Metagenomika primjenjuje skup tehnologija za određivanje genskog slijeda u DNK te bioinformatičkih alata za izravan pristup genskom sadržaju cijelih mikrobnih zajednica organizama. Tako je u posljednjih nekoliko godina razvoj područja metagenomike odgovoran za znatan napredak u mikrobnjoj ekologiji i evoluciji zahvaljujući i aktivnoj uključenosti mnogih istraživačkih laboratorija (Ferrer i sur., 2012., Thomas i sur., 2012.). Uz navedeno, dobiveni rezultati mogu se analizirati kroz molekularnu taksonomiju čime se omogućuje određivanje taksonomske pripadnosti pojedinih mikroorganizama. Izdvojenim mikroorganizmima može se odrediti funkcija temeljem analize raznolikosti kodirajućih gena (Petrosino i sur., 2009., Ferrer i sur., 2012.). Primjerice, NGS tehnologija može se izravno primijeniti za poboljšanje proizvodnje peradi i poboljšanje sigurnosti hrane. Metagenomskom analizom sekvenci organizama koji čine mikrobne zajednice crijeva peradi moguće je npr. odrediti gene za metaboličke putove ili prisutnost plazmida te otpornosti na antibiotike ili proizvodnju vitamina (Diaz-Sanchez i sur., 2013.).

e) Primjena metoda NGS u uzgoju životinja

Koristeći NGS, istraživači mogu odrediti i analizirati pojedinačne gene koji utječu na ekonomske svojstva domaćih životinja. Tijekom vrlo kratkog vremena korištenjem metoda NGS omogućeno je bolje razumijevanje pripitomljavanja, evolucije, selekcija na određeno proizvodno svojstvo (npr. visoka plodnost) i kvantitativne razlike zbog ekoloških čimbenika (npr. prehrana), zdravlja i dobrobiti životinja te genske osnove bolesti u životinja. Primjera radi, izravna primjena NGS pridonijela je poznavanju genoma svinje.

Spoznaje o genomu svinje značajne su u mesno prerađivačkoj industriji, ali i zbog njene uloge kao važnog modela u biomedicinskim istraživanjima. Tovnost svinja uvjetovana je međudjelovanjem okolišnih čimbenika i utjecaja gena. Istraživanjima je potvrđena izuzetna važnost strukturalne varijacije gena koji djeluju na pojavu intramuskularne masti, što je pak posebno važno za selekciju usmjerenu na poboljšavanje uzgojnih linija.

Pokusima je otkriveno da u metabolizmu masti sudjeluju FABP proteini (engl. *fatty acid binding protein*, FABP), dok se za svojstvo sadržaja intramuskularne masti kao genetski marker u selekciji koristi FABP3 gen (Schwab i sur., 2009., Cho i sur., 2010.). Metodu RNK sekvenciranja koristilo je više istraživanja provedenih na svinjama. Neka od istraživanja pokazuju da duge nekodirajuće RNK (lncRNK) mogu regulirati adipogenezu i nakupljanje lipida. Čini se da se intramuskularno odlaganje masti razlikuje u različitim pasmina svinja, a mehanizam regulacije na molekularnoj razini još nije u potpunosti razjašnjen (Huang i sur., 2018.). Pokazalo se da duge nekodirajuće RNK (lncRNK) igraju važnu ulogu i u reguliranju imunološkog i upalnog odgovora domaćina na bakterijske infekcije. Infekcija, zoonotskog potencijala, s bakterijom *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) koja se prenosi hranom, može dovesti do niza upalnih bolesti u prasadi i čovjeka, što uvelike utječe na razvoj svjetske svinjogojске industrije. Istraživanja Huang i sur. (2019.) pridonijela su boljem razumijevanju utjecaja lncRNK i mRNK na regulaciju imunog odgovora domaćina na infekciju s *C. perfringens* tipa C što otvara nove mogućnosti i smjernice u istraživanju bolesti. Nadalje, sekvenciranje RNK transkriptoma sperme svinja otkrilo je da postoje sezonske promjene u ejakulatu. Identificirana su 34 kodirajuća

gena i 7 mikroRNK sa znatno različitim distribucijom u ejakulatima ovisno o godišnjem dobu. Ti su se geni uglavnom odnosili na oksidativni stres, oštećenje DNK. Opisane regije mogu poslužiti kao marker za kakvoću sperme u svinja (Gòdia i sur., 2019.).

U svrhu povećanja proizvodnih svojstava u svinja dokazan je veći broj SNP-a te geni (AADAT i ZNF622) s visokim varijacijama broja kopija (engl. *copy number variations*, CNV). CNV zajedno sa SNP-om postali su važan izvor informacija o genskim varijantama i pružaju uvid u nasljeđivanje (Ramos i sur., 2009., Jiang i sur., 2014., Stafuzza i sur., 2019.).

Istraživanja sekvenciranja genoma u stočarskoj i peradarskoj proizvodnji rezultirala su spoznajom o postojanju genomske varijacije koje pružaju informacije korisne za razvoj primjenjivih genskih markera u uzgoju životinja (Ramos i sur., 2009., Rubin i sur., 2010., Aslam i sur., 2012.). Markerski sustavi neprekidno se razvijaju te se povećavaju mogućnosti njihove praktične primjene u kontroli i selekciji domaćih životinja. Otkrivani su i usavršavani brojni markerski sustavi poput mikrosatelita, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphisms*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) i drugi. Primjenjuju se u području stočarstva, ratarstva, dijagnosticiranja i liječenja životinja. Većina bitnih proizvodnih obilježja poligenske je prirode, odnosno kompleksnija je veza genskih lokusa s proizvodnim odlikama, a njihova uporaba u selekcijskim programima iziskuje neizravne kvantitativne genske biljege (engl. *Quantitative Trait Loci*, QTL). Njima je moguće predvidjeti proizvodne odlike domaćih životinja prije no što grla uopće dospiju u proizvodnu fazu (Ivanković, 2005.).

f) Primjena metoda NGS u epigenetici i transkriptomici

Epigenetika predstavlja novi način analize genoma, odnosno ekspresiju gena koja se događa bez promjene sekvence DNK. Promjene koje se događaju su epigenetske modifikacije i uključuju post-translacijsku histonsku modifikaciju i DNK metilaciju. Kemijske skupine koje se dodaju na molekulu DNK prouzroče promjene u DNK i stvaraju epigenome. Posljedica toga je pojava utisnutih gena (engl. *genomic imprinting*) u genomu. Genetski otisak je epigenetička modifikacija u kojoj se jedan od naslijeđenih alela inaktivira. Njegov utjecaj može se vidjeti na proizvodnim i reproduktivnim osobinama. Otkrivanje novih utisnutih gena važno je zbog njihova očuvanja i razumijevanja njihove funkcije (Budimir i sur., 2013.). Jeremić i Turza, (2015.) navode da je od velikog značaja prije svega da se definitivno utvrdi funkcija gena regulatornih dijelova DNK, zatim da se pronađu varijacije u DNK sekvenci koje postoje u populaciji, i da se utvrdi značaj nađenih varijacija, tj. jesu li varijacije povezane s povećanim rizicima od određenih bolesti. Od ništa manjeg značenja nije ni ustvrđivanje mehanizama interakcije DNK i sredine, tj. funkcije i značaja epigenoma. Ugradnja hibridnih konstrukcija (hibridnih promotora) u genom omogućava proučavanje genske ekspresije. Pri izradi genskih karti koristi se više tehnika za lokaliziranje gena na kromosomima, kao što su *in situ* hibridizacija metafaznih kromosoma, uporaba seta staničnih hibrida, bojenje (pruganje) kromosoma, PFGE (engl. *pulse field gelelectrophoresis*) ili mikrodisekcija kromosoma. Pruganje kromosoma prva je primijenjena tehnika u lokalizaciji gena na kromosomu. Mikrodisekcija se temelji na točnom otkrivanju određene regije (isječka) genoma, odnosno pozicije lokusa na isječku. Istraživani isječki dugi su od 10 do 20 cM, izrezuju se u metafazi,

nakon čega se cijepaju, sekvenciraju, a sekvence se potom slažu u genske karte. Genske karte domaćih životinja predstavljaju temelj za razumijevanje djelovanja genoma i primjenu zapaženih genskih markera u praktične uzgojno selekcijske svrhe (Ivanković, 2005.). Dostupnost cijelih genomskih sekvenci je omogućila znanstvenicima istraživanje ekspresije gena na razini cjelovitog genoma. Prijašnje analize jednog po jednog gena danas su zamijenjene mogućom analizom ukupne RNK (engl. *ribonucleic acid RNA*, hrv. ribonukleinska kiselina) koja je transkribirana u stanici (transkriptom). Metoda hibridizacija s DNK-mikročipovima jedna je od najčešće korištenih metoda za sveobuhvatnu analizu ekspresije gena. Primjena novih tehnologija sekvenciranja je i u analizi transkriptoma skupa svih RNK molekula (ribosomalna RNK (rRNK), informacijske RNK (mRNK), transportne RNK (tRNK) i ostalih nekodirajućih RNK (Fehniger i sur., 2010.). Same mikroRNK smatraju se ključnim mehanizmom u regulaciji gena u parazita i virusa. Njihova karakterizacija doprinosi boljem razumijevanju složene biologije uzročnika (energetski metabolizam parazita, faktori inicijacije transkripcije, transdukciju signala i receptore faktora rasta). MiRNK imaju važnu ulogu i u reguliranju interakcija domaćina i patogena. NGS sada ima važnu ulogu u istraživanjima mogućnosti može li sama infekcija modulariti miRNK, za određivanje miRNK koje utječu na replikaciju, tropizam i patogeni potencijal uzročnika. Posebno se važnim pokazalo, da stanične miRNK međusobno djeluju s virusnom genomskom RNK ili mRNK, olakšavajući ili inhibirajući životni ciklus virusa. Ove molekule su pokazale potencijal kao izvor antivirusnog lijeka protiv brojnih virusa ili za projektiranje živog atenuiranog virusnog cjepiva temeljenog na miRNK posredovanom utišavanju gena (Cullen, 2006., Israsena

i sur., 2009., Wang i sur., 2009., Eulalio i sur., 2012., Ibrisimovic i sur., 2013., Xia i sur., 2013.).

g) *Primjena metoda NGS u proteomici životinja*

Unapređenje elektroforeze i tehnika masene spektrometrije zajedno s nedavnim napredovanjem u genomici, akuminirajući podatke o sekvenciranju genoma goveda i svinja, proširilo je potencijalnu primjenu proteomike u području veterinarske medicine. Istraživanja ukazuju na perspektivu u primjeni proteomike na patogenezu bolesti životinja, kao i njezinu primjenu u veterinarskoj dijagnostici. Istraživanja su rezultirala i određenim postignućima u imunoproteomici (tj. identifikacija putem proteomskih tehnika antigena uključenog u imunološki odgovor) i histoproteomiku (tj. primjenu proteomike u tkivima obrađenim za imunohistokemiju) te na kliničku proteomiku (tj. na primjenu proteomike na identifikaciju novih biomarkera životinjskih bolesti) (Cecilian i sur., 2014.). Proteomska istraživanja u veterinarskoj medicini i zdravlju životinja su u zamahu, ali su još uvijek u neznatnom broju u odnosu na ukupno velik broj izvješća u proteomici. Proteomika životinja samostalno je područje proučavanja s primjenom na biologiju i patologiju domaćih vrsta koje daju vrijedan uvid u temeljne aspekte svake vrste. Poredbena proteomika omogućuje da se razlike i sličnosti između proteoma u zdravih i bolesnih životinja usporede između vrsta, čime se dobiva fascinantant uvid u to kako su se razvijali proteomi u pojedinim vrstama (Bilić i sur., 2018.). Primjerice, proteomski pristupi na uzorcima uzetim iz životinja primijenjeni su za istraživanje uzročnika mastitisa u krava pri infekciji sa bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Boehmer i sur., 2008.), na malim preživačima pri infekciji s ovčjim parazitom *Haemonchus contortus* (Nagaraj i

sur., 2012.), u svinja na nekoliko virusnih bolesti uključujući klasičnu svinjsku kugu (Ding i sur., 2012.), u bolesti konja na osteoartritis i osteohondrozu (Clutterbuck i sur., 2011.) u malih životinja na zarazne i neoplastične bolesti (Henry, 2010., Eckersall i McLaughlin, 2011., Humenik i sur., 2019.). Još je u poveljama primjena proteomike u istraživanju laktacijskih parametara u goveda, ali već može pružiti određeni uvid u promjene nastale tijekom razvoja patoloških stanja te koristiti u fiziološkim i nutritivnim istraživanjima laktacije (Eckersall, 2019.). Najnovije proteomske tehnologije koriste se i za proučavanje biologije parazita, primjerice, helminta trematoda (Sotillo i sur, 2019.).

U okviru Laboratorija za proteomiku (ERA Chair projekt VetMedZg) na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u tijekom posljednjih nekoliko godina primjenu se napredne analitičke tehnologije proteomike, metabolomike i genomike u istraživanjima prehrane životinja s ciljem poboljšanja zdravlja i dobrobiti životinja. Konzorcijunavedenog projekta odobrena je financijska potpora iz programa Europskog zajedničkog doktorata H2020 Marie Skłodowska-Curie, koji je dio programa inovativnih mreža za izobrazbu koji financira Europska komisija.

Zaključak

Ovaj pregled sažima pogled koji ocrta moćnu potencijalnu primjenjivost naprednih NGS tehnologija u širem području veterinarske medicine. Teško je predvidjeti koja će tehnologija NGS prevladati u budućnosti, ali je gotovo sigurno da će povećanje brzine, kao i preciznosti te smanjenje cijene sekvenciranja, dovesti do toga da sekvenciranje postane temeljna napredna tehnologija primjenjiva u gotovo svim aspektima istraživanja u biomedicinskim područjima. Iako korištenje NGS ima brojne nedvojbeno kori-

sne aspekte kao jedan od glavnih izazova ostaje potreba za visokim ulaganjima u laboratorije i računalne programe posebno namijenjene analizi goleme količine podataka koji nastaju nakon sekvenciranja genoma.

Literatura

1. ANIS, E., A. B. IAN, K. HAWKINS, M. R. S. IIHA, W. WOLDEMESKEL, T. C. SALIKI and R. P. WILKES (2018): Evaluation of Targeted Next-Generation Sequencing for Detection of Bovine Pathogens in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 56, pii: e00399-18. doi: 10.1128/JCM.00399-18.
2. ASLAM, M. L., J. W. BASTIAANSEN, M. G. ELFERINK et. al. (2012): Whole genome SNP discovery and analysis of genetic diversity in Turkey (*Meleagris gallopavo*). *BMC Genomics* 13, 391.
3. BARIŠIĆ, I. (2016): Aktualne teme u genetičkom informiranju. *Paediatr. Croat.* 60, 24-30.
4. BILIĆ, P., J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. FESTA SABES, V. MRLJAK and P. D. ECKERSALL (2018): Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact. *Proteomic* 18, <https://doi.org/10.1002/pmic.201800047>.
5. BOEHMER, J. L., D. D. BANNERMAN, K. SHEFCHICK et al. (2008): Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 91, 4206-4218.
6. BROECKX, B. J., F. COOPMAN, G. VERHOEVEN, T. BOSMANS, I. GIELEN, W. DINGEMANSE, J. H.SAUNDERS, D. DEFORCE and F. Van NIEUWERBURGH (2015): An heuristic filtering tool to identify phenotype-associated genetic variants applied to human intellectual disability and canine coat colors. *BMC Bioinformatics* 16, 391.
7. BUDIMIR, K., G. KRALIK and V. MARGETA (2013): Epigenetic modifications of swine genome. *Poljoprivreda* 19, 76-80.
8. BUERMANS, H. P. and J. T. den DUNNEN (2014): Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim. Biophys Acta* 1842, 1932-1941.
9. CALIENDO, A. M., D. N. GILBERT, C. C. GINOCCHIO et al. (2013): Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Infectious Diseases Society of America (IDSA). Clin. Infect. Dis.* 57, 139-170.
10. CASE, R. J., Y. BOUCHER, I. DAHLLOF, C. HOLMSTROM, W. F. DOOLITTLE and S. KJELLEBERG (2007): Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 278-288.

11. CECILIANI, F., D. ECKERSALL, R. BURCHMORE and C. LECCHI (2014): Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Vet. Pathol.* 51, 351-362.
12. CHO, K. H., M. J. KIM, G. J. JEON and H. Y. CHUNG (2010): Association of genetic variants for FABP3 gene with back fat thickness and intramuscular fat content in pig. *Mol. Biol. Rep.* 38, 2161-2166.
13. CLUTTERBUCK, A. L., J. R. SMITH, D. ALLAWAY et al. (2011): High throughput proteomic analysis of the secretome in an explant model of articular cartilage inflammation. *J. Proteomics* 74, 704-715.
14. CULLEN, B. R. (2006): Viruses and microRNAs. *Nat. Genet.* 38, 25-30.
15. ČAČIĆ, M., D. KONJEVIĆ, B. REINDL i V. OREHOVAČKI (2017a): Značaj banke gena u uzgoju divljači. 52. Hrvatski i 12. Međunarodni simpozij agronoma (Dubrovnik, 12.-17. veljače 2017). *Zbornik radova. Dubrovnik* (402-405).
16. ČAČIĆ, M., V. OREHOVAČKI, M. ŠPEHAR, M. DADIĆ, V. ČUBRIĆ ČURIK i I. ČURIK (2017b): Prepreke očuvanju izvornih pasmina i razvoju banke gena. 52. Hrvatski i 12. Međunarodni simpozij agronoma (Dubrovnik, 12.-17. veljače 2017). *Zbornik radova. Dubrovnik* (479-483).
17. DIAZ-SANCHEZ, S., I. HANNING, S. PENDLETON and D. D'SOUZA (2013): Next-generation sequencing: The future of molecular genetics in poultry production and food safety Article. *Poultry Sci.* 92, 562-572.
18. DING, Z., Z. J. LI, X. D. ZHANG et al. (2012): Proteomic alteration of Marc-145 cells and PAMs after infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145, 206-213.
19. DUNISŁAWSKA, A., A. SLAWINSKA, J. ŁACHMAŃSKA and M. SIWEK (2017): Next generation sequencing in animal science - A review. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 35, 205-224.
20. ECKERSALL, P. D. (2019): Review: Proteomic approaches to control lactational parameters in dairy cows. *Animal* 13, 82-85.
21. ECKERSALL, P. D. and M. McLAUGHLIN (2011): Proteomics in animal health and disease. In: Eckersall, P. D., P. D. Whitfield: *Methods in Animal Proteomics*. Chichester, England, John Wiley & Sons (243-318).
22. EULALIO, A., L. SCHULTE and J. VOGEL (2012): The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol.* 9, 742-750.
23. FEHNIGER, T. A., T. WYLIE, E. GERMINO et al. (2010): Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res.* 20, 1590-1604.
24. FERRER, M., A. GHAZI, A. V. BELOQUI et al. (2012): Functional metagenomics unveils a multifunctional glycosyl hydrolase from the family 43 catalysing the breakdown of plant polymers in the calf rumen. *PLoS One* 7:e38134 100.
25. GIANELLA, S., W. DELPORT and M. E. PACOLD (2011): Detection of minority resistance during early HIV- 1 infection: natural variation and Spurious detection rather than transmission and evolution of multiple viral variants. *J. Virol.* 85, 8359-8367.
26. GLENN, T. C. (2011): Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 759-769.
27. GÖDIA, M., M. ESTILL, A. CASTELLÓ, S. BALASCH, J. E. RODRÍGUEZ-GIL S. A KRAWETZ, A. SÁNCHEZ and A. CLOP (2019): A RNA-Seq Analysis to Describe the Boar Sperm Transcriptome and Its Seasonal Changes. *Front. Genet.* 10, 299.
28. GREGURIĆ GRAČNER, G. (2008): Izdvajanje i dokaz bakterije *Chlamydomydia felis* u domaće mačke mikrobiološkim i molekularnim postupcima. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
29. GREGURIĆ GRAČNER, G., K. VLAHOVIĆ, A. DOVČ, B. SLAVEC, LJ. BEDRICA, S. ŽUŽUL and D. GRAČNER (2018): A preliminary study of *Chlamydomydia felis* prevalence among domestic cats in the City of Zagreb and Zagreb County in Croatia. *Vet. stn.* 49, 1-7.
30. GWINN, M., D. MacCANNELL and R. F. KHABBAZ (2017): Integrating advanced molecular technologies into public health. *J. Clin. Microbiol.* 55, 703-714.
31. GWINN, M., D. MacCANNELL and L. G. ARMSTRONG (2019): Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens. *JAMA* 321, 893-894.
32. HANELT, B., A. SCHMIDT-RHAESA and M. G. BOLEK (2015): Cryptic species of hairworm parasites revealed by molecular data and crowdsourcing of specimen collections. *Mol. Phylogenet. Evol.* 82, 211-218.
33. HEBERT, P. D. N., S. RATNASINGHAM and J. R. DEWAARD (2003a): Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 96-99.
34. HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA and S. L. BALL (2003b): Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313-321.
35. HENRY, C. J. (2010): Biomarkers in veterinary cancer screening: applications, limitations and expectations. *Vet. J.* 185, 10-14.
36. HPA (Hrvatska poljoprivredna agencija) (2016): Banka gena domaćih životinja Republike Hrvatske – Izvješće za 2016. god. Križevci (2017) (5).
37. HUANG, W., X. ZHANG, A. LI, L. XIE and X. MIAO (2018): Genome-Wide Analysis of mRNAs and lncRNAs of Intramuscular Fat Related to Lipid Metabolism in Two Pig Breeds. *Cell Physiol. Biochem.* 50, 2406-2422.
38. HUANG, X., W. SUN, Z. YAN, H. SHI, Q. YANG, P. WANG, S. LI, L. LIU, S. ZHAO and S. GUN (2019): Integrative Analyses of Long Non-coding RNA and mRNA Involved in Piglet Ileum Immune Response to *Clostridium perfringens* Type C Infection. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 30, 130.
39. HUMENIK, F., D. CIZKOVA, S. CIKOS et al. (2019): Canine bone marrow derived mesenchymal stem cells: Genomics, Proteomics and Functional Analyses of Paracrine Factor. *Mol. Cell Proteomics*.

- pii: mcp.RA119.001507. doi: 10.1074/mcp.RA119.001507.
40. HUNDT, P. J., P. B. BERENDZEN and A. M. SIMONS (2017): Species delimitation and phylogeography of the studfish *Fundulus catenatus* species group (Ovalentaria: Cyprinodontiformes). Zool. J. Linn. Soc. 180, 461-474.
 41. IBRISIMOVIC, M., D. KNEIDINGER, T. LION and R. KLEIN (2013): An adenoviral vector-based expression and delivery system for the inhibition of wildtype adenovirus replication by artificial microRNAs. Antiviral Res. 97, 10-23.
 42. ISRASENA, N., P. SUPAVONWONG, N. RATANASETYUTH, P. KHAWPLOD and T. HEMACHUDHA (2009): Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. Antiviral Res. 84, 76-83.
 43. IVANKOVIĆ, A. (2005): Uporaba molekularne genetike u animalnoj proizvodnji. Stočarstvo 59, 121-144.
 44. JANDA, J. M. and S. L. ABBOTT (2007): "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls". J. Clin. Microbiol. 45, 2761-2764.
 45. JEREMIĆ, V. i K. TURZA (2015): Sekvenciranje celog genoma - praktična ograničenja i etičke dileme. Medicinski pomladak 66, 22-28.
 46. JIANG, J., J. WANG, H. WANG, Y. ZHANG, H. KANG, X. FENG, J. WANG, Z. YIN, W. BAO, Q. ZHANG and J. F. LIU (2014): Global copy number analyses by next generation sequencing provide insight into pig genome variation. BMC Genomics 15, 593.
 47. JOHNSON, R. N., M. HOBBS, M. D. B. ELDRIDGE, A. G. KING, D. J. COLDAN, M. R. WILKINGS et al. (2014): The Koala Genome Consortium. Tech. Rep. Austral. Museum 24, 91-92.
 48. KAKIOKA, R., N. MUTO, H. TAKESHIMA et al. (2018): Cryptic genetic divergence in *Scolopsis taenioptera*, (Perciformes: Nemipteridae) in the Western Pacific Ocean. Ichthyol. Res. 65, 92-100.
 49. KWONG, J. C., N. MCCALLUM, V. SINTCHENKO and B. P. HOWDEN (2015): Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. Pathology 47, 199-210.
 50. LI, R., W. FAN, G. TIAN, H. ZHU, L. HE, J. CAI et al. (2010): The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. Nature 463, 311-317.
 51. LINKS, M. G., T. J. DUMONCEAUX, S. M. HEMMINGSEN and J. E. HILL (2012): "The Chaperonin-60 Universal Target Is a Barcode for Bacteria That Enables De Novo Assembly of Metagenomic Sequence Data". PLoS One. 7, e49755. doi: 10.1371/journal.pone.0049755.
 52. MORENO SWITT, A. I. and V. TOLEDO (2015): Infectious diseases in the genomic era. Rev. Chilena Infectol. 32, 571-576.
 53. MORITZ, C. and C. CICERO (2004): DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. PLoS Biol. 2, e245, doi:10.1371/journal.pbio.0020354.
 54. NAGARAJ, S. H., H. C. HARSHA, A. REVERTER et al. (2012): Proteomic analysis of the abomasal mucosal response following infection by the nematode, *Haemonchus contortus*, in genetically resistant and susceptible sheep. J. Proteomics 75, 2141-2152.
 55. PETROSINO, J. F., S. HIGHLANDER, R. A. LUNA, R. A. GIBBS and J. VERSALOVIC (2009): Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin. Chem. 55, 856-866.
 56. PYRC, K., M. F. JEBBINK and B. BERKHOUT (2008): Detection of new viruses by VIDISCA. Virus discovery based on cDNA-amplified fragment length polymorphism. Meth. Mol. Biol. 454, 73-89.
 57. RADFORD, A. D., D. CHAPMAN and L. DIXON (2012): Application of next-generation sequencing technologies in virology. J. Gen. Virol. 93, 1853-1868.
 58. RAMOS, A. M., R. P. CROOIJMANS, N. A. AFFARA et al. (2009): Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. PLoS One. 4, e6524. doi: 10.1371/journal.pone.0006524.
 59. RATNASINGHAM, S. and P. D. N. HEBERT (2007): The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). Mol. Ecol. Notes 7, 355-364.
 60. ROHLAND, N., D. REICH, S. MALLICK, M. MEYER, R. E. GREEN, N. J. GEORGADIS, A. L. ROCA and M. HOFREITER (2010): Genomic DNA sequences from mastodon and woolly mammoth reveal deep speciation of forest and savanna elephants. PLoS Biol. 8, e1000564. doi: 10.1371/journal.pbio.1000564.
 61. RUBIN, C. J., M. C. ZODY, J. ERIKSSON et al. (2010): Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. Nature 464, 587-591.
 62. SCHEUCH, M., D. HOPER and M. BEER (2015): Riems a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets. BMC Bioinform. 45, 69.
 63. SCHWAB, C. R., B. E. MOTE, Z. Q. DU, R. AMOAKO, T. J. BAAS and M. F. ROTHSCCHILD (2009): An evaluation of four candidate genes for use in selection programmes aimed at increased intramuscular fat in Duroc swine. J. Anim. Breed. Genet. 126, 228-236.
 64. SHAFFER, H. B., P. MINX, D. E. WARREN et al. (2013): The western painted turtle genome, a model for the evolution of extreme physiological adaptations in a slowly evolving lineage. Genome Biol. 14, 28.
 65. SINGH, D. D. (2018): Next-generation sequencing technologies as emergent tools and their challenges in viral diagnostic. Biomed. Res. 29, DOI:10.4066/biomedicalresearch.29-18-362
 66. SOTILLO, J., M. S. PEARSON and A. LOUKAS (2019): Trematode Genomics and Proteomics. Adv. Exp. Med. Biol. 1154, 411-436.
 67. STAFUZZA, N. B., R. M. O. SILVA, B. O. FRAGOMENI, Y. MASUDA, Y. HUANG, K. GRAY and D. A. L. LOURENCO (2019): A genome-wide

- single nucleotide polymorphism and copy number variation analysis for number of piglets born alive. *BMC Genomics* 20, 321.
68. THOMAS, T., J. GILBERT and F. MEYER (2012): Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3
69. TRITT, A., J. A. EISEN, M. T. FACCIOTTI and A. E. DARLING (2012): An integrated pipeline for de novo assembly of microbial genomes. *PLoS One*. 7:e42304. doi: 10.1371/journal.pone.0042304
70. Van BORM, S., J. WANG F. GRANBERG and A. COLLING (2016): Next-generation sequencing workflows in veterinary infection biology: towards validation and quality assurance. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35, 67-81.
71. Van BORM, S., S. BELÁK, G. FREIMANIS, A. FUSARO, F. GRANBERG, D. HÖPER, D. P. KING, I. MONNE, R. ORTON and T. ROSSEEL (2015): Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? *Methods Mol. Biol.* 1247, 415-436.
72. VONČINA, D. (2017): "Next generation sequencing" u dijagnostici virusa i viroida vinove loze. 61. seminar biljne zaštite. (Opatija, Hrvatska, 7-10. veljače 2017). *Zbornik sažetaka. Opatija* (55).
73. WANG, Y., V. BRAHMAKSHATRIYA, H. ZHU et al. (2009): Identification of differentially expressed miRNAs in chicken lung and trachea with avian influenza virus infection by a deep sequencing approach. *BMC Genomics* 10, 512.
74. XIA, B., H. SONG, Y. CHEN et al. (2013): Efficient inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by artificial microRNAs targeting the untranslated regions. *Arch Virol.* 158, 55-61.

Next-generation sequencing in veterinary medicine - a review: part II

Ksenija VLAHOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Gordana GREGURIĆ GRAČNER, DVM, PhD, Associate Professor, Marina PAVLAK, DVM, PhD, Full Professor, Daniel ŠPOLJARIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Luka PAJURIN, DVM, PhD, Project Assistant at Croatian Science Foundation, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

The next-generation sequencing represents a significant technological progress that allows a vast improvement in animal genome knowledge and its widespread use in various fields of veterinary medicine. Advanced technologies are currently being applied to entire genome sequencing, exosome sequencing and targeted DNA fragments and RNA sequencing in animals. This review focuses on the

current achievements, applications and challenges associated with the use of advanced sequencing technologies. The history of next-generation sequencing technology in animal genomics, its further development and future applications are presented.

Key words: DNA; Animal genomes; Next Generation Sequencing; Molecular genetics; History