

Identification of key co-expression modules and functional pathways associated with bovine mastitis caused by *Prototheca* spp. through a functional integration approach of bioinformatics analyses

Farzad Ghafouri^{1,2} , Mostafa Sadeghi³ , Seyed Reza Miraei-Ashtiani⁴ , Herman Wildrik Barkema⁵ , Masoud Shirali^{6,7} 

1. Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran. E-mail: farzad.ghafouri@ut.ac.ir
2. Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI), Hillsborough, BT26 6DR, Northern Ireland, UK. E-mail: farzad.ghafouri@afbini.gov.uk
3. Corresponding Author, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran. E-mail: sadeghimos@ut.ac.ir
4. Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran. E-mail: ashtiani@ut.ac.ir
5. Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB T2N 4N1, Canada. E-mail: barkema@ucalgary.ca
6. Corresponding Author, Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI), Hillsborough, BT26 6DR, Northern Ireland, UK. E-mail: masoud.shirali@afbini.gov.uk
7. School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, BT9 5AJ, Northern Ireland, UK. E-mail: m.shirali@qub.ac.uk

Article Info

ABSTRACT

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 27 January 2026

Received in revised form: 22 April 2026

Accepted: 22 June 2026

Published online: Autumn 2026

Keywords:

Co-expression modules, dairy cows, mastitis, *Prototheca* spp., transcriptome.

Mastitis is one of the most serious challenges confronting the dairy industry, yet gene regulatory mechanisms underlying the host response to *Prototheca* spp., which are emerging pathogens of mastitis, remain poorly understood. This study aimed to apply an integrative bioinformatics framework—including comparative transcriptome analysis, weighted gene co-expression network analysis, and bipartite regulatory network—to identify key co-expression modules with increased or decreased expression that are involved in gene regulatory mechanisms in the somatic milk cells of two groups of Holstein dairy cattle: mastitis-affected (n=8) and healthy (n=7). Genes exhibiting increased or decreased expression were analyzed separately ($FC \geq 2$ and ≤ -2 , $FDR < 0.05$), and bipartite regulatory networks were reconstructed independently for each group. The upregulated hub co-expression module comprised 13 hub genes (*POU2AF1*, *FCRL5*, *JCHAIN*, *CD19*, *MS4A1*, *CD79A*, *IL17A*, *IFNG*, *PAX5*, *CXCR5*, *TNFRSF13C*, *CD79B*, and *CD22*) and two hub miRNAs (bta-miR-2404 and bta-miR-2887). These genes and miRNAs were predominantly associated with host defense mechanisms, immune system activation through inflammatory regulation, adaptive immunity, B- and T-cell responses, and the IL-17 signaling pathway. In contrast, the downregulated hub co-expression module consisted of six hub genes (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *BTN1A1*, *LALBA*, and *PLIN2*) and six hub miRNAs (bta-miR-2462, bta-miR-34a, bta-miR-1434, bta-miR-12001, bta-miR-11981, and bta-miR-1835). These elements were primarily involved in the regulation of milk synthesis and its components, physiological processes, and the glucagon signaling pathway. Overall, these findings provide a valuable foundation for identifying regulatory mechanisms associated with susceptibility or resistance to bovine mastitis caused by *Prototheca* spp., with potential applications in genetic improvement and breeding strategies.

Cite this article: Ghafouri, F., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S. R., Wildrik Barkema, H. & Shirali, M. (2026). Identification of key co-expression modules and functional pathways associated with bovine mastitis caused by *Prototheca* spp. through a functional integration approach of bioinformatics analyses. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 (3), 445-471. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.410169.654126>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.410169.654126>

Extended Abstract

Introduction

Mastitis is one of the major health challenges in dairy herds, typically arising from the invasion of a wide range of microorganisms into the mammary gland, which leads to intramammary infections (IMI) and inflammatory responses. Beyond its detrimental effects on animal welfare, mastitis causes substantial economic losses to dairy producers due to decreased milk yield and altered milk composition, increased veterinary and treatment costs, and the premature culling of chronically affected cows. Over the past two decades, the prevalence of *Prototheca* spp. microalgae have increased steadily, establishing them as emerging mastitis pathogens in dairy herds. Owing to their intrinsic resistance to antimicrobial treatment, the difficult to diagnose *Prototheca*-associated infections are frequently persistent, and often overlooked. In this context, RNA sequencing (RNA-seq) and transcriptomic profiling represent powerful tools for elucidating complex host-pathogen interactions. However, to date, comprehensive studies integrating co-expression module analysis and the reconstruction of multi-partite regulatory networks to elucidate gene regulatory mechanisms associated with *Prototheca* spp. infection in milk somatic cells have not been conducted. Therefore, the objective of this study was to systematically characterize the transcriptomic response of mammary tissue to *Prototheca* spp. infection in Holstein dairy cows. Using an integrative, multi-partite analytical framework, including comparative RNA-seq analysis, weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), and bipartite miRNA-mRNA regulatory network reconstruction, we aimed to identify key hub co-expression modules, regulatory transcripts, and associated functional pathways. Ultimately, this study provides deeper genetic insight into bovine mastitis caused by *Prototheca* spp. and supports the development of informed breeding strategies to select cows with enhanced resistance as parents of the next generations.

Materials and Methods

This study analyzed RNA-seq data derived from milk somatic cell samples of Holstein dairy cows, comprising two groups: mastitis-affected cows infected with *Prototheca* spp. and healthy control cows. The dataset, corresponding to project number PRJNA911953, is publicly available in the GEO database from NCBI and includes 15 biological replicates (eight clinical mastitis and seven healthy samples). The quality of raw sequencing reads was initially assessed using FastQC, followed by adapter trimming and removal of low-quality reads using Trimmomatic. Cleaned reads were then aligned to the bovine reference genome (*Bos taurus*) using HISAT2, and gene-level read counts were generated with featureCounts. Differential expression analysis of transcripts, including both mRNAs and miRNAs, was performed using the DESeq2 package. To stabilize variance and facilitate downstream co-expression network analyses, Variance Stabilizing Transformation (VST) normalization was applied using the `vst(blind = TRUE)` function. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was conducted in the R software environment. The optimal soft-thresholding power was determined using the `pickSoftThreshold` function with powers ranging from 1 to 20 and `networkType = "signed"`. A soft-threshold power of $\beta = 19$ was selected based on achieving a scale-free topology fit index (R^2) was > 0.8 in conjunction with an appropriate mean connectivity profile. Gene Ontology (GO) and pathway enrichment analyses were performed to identify significantly enriched biological processes and metabolic-signaling pathways using the DAVID online tool and the STRING database. Statistical significance was determined using a false discovery rate (FDR) threshold of < 0.05 , adjusted by the Benjamini-Hochberg method. To further elucidate the regulatory mechanisms underlying bovine mastitis caused by *Prototheca* spp., an integrated mRNA-ncRNA regulatory network framework was constructed. This framework incorporated protein-protein interaction data and miRNA-target gene interactions to investigate molecular relationships and regulatory patterns influencing gene expression in bovine mastitis. Network visualization and analysis were performed using Cytoscape software.

Results and Discussion

Following quality control confirmation, differential expression analysis was conducted to identify transcripts exhibiting significant expression changes between cows with clinical mastitis and healthy cows. In total, 6,726 genes showed significant differential expression ($P < 0.05$). Based on the defined thresholds ($|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$ and $\text{FDR} < 0.05$), 119 mRNAs, five miRNAs, and four lncRNAs were significantly upregulated, while 181 mRNAs, nine miRNAs, and 10 lncRNAs were significantly downregulated in cows with clinical mastitis compared with healthy controls. Analysis of chromosomal distribution revealed non-uniform transcript abundance patterns, indicating that certain chromosomes—particularly chromosomes 2 and 5—acted as hub chromosomes, each harboring 28 differentially expressed transcripts involved in regulating molecular responses to mastitis-associated IMIs. To satisfy the criterion of approximate scale-free topology in co-expression network construction, the soft-thresholding power (β) was set to 19, achieving a scale-free topology fit index (R^2) > 0.80 . Using clinical mastitis samples as the reference set, hierarchical clustering

combined with the Dynamic Tree Cut algorithm identified 19 distinct co-expression modules. Integration of comparative transcriptome analysis with co-expression network results revealed 104 and 135 overlapping genes between the lists of upregulated and downregulated genes and their corresponding co-expressed modules, respectively. Based on experimentally supported and predicted miRNA–mRNA interactions, bipartite miRNA–mRNA regulatory networks were subsequently reconstructed for both upregulated and downregulated transcript sets. Within the regulatory co-expression network associated with upregulated genes, 13 hub mRNAs (*POU2AF1*, *FCRL5*, *JCHAIN*, *CD19*, *MS4A1*, *CD79A*, *IL17A*, *IFNG*, *PAX5*, *CXCR5*, *TNFRSF13C*, *CD79B*, and *CD22*) and two hub miRNAs (bta-miR-2404 and bta-miR-2887) were identified. These hub transcripts were predominantly involved in host defense responses, immune system activation through the regulation of inflammatory processes, B- and T-cell activity, cytokine–cytokine receptor interactions, and the IL-17 signaling pathway. Collectively, they play a critical role in adaptive immunity by enhancing immune preparedness and facilitating effective responses against pathogenic invasion. Conversely, the regulatory co-expression network associated with downregulated genes revealed six hub mRNAs (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *BTN1A1*, *LALBA*, and *PLIN2*) and six hub miRNAs (bta-miR-2462, bta-miR-34a, bta-miR-1434, bta-miR-12001, bta-miR-11981, and bta-miR-1835). These downregulated transcripts were primarily associated with the regulation of milk synthesis and its components, maintenance of mammary tissue function, and hormonal signaling pathways—particularly those involving progesterone and estradiol—that govern mammary epithelial cell growth and differentiation. Additionally, these transcripts were linked to the glucagon signaling pathway, which is known to suppress milk protein synthesis and disrupt glucose metabolism during mastitis.

Conclusion

The findings of this study demonstrate that an integrative bioinformatics approach is effective in identifying key hub co-expression modules, hub transcripts (mRNAs and miRNAs), and functional pathways associated with bovine mastitis caused by *Prototheca* spp., thereby providing novel insights into the genetic architecture and gene regulatory mechanisms underlying this disease. These results enhance our understanding of host responses to *Prototheca*-induced mastitis and highlight potential molecular targets associated with resistance or susceptibility. However, to translate these findings into practical breeding strategies aimed at improving herd resistance and identifying mastitis-susceptible dairy cows, further investigations involving larger populations, independent datasets, and experimental validation of the identified hub transcripts are required.

Author Contributions

Conceptualization: Farzad Ghafouri, Mostafa Sadeghi, Seyed Reza Miraei-Ashtiani, Herman Wildrik Barkema and Masoud Shirali; methodology: Farzad Ghafouri; formal analysis: Farzad Ghafouri and Masoud Shirali; writing—original draft preparation, Farzad Ghafouri; writing—review and editing: Mostafa Sadeghi, Seyed Reza Miraei-Ashtiani, Herman Wildrik Barkema and Masoud Shirali; supervision: Mostafa Sadeghi, Masoud Shirali, Seyed Reza Miraei-Ashtiani and Herman Wildrik Barkema. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Datasets used in this study are publicly available and can be accessed from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with project number PRJNA911953. Further details on accessing the data are on the NCBI website at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Acknowledgements

The authors sincerely thank the researchers of the project with accession number PRJNA911953 for generating and sharing their transcriptomic data through the NCBI public repository. Open access to these data enabled the complementary and innovative analyses of the present study, including weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and reconstruction of bipartite mRNA–miRNA regulatory networks. We hereby appreciate the valuable efforts of these researchers in advancing the knowledge of bovine mastitis.

Ethical Considerations

The study did not involve human or animal subjects and therefore did not require ethical approval. The authors confirm that no data fabrication, falsification, plagiarism, or misconduct occurred.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

شناسایی ماژول‌های هم‌بیان کلیدی و مسیرهای عملکردی مرتبط با ورم‌پستان گاوهای شیری ناشی از گونه‌های پروتوتکا از طریق رویکرد ادغام کاربردی تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

فرزاد غفوری^۱ | مصطفی صادقی^۳ | سیدرضا میرائی آشتیانی^۴ | هرمان ویلدریک بارکما^۵ | مسعود شیرعلی^{۶،۷}

۱. گروه مهندسی علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران. رایانامه: farzad.ghafouri@ut.ac.ir

۲. مؤسسه تحقیقات کشاورزی، غذا و علوم زیستی، هیلزبر، ایرلند شمالی، انگلستان. رایانامه: farzad.ghafouri@afbini.gov.uk

۳. نویسنده مسئول، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران. رایانامه:

sadeghimos@ut.ac.ir

۴. گروه مهندسی علوم دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران. رایانامه: ashtiani@ut.ac.ir

۵. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه کلگری، کلگری، آلبرتا، کانادا. رایانامه: barkema@ucalgary.ca

۶. مؤسسه تحقیقات کشاورزی، غذا و علوم زیستی، هیلزبر، ایرلند شمالی، انگلستان. رایانامه: masoud.shirali@afbini.gov.uk

۷. نویسنده مسئول، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه کوپننر بلفاست، بلفاست، ایرلند شمالی، انگلستان. رایانامه: m.shirali@qub.ac.uk

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	ورم‌پستان یکی از جدی‌ترین چالش‌های صنعت گاوهای شیری می‌باشد که تاکنون سازوکارهای تنظیم ژنی مؤثر در میزان در پاسخ به گونه‌های پروتوتکا به عنوان پاتوژن‌های نوظهور به طور کامل شناسایی نشده‌اند. هدف از ارائه پژوهش حاضر، ادغام چندلایه‌ای تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم مقایسه‌ای، شبکه‌های هم‌بیانی ژنی وزن‌دار و شبکه‌های تنظیمی دویخشی برای شناسایی ماژول‌های هم‌بیان هاب دارای افزایش و کاهش بیان دخیل در سازوکارهای تنظیم ژنی سلول‌های سوماتیک شیر دو گروه از گاوهای شیری هلستاین مبتلا به ورم‌پستان (۸ نمونه) و سالم (۷ نمونه) بود. ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان حاصل از هر تجزیه و تحلیل به صورت مستقل از هم تفکیک شدند ($FC \geq 2$ and ≤ -2 , $FDR < 0.05$) و برای هر گروه شبکه‌های تنظیمی دویخشی بازسازی گردید. ماژول هم‌بیان هاب دارای افزایش بیان شامل ۱۳ ژن هاب (<i>FCRL5</i> , <i>POU2AF1</i> , <i>CD22</i>) و <i>miRNA</i> ۲ هاب (<i>bta-miR-2887</i> و <i>bta-miR-2404</i>) بود که به طور کلی در پاسخ‌های دفاعی، فعال‌سازی سیستم ایمنی بدن با تنظیم پاسخ‌های التهابی، سیستم ایمنی تطبیقی، سلول‌های B و T و مسیر سیگنالی IL-17 نقش داشتند. همچنین ماژول هم‌بیان دارای کاهش بیان حاصل تعامل ۶ ژن هاب (<i>CSN1S1</i> , <i>CSN2</i> , <i>CSN1S2</i> , <i>PLIN2</i> و <i>LALBA</i>) و <i>miRNA</i> ۶ هاب (<i>bta-miR-34a</i> , <i>bta-miR-2462</i>) بود که به طور عمده در تنظیم فعالیت‌های مرتبط با سنتز شیر و ترکیبات آن، تنظیم سازوکارهای هورمونی و مسیر سیگنالی گلوکاگون کد می‌شدند. نتایج این پژوهش، می‌تواند زمینه‌ساز معرفی ترانسکریپت‌های کلیدی دخیل در سازوکارهای تنظیم ژنی مرتبط با میزان حساسیت و یا مقاومت به ورم‌پستان گاوی ناشی از گونه‌های پروتوتکا برای راهبردهای اصلاح‌نژادی باشد.

استاد: غفوری، فرزاد؛ صادقی، مصطفی؛ میرائی آشتیانی، سیدرضا؛ ویلدریک بارکما، هرمان و شیرعلی، مسعود (۱۴۰۵). شناسایی ماژول‌های هم‌بیان کلیدی و مسیرهای عملکردی مرتبط با ورم‌پستان گاوهای شیری ناشی از گونه‌های پروتوتکا از طریق رویکرد ادغام کاربردی تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۲ (۳)، ۴۴۵-۴۷۱. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.410169.654126>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.410169.654126>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

ورم‌پستان یکی از شناخته شده‌ترین مشکلات موجود در گله‌های گاو شیری کشورهای مختلف می‌باشد که معمولاً در پاسخ به نفوذ طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به غده پستانی، عفونت‌های داخل پستانی (IMI) بروز و در نتیجه باعث تسریع فرآیندهای التهابی می‌شود (Ghafouri et al., 2025). این بیماری علاوه بر تحت تأثیر قرار دادن رفاه و آسایش دام، منجر به زیان‌های اقتصادی قابل توجهی بر دامداران با کاهش نسبت درآمد به هزینه از طریق کاهش میزان تولید شیر و صفات ترکیبات شیر (مانند تولید و درصد چربی و پروتئین)، افزایش هزینه‌های درمانی دامپزشکی و حذف دام به علت ورم‌پستان‌های غیرقابل درمان می‌شود؛ بنابراین حفظ سلامت سیستم پستانی گاوهای شیری از اهمیت بالایی برخوردار است (Asselstine et al., 2019; Naserkheil et al., 2022). این در حالی است که میزان زیان اقتصادی ناشی از ابتلا به ورم‌پستان در ایالات متحده آمریکا برای ۳۰ روز اول شیردهی ۴۴۴ دلار به ازای هر رأس گاو (Rollin et al., 2015)، در تایلند ۵۵۷ دلار به ازای هر رأس در سه ماه (Dejyong et al., 2022)، در کانادا ۳۸۶ تا ۷۷۹ دلار به ازای هر رأس گاو در سال (Puerto et al., 2021)، در چین از ۱۵۰۰۰ تا ۷۶۰۰۰ دلار به ازای گله در ماه (He et al., 2020) و در مکزیک در سال ۲۰۲۵ چیزی بالغ بر ۰/۲۴۸ تا ۱/۲۵۳ دلار آمریکا در روز به ازای هر رأس گاو بوده است (Aparicio-Roque et al., 2025).

ورم‌پستان به دو فرم بالینی (تشخیص از طریق کاهش تولید شیر، تغییر ترکیب و ظاهر شیر و مشاهده التهاب کارتیه مبتلا) و تحت بالینی (تشخیص از طریق افزایش شمار سلول‌های سوماتیک (SCC^۲) ناشی از تکثیر و مهاجرت سلول‌های ایمنی به درون پستان) بروز می‌کند (Bradley, 2002; Abebe et al., 2016). به طور معمول، ورم‌پستان توسط عفونت‌های باکتریایی ایجاد می‌شود؛ به گونه‌ای که *اشرشیا کلی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه*، *استرپتوکوکوس اوبریس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، گونه‌های *کلبسیلا* و *استافیلوکوک‌های غیر اورئوس* از شایع‌ترین پاتوژن‌های اصلی^۱ پستان محسوب می‌شوند (Al-Harbi et al., 2021). در دو دهه اخیر، میکروجلبک‌های پروتوتکا^۵ به عنوان عوامل ایجادکننده بیماری نادر مرتبط با ورم‌پستان گاوی مورد پژوهش قرار گرفته‌اند. این میکروجلبک‌ها مهاجم‌هایی پنهان کار و مخرب به شمار می‌روند؛ به گونه‌ای که به طور خاص شیوع این میکروارگانیسم به عنوان یک پاتوژن نوظهور در گله‌های گاو شیری به طور پیوسته افزایش یافته و با توجه به مقاومت ذاتی آن‌ها به درمان‌های ضد میکروبی (قادر به فرار از ایمنی میزبان با بقا در فاگوسیتوز ماکروفاژ هستند) تشخیص عفونت ناشی از این پاتوژن بسیار سخت است و اغلب نادیده گرفته می‌شود (Jagielski et al., 2017; Jagielski et al., 2019; Shave et al., 2021). با توجه به این که هیچ درمانی با کارایی مطلوب علیه این پاتوژن وجود ندارد، عفونت غده پستانی ناشی از آن غالباً به صورت مزمن و با شمارش سلول‌های سوماتیک شیر بسیار بالا به طور همزمان در میان گاوهای شیری گله بروز می‌کند (Jagielski & Lagneau, 2007; Jagielski et al., 2017). با توجه به این که روش‌های تشخیصی قابل اتکا و درمان مؤثری علیه این میکروارگانیسم تاکنون شناخته نشده است، علاوه بر تدوین دستورالعمل‌ها و برنامه‌های مدیریتی و بهداشتی در سطح گله لازم است که مطالعات مختلفی جهت شناسایی عوامل ژنتیکی دخیل (به ویژه مکانیسم‌های تنظیم ژنی و مسیرهای عملکردی) در ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا انجام شود.

در این راستا، توالی‌یابی^۱ RNA و بررسی پروفایل‌های ترانسکریپتومی به عنوان یک ابزار مناسب برای بررسی تعاملات پیچیده میان میزبان-پاتوژن مورد نیاز است. در چند سال اخیر، مطالعات محدودی جهت بررسی عوامل ژنتیکی دخیل در این بیماری

1 Intramammary infections

2 Somatic Cell Count

3 *Escherichia coli*4 *Streptococcus agalactiae*5 *Streptococcus dysgalactiae*6 *Streptococcus uberis*7 *Staphylococcus aureus*8 *Klebsiella*

9 Non-aureus staphylococci

10 *Prototheca spp.*

1 RNA-Seq

صورت گرفته است. تعدادی از ژن‌های کلیدی بالقوه مرتبط با ورم‌پستان ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی همچون *CSN3*، *CSN2*، *PTX3*، *PDGFD*، *STAB2*، *MAST3*، *NFKBIA*، *SDS*، *FCER1G*، *BoLA-DRA*، *GLYCAM1*، *CD74*، *B2M*، *BIRC3*، *FYN*، *NFKBIZ*، *GRO1*، *IL16*، *CXCR1*، *IL1RN*، *MMP9* معرفی و مسیرهای متابولیکی سیگنالی مرتبط با آن‌ها که به طور عمده در فرآیندهای التهابی و پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان برای پاتوژن‌های باکتریایی نقش دارند، در قالب مطالعات پویش کل ژنوم (GWAS^۱) و تجزیه و تحلیل‌های پروفایل‌های ترانسکریپتومی مختلف صورت گرفته است (Welderufael et al., 2018; Asselstine et al., 2019; Bakhtiarizadeh et al., 2020; Naserkheil et al., 2022). این در حالی است که مطالعات و داده‌های انجام شده روی پروفایل‌های ترانسکریپتومی مرتبط با ورم‌پستان ناشی از پروتوتکا بسیار محدود است. Bisutti و همکاران (۲۰۲۳) در پژوهشی با استفاده از داده‌های RNA-Seq نمونه‌های سوماتیک شیر، به بررسی سازوکارهای مولکولی مرتبط با پاسخ ایمنی میزبان در گاوهای هلشتاین پرداخته‌اند. پس از شناسایی ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار و تجزیه و تحلیل‌های مسیر اختصاصی پاتوژن گزارش کرده‌اند که عفونت ناشی از گونه‌های پروتوتکا فعالیت مسیرهای پردازش آنتی‌ژن و تکثیر لنفوسیت‌ها را افزایش می‌دهند و به طور عمده در مسیرهای مرتبط با پاسخ‌های ایمنی و التهابی درگیر هستند (Bisutti et al., 2023). همچنین گزارش شده است که واریانت‌های عملکردی در مناطق هم‌پوشان با ترانسکریپت‌های کدشده توسط *CSN1S1*، *KRT78* و *MYBPC1* شناسایی شده‌اند؛ به گونه‌ای که در گروه ورم‌پستان نسبت به سالم کاهش بیان معنی‌دار از خود نشان داده‌اند و احتمالاً با ویژگی‌های مقاومت و یا حساسیت به ورم‌پستان مرتبط هستند (Vanzin et al., 2025). بنابراین مطالعات انجام شده بیشتر روی شناسایی ژن‌ها یا mRNAها و مسیرهای متابولیکی مرتبط با ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا به صورت محدود متمرکز بوده‌اند.

از طرف دیگر، تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای امکان شناسایی ژن‌ها و RNAهای غیرکدکننده (مانند miRNAها) دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین نمونه‌های سالم و مبتلا به ورم‌پستان را فراهم می‌سازد. miRNAها نوعی RNA غیرکدکننده کوتاه هستند که معمولاً شامل ۲۰-۲۲ نوکلئوتید می‌باشند (Ghafouri et al., 2024a). این مولکول‌ها بخشی از کمپلکس چند پروتئینی به نام کمپلکس خاموش‌سازی القا شده توسط RNA (RISC^۲) می‌شوند که مسئول هدف‌گیری ترانسکریپت‌های خاص هستند؛ miRNAها می‌توانند ترجمه ترانسکریپت‌ها را کنترل کنند و با سایر RNAهای غیرکدکننده در سلول رقابت داشته باشند (Catalanotto et al., 2016). از سوی دیگر، داده‌های بیان ژن می‌توانند برای ساخت شبکه‌های هم‌بیان ژنی با استفاده از رویکرد سیستم بیولوژی به منظور درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی درگیر در بیماری‌های پیچیده مانند ورم‌پستان استفاده شوند (Nielen et al., 1995). فرض اصلی زیربنای این نوع شبکه‌ها و ماژول‌های عملکردی مرتبط با آن‌ها این است که ژن‌های به شدت هم‌بیان شده احتمالاً ارتباط عملکردی معنی‌داری با هم دارند که از طریق روش تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار (WGCNA) امکان‌پذیر می‌باشد (Langfelder & Horvath, 2008). تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار تفاوت‌های پاسخ نمونه‌ها در نقاط زمانی مختلف را با خوشه‌بندی ژن‌ها به ماژول‌های مشخص براساس الگوهای همبستگی بیان بین ژن‌ها در سطح نمونه‌ها در نظر می‌گیرد و در نهایت منجر به شناسایی ماژول‌های معنی‌دار مرتبط با صفت مورد نظر می‌گردد و غالباً برای برجسته کردن شبکه‌های ژنی کلیدی و ژن‌های هاب مرتبط استفاده می‌شود (Bakhtiarizadeh et al., 2018; Dehghanian et al., 2022). از طرف دیگر، تجزیه و تحلیل شبکه‌های تعاملی پروتئین-پروتئین (PPI^۴) و ادغام با شبکه‌های تنظیم ژنی (mRNA-ncRNA) جهت بازسازی شبکه‌های چندبخشی برهم‌کنشی می‌تواند دیدگاه جامعی از لایه‌های مختلف تنظیمی را ارائه دهد (Naserkheil et al., 2022; Ghafouri et al., 2024b).

با توجه به افزایش موارد ابتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا، نبود ابزارهای تشخیصی قابل اتکا و روش‌های درمانی مؤثر و همچنین مطالعات محدود در مورد الگوهای بیان ژن ضروری است که مطالعات عملکردی بیشتری در این راستا انجام شود. بنابراین، با توجه به این که تاکنون مطالعات مرتبط با ماژول‌های هم‌بیان و بازسازی شبکه‌های تنظیمی دویبخشی برهم‌کنشی

1 Genome-Wide Association Studies

2 RNA Induced Silencing Complex

3 Weighted Gene Co-expression Network Analysis

4 Protein-Protein Interactions

مرتبط جهت شناسایی سازوکارهای تنظیم ژنی مرتبط با این نوع پاتوژن روی نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر انجام نشده است؛ هدف از ارائه این پژوهش، بررسی جامع پاسخ پروفایل‌های ترانسکریپتومی نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر به عفونت ناشی از گونه‌های پروتوتکا (*Prototheca spp.*) با استفاده از رویکرد ادغام چند لایه‌ای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای داده‌های RNA-Seq (ترانسکریپتوم مقایسه‌ای)، تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار، شبکه‌های تنظیمی دوبخشی miRNA-mRNA جهت شناسایی ماژول‌های هم‌بیان هاب و ترانسکریپت‌های درگیر در آن‌ها، مسیرهای عملکردی و همچنین ارائه بینش‌های تکمیلی در مورد مبنای ژنتیکی ورم‌پستان گاوه‌های شیری هلشتاین است که می‌تواند در آینده به راهبردهای اصلاح‌نژادی برای انتخاب گاوه‌های مقاوم به عنوان والدین نسل آینده کمک نماید.

پیشینه پژوهش

عفونت داخل پستانی مرتبط با ورم‌پستان تحت بالینی موضوع مهمی در رابطه با سلامت گاوه‌های شیری است که میزان شدت آن به تعامل بین عوامل بیماری‌زا، محیط و میزبان بستگی دارد. Bisutti و همکاران (۲۰۲۳) پژوهشی جهت بررسی و شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با پاسخ ایمنی میزبان، پروفایل‌های ترانسکریپتومی نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا، استرپتوکوکوس آگلاکتیه و نمونه‌های سالم انجام داده‌اند. آن‌ها در مجموع ۱۶۸۲ و ۲۴۲۷ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار به ترتیب در مقایسه نمونه‌های پروتوتکا و استرپتوکوکوس آگلاکتیه با حیوانات سالم شناسایی کردند. تجزیه و تحلیل‌های اختصاصی مرتبط با پاتوژن‌ها نشان داد که عفونت ناشی از پروتوتکا فعالیت مسیرهای پردازش آنتی‌ژن و تکثیر لنفوسیت را افزایش و عفونت ناشی از استرپتوکوکوس آگلاکتیه مسیرهای عملکردی مرتبط با انرژی شامل چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک، متابولیسم کربوهیدرات و لیپید را کاهش داده است. با وجود تفاوت در مسیرهای شناسایی شده مرتبط با ورم‌پستان ناشی از پاتوژن‌ها، هر دو پاتوژن پاسخ ایمنی-ترانسکریپتومی مشترک میزبان را القا می‌کنند.

تجزیه و تحلیل‌های مرتبط با شناسایی ایزوفرم‌های مختلف mRNA می‌تواند مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با مقاومت یا حساسیت به بیماری‌هایی مانند ورم‌پستان را تحت تأثیر قرار دهد. Vanzin و همکاران (۲۰۲۵)، پژوهشی با هدف تجزیه و تحلیل پروفایل‌های ترانسکریپتومی، با تمرکز بر مواردی که چندین ایزوفرم mRNA برای آن‌ها وجود دارد، روی نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر گاوه‌های هلشتاین مبتلا به ورم‌پستان تحت بالینی ناشی از گونه‌های پروتوتکا، استرپتوکوکوس آگلاکتیه و نمونه‌های سالم انجام دادند. در مقایسه نمونه‌های ورم‌پستانی ناشی از گونه‌های پروتوتکا با نمونه‌های سالم، ۲۷ ترانسکریپت دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شد که مسیرهای مرتبط با سیستم ایمنی و پاسخ‌های التهابی شامل مسیرهای آنتی ژن‌ها به ویژه MHC کلاس II و مسیرهای سیگنالی فعال‌سازی کلاسیک ماکروفاژ را کد می‌کردند. همچنین در مقایسه نمونه‌های ورم‌پستانی ناشی از استرپتوکوکوس آگلاکتیه با نمونه‌های سالم، ۲۶ ترانسکریپت دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شد که در مسیرهای مرتبط با متابولیسم و فرآیندهای گلوکوتایون درگیر بودند. از طرفی دیگر، واریانت‌های عملکردی در مناطقی که با ترانسکریپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار کد شده بودند با ژن‌های *KRT78*، *CSN1S1* و *MYBPC1* همپوشانی داشتند، شناسایی شده بودند. این ژن‌ها در گروه مقایسه‌ای نمونه‌های ورم‌پستانی ناشی از گونه‌های پروتوتکا با نمونه‌های سالم کاهش بیان معنی‌دار از خود نشان داده بودند و طور بالقوه با ویژگی‌های مقاومت/حساسیت به ورم‌پستان مرتبط هستند. بنابراین، ترانسکریپت‌ها و واریانت‌های عملکردی شناسایی شده می‌توانند درک بهتری از پاتوژن ورم‌پستان گاوه‌های شیری فراهم کنند و بینش‌های کاربردی برای بهبود سلامت و مدیریت حیوانات ارائه دهند.

در مطالعه Pegolo و همکاران (۲۰۲۲)، ارتباط بین عفونت داخل پستانی تحت بالینی طبیعی ناشی از استرپتوکوکوس آگلاکتیه و پروتوتکا و شمارش سلول‌های شیر ارزیابی شده به وسیله تجزیه و تحلیل سیتوفلوریمتریک در گاوه‌های هلشتاین بررسی شد. پس از غربالگری باکتریولوژیک اولیه روی ۱۸۸ رأس گاو و ارزیابی مجدد ۲ هفته بعد برای تأیید وضعیت باکتریولوژیک، نمونه‌های شیر از ۴۷ رأس گاو جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل‌های عملکردی همچون ترکیب شیر، شمارش سلول‌های سوماتیک شیر، شمارش تفاضلی سلول‌های سوماتیک و سیتوفلوریمتریک انجام شده بود. وضعیت باکتریولوژیک به طور معنی‌دار بر پارامترهای مورد پژوهش

روشناسی پژوهش

جمع آوری داده‌ها و شرایط ورود به طرح

داده‌های مرتبط با کد دسترسی PRJNA911953 از پایگاه داده مرکز ملی برای اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، زیر بخش پروژه‌های زیستی شناسایی و استخراج شدند. مطابق با پژوهش‌های پیشین منتشرشده بر اساس همین کد دسترسی (Pegolo et al., 2025; *al.*, 2022; Bisutti et al., 2023; Vanzin et al., 2025)، ۲۰ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین در محدوده سنی ۳ تا ۷ سال، در بازه زمانی ۹۸ تا ۴۴۸ روز شیردهی (DIM^6) از یک گله تجاری ۴۵۰ رأسی در منطقه ونتو (ایتالیا) انتخاب شده بودند. شرایط ورود به طرح شامل نبود علائم بالینی عفونت، عدم دریافت آنتی‌بیوتیک یا داروی ضدالتهاب پیش از پژوهش، بیش از یک شکم زایش، غیرآیستن بودن و داشتن بیش از ۹۸ روز شیردهی بوده است. غربالگری اولیه باکتریولوژیک بر روی ۱۸۸ رأس انجام شده بود تا دام‌های سالم و مبتلا به ورم‌پستان تحت‌بالینی ناشی از گونه‌های پروتوتکا شناسایی گردند. گاوهای گروه کنترل هیچ سابقه‌ای از ابتلا به ورم‌پستان نداشتند و تمام دام‌ها تحت شرایط مدیریتی و محیطی یکسان نگهداری شده بودند. پروژه با تأیید کمیته اخلاق و مراقبت از حیوانات ($OPBA^8$) دانشگاه کاتولیک دل ساکرو کوئوره و وزارت بهداشت ایتالیا (شماره پروتکل PR2019/510 مورخ ۱۹ ژوئیه ۲۰۱۹) انجام شده بود. جزئیات مربوط به جمع‌آوری نمونه‌های شیر، آنالیزهای میکروبیولوژیکی، ترکیبات شیر، فلوسایتومتری، استخراج RNA، آماده‌سازی کتابخانه و تهیه پروفایل‌های ترانسکریپتومی در پژوهش‌های Pegolo و همکاران (۲۰۲۲)، Bisutti و همکاران (۲۰۲۳) و Vanzin و همکاران (۲۰۲۵) گزارش شده است. از میان داده‌های ترانسکریپتومی موجود در کد دسترسی PRJNA911953، تعداد ۲۰ داده (۱۱ نمونه مبتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا و ۹ نمونه سالم) برای پژوهش حاضر مورد استفاده قرار گرفت. این پژوهش بیوانفورماتیکی، به طور متفاوت از پژوهش‌های اصلی منتشر شده (Pegolo et al., 2025; *et al.*, 2022; Bisutti et al., 2023; Vanzin et al., 2025) و متناسب با اهداف تعیین شده، به عنوان یکی از محدود پژوهش‌هایی است که در آن از رویکرد ادغام خروجی‌های حاصل از تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم مقایسه‌ای، روش شبکه هم‌بینایی ژنی وزن‌دار، شبکه‌های تنظیمی دوبخشی mRNA-miRNA جهت شناسایی ماژول‌های هم‌بند هاب، ژن‌ها و miRNAهای هاب، مسیرهای عملکردی و سازوکارهای تنظیم ژنی درگیر در ورم‌پستان گاوهای شیری ناشی از گونه‌های پروتوتکا بهره گرفته شده است.

Polymorphonuclear Neutrophil (PMN)-Lymphocyte (LYM)

Polymorphonuclear Neutrophil

3T-helper lymphocytes

4National Center for Biotechnology Information

Bio Projects

6Days In Milk

Veneto

8Organismo Preposto Al Benessere Degli Animali

Università Cattolica Del Sacro Cuore

تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای

در مرحله اول، کیفیت داده‌های خام نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان و سالم با استفاده از نرم‌افزار FastQC (نسخه ۰.۷۴) مورد ارزیابی قرار گرفت (Andrew, 2010). پس از ارزیابی کیفیت داده‌ها و خروجی‌های حاصل، از نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰.۳۹) برای فیلتر کردن توالی‌های آداپتور و خوانش‌های با کیفیت پایین استفاده شد (Bolger et al., 2014). سپس خوانش‌های ویرایش شده دوباره با استفاده از نرم‌افزار FastQC بررسی شدند. پس از تأیید کیفیت داده‌های پردازش شده، خوانش‌های نهایی با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 (نسخه ۲.۲.۱) با ژنوم مرجع گاوی (https://ftp.ensembl.org/pub/release-115/fasta/bos_taurus/dna) هم‌ردیف شدند (Kim et al., 2015). در ادامه، به منظور کمی‌سازی سطح بیان ژن خوانش‌های هم‌ردیف شده در فایل‌های BAM با استفاده از نرم‌افزار featureCounts (نسخه ۲.۱.۱) شمارش شدند (Liao et al., 2014). در نهایت پس از تشکیل ماتریس شمارش ژن در سطح نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار DESeq2 (نسخه ۲.۱۱.۴۰.۸) ترانسکریپت‌های mRNA و miRNA (های) دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو گروه مقایسه‌ای مبتلا به ورم‌پستان و سالم استخراج شدند (Love et al., 2014).

آماده‌سازی و کنترل کیفیت داده‌ها

در ابتدا برای آماده‌سازی فایل‌های ورودی، از نرم‌افزار featureCounts (نسخه ۲.۱.۱) برای شمارش خوانش‌های RNA-Seq هم‌ردیف شده با ویژگی‌های ژنومی (gene_id؛ exon) با استفاده از فایل حاشیه‌نویسی GTF گونه *Bos taurus* استفاده شد و ماتریس حاوی شمارش خام ژن‌های مرتبط با نمونه‌ها تهیه گردید. برای حذف ژن‌های با بیان بسیار کم و نویز، ژن‌هایی که تعداد Reads آن‌ها در بیش از ۸۰ درصد نمونه‌ها کمتر از ۱۰ بود، حذف شدند. سپس نرمال‌سازی Variance Stabilizing Transformation (VST) با استفاده از تابع `vst(blind=TRUE)` از بسته DESeq2 (Love et al., 2014) برای پایدارسازی واریانس و آماده‌سازی داده‌ها برای تجزیه و تحلیل‌های روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار (WGCNA) انجام شد. در ادامه، صفات فنوتیپی Mastitis و Healthy با نمونه‌های VST هم‌ردیف شدند. همچنین کنترل کیفیت شامل خوشه‌بندی دندروگرام نمونه‌ها با `hclust(dist(), method="average")` برای شناسایی outliarهای احتمالی و اجرای تابع `goodSamplesGenes` برای حذف ژن‌های صفر و نمونه‌های دارای مقادیر گمشده بیش از حد بود (Kolde and Vilo, 2015). سپس، کنترل کیفیت داده‌ها همچون تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای جداسازی گروه‌های فنوتیپی، `boxplot` توزیع نرمال‌سازی شده بیان (Wickham, 2016)، نمودار آتش‌فشانی ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار با معیارهای `log2FC` و `FDR`، و نمودار `circos` کروموزومی برای نمایش موقعیت ترانسکریپت‌های معنی‌دار انجام شد (Gu et al., 2014). در این راستا، کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از بسته‌های تخصصی نرم‌افزار R انجام شد: `pheatmap` نقشه حرارتی و دندروگرام خوشه‌بندی نمونه‌ها ترسیم و نمونه‌های پرت (outlier) شناسایی شدند (Kolde and Vilo, 2015). با `ggplot2` نمودار جعبه‌ای توزیع بیان نرمال‌شده و نمودار آتش‌فشانی ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار ترسیم گردید (Wickham, 2016). با استفاده از `circize` نمودار دایره‌ای کروموزومی برای نمایش موقعیت ترانسکریپت‌های معنی‌دار رسم شد (Gu et al., 2014). در نهایت، همگنی نمونه‌ها، عدم وجود `batch effect` و کیفیت بالای داده‌ها برای تجزیه و تحلیل روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار تأیید گردید (Langfelder and Horvath, 2008).

تجزیه و تحلیل روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار

برای تجزیه و تحلیل شبکه از دستورالعمل بسته WGCNA در محیط برنامه R استفاده شد (Langfelder and Horvath, 2008). برای انتخاب آستانه نرم، تابع `pickSoftThreshold` با توان‌های ۱-۲۰ و `networkType="signed"` اجرا شد و توان بهینه $\beta=19$ براساس دستیابی به توپولوژی بدون مقیاس مناسب (R^2) بالاتر از 0.80 و منحنی $Mean\ connectivity^3$ انتخاب

گردید. شبکه هم‌بیان وزن‌دار با محاسبه ماتریس مجاورت ($\text{adjacency}(\text{power}=19, \text{type}=\text{"signed"})$) و ماتریس هم‌پوشانی توپولوژیک^۲ ($\text{TOMType}=\text{"signed"}$) با استفاده از تابع TOMsimilarity ساخته شد؛ خوشه‌بندی ژن‌ها براساس ماتریس عدم شباهت TOM-1 با $\text{hclust}(\text{method}=\text{"average"})$ و تشخیص خودکار ماژول‌ها با $\text{cutreeDynamic}(\text{deepSplit}=2)$ ، $\text{pamRespectsDendro}=\text{FALSE}$ ، $\text{minModuleSize}=30$ انجام شد. با توجه به تعداد ژن‌های وارد شده به تجزیه و تحلیل، تمام ژن‌ها در یک بلوک پردازش شدند و نیازی به تعیین دستی پارامتر maxBlockSize نبود. ماژول‌های مشابه با محاسبه moduleEigengenes و $\text{mergeCloseModules}(\text{cutHeight}=0.25)$ براساس شباهت eigengenes ادغام شدند. در نهایت، eigengenes ماژول‌ها با صفات Mastitis و Healthy همبسته شدند (cor)، سپس مقادیر p-value با corPvalueStudent محاسبه شد و نقشه حرارتی همبستگی ماژول-صفت با $\text{labeledHeatmap}(\text{blueWhiteRed color scheme}, \text{zlim}=\text{c}(-1,1))$ ترسیم گردید.

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی و حاشیه‌نویسی ژن‌ها

برای درک بهتر مکانیسم‌های عملکردی مرتبط با ژن‌های مشترک شناسایی شده بین خروجی‌های تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار در ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی حاشیه‌نویسی ژن‌ها (GO) شامل فرآیندهای زیستی، عملکردهای مولکولی، اجزای سلولی و همچنین مسیرهای سیگنالی مرتبط با استفاده از وب‌سایت آنالین DAVID (<https://davidbioinformatics.nih.gov>) و پایگاه داده STRING (<https://string-db.org>) با در نظر گرفتن $\text{FDR}<0.05$ براساس روش Benjamini-Hochberg انجام شد.

بازسازی شبکه‌های تنظیمی دوبخشی miRNA-mRNA

در ابتدا به منظور بررسی تعاملات بین ژن‌ها، از پایگاه داده آنالین STRING جهت شناسایی اثرات متقابل پروتئین-پروتئین استفاده گردید (Szkarczyk et al., 2019). سپس جهت شناسایی تعاملات بین mRNA‌های هدف و miRNA‌های شناسایی شده از دو پایگاه داده آنالین TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80) و miWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) بهره گرفته شد. در این راستا، پس از شناسایی ژن‌های مشترک دارای تفاوت بیان معنی‌دار و ماژول‌های هم‌بیان ژنی، تعاملات پروتئین-پروتئین و همچنین شبکه تنظیم ژنی (GRN^4) مرتبط ترسیم شدند. برای درک بهتر سازوکارهای تنظیمی مرتبط با ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا، مدل شبکه تنظیمی mRNA-ncRNA به عنوان چارچوب کلی در نظر گرفته شد. در این راستا، براساس تعاملات پروتئین-پروتئین و تعاملات بین ژن‌های هدف و miRNA‌ها برای تجزیه و تحلیل ارتباطات مولکولی و نحوه تنظیم میزان بیان ژن‌های معنی‌دار در گونه گاو (*Bos taurus*)، شبکه تنظیمی دوبخشی miRNA-mRNA با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳,۱۰,۴) بازسازی گردید (Shannon et al., 2003). در ادامه در شبکه‌های تنظیمی دوبخشی بازسازی شده، ترانسکریپت‌های هاب (mRNAها و miRNAهای) براساس تعاملات در شبکه یا درجه مرکزی شناسایی و معرفی شدند.

یافته‌های پژوهش و بحث

تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای

در این پژوهش، الگوی بیان ژنی در سلول‌های سوماتیک شیر گاوه‌های شیری هلشتاین بین نمونه‌های دو گروه از گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا و گاوه‌های سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل بهتر و امکان مقایسه ماژول‌های حاصل از تجزیه و تحلیل روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار، ژن‌های دارای افزایش بیان و ژن‌های دارای افزایش بیان به صورت دو لیست جداگانه تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

1Adjacency Matrix

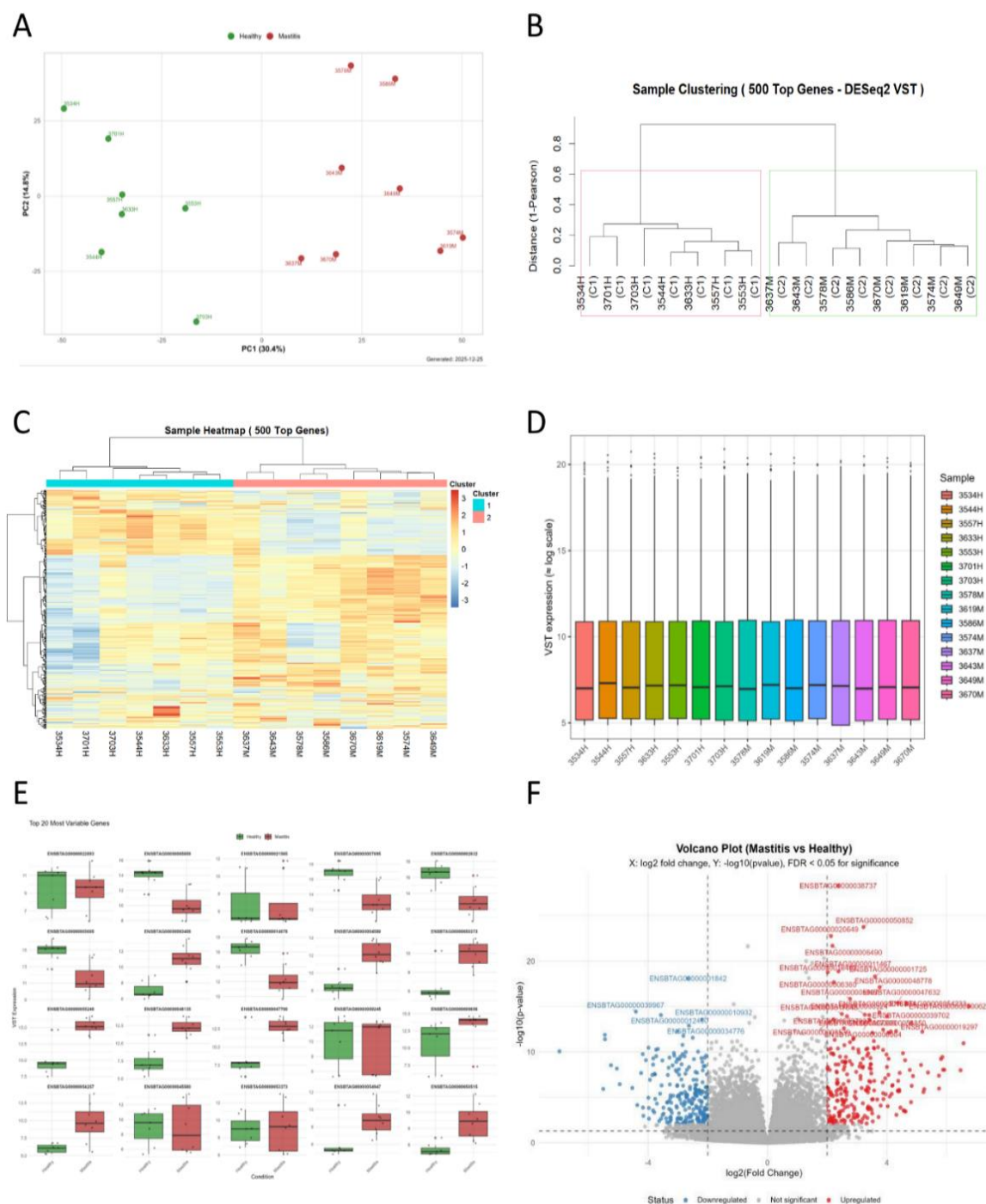
2Topological Overlap Matrix

3Heatmap

4Gene Regulatory Network

5Degree Centrality

شکل (۱) کیفیت بالای داده‌های RNA-Seq و تفکیک معنی‌دار گروه‌های فنوتیپی (مبتلا به ورم‌پستان و سالم) را نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) جداسازی کامل نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان (دایره‌های قرمز) و نمونه‌های سالم (دایره‌های سبز) را تأیید می‌کند (شکل A-۱). لازم به ذکر است که پس از انجام تجزیه و تحلیل‌های اولیه و ترسیم نمودار PCA برای ۲۰ نمونه مورد نظر، ۵ نمونه (۳ نمونه مبتلا به ورم‌پستان و ۲ نمونه سالم) به عنوان نمونه‌های پرت (outlier) شناسایی و حذف شدند، زیرا فاصله آن‌ها از سایر نمونه‌های گروه خود که نشان‌دهنده کیفیت پایین یا خطای تکنیکال بود می‌توانست نتایج نهایی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین تعداد نمونه‌های مورد استفاده برای انجام تجزیه و تحلیل‌های انجام شده به ۸ نمونه مبتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا و ۷ نمونه سالم کاهش یافت. دندروگرام خوشه‌ای سلسله‌مراتبی با ۵۰۰ ترانسکرپت با بیشترین واریانس تفکیک کامل گروه‌ها را بدون outlier نشان می‌دهد (شکل B-۱). از طرف دیگر، نقشه حرارتی الگوهای هم‌بیان قوی را نمایش داده و سایه‌های قرمز (بیان بالا) و آبی (بیان پایین) را مشخص می‌کند (شکل C-۱). Boxplot توزیع VST همگنی کامل نمونه‌ها را اثبات می‌نماید (شکل D-۱). همچنین ۲۰ ترانسکرپت دارای بالاترین واریانس بین دو گروه مقایسه‌ای با مقیاس VST نشان داده شده است که در آن هر بخش مربوط به یک ترانسکرپت مشخص است. در این راستا، الگوهای تفاوت‌های معنی‌دار ترانسکرپت‌ها بین دو گروه ورم‌پستان و سالم به صورت کامل مشاهده می‌شود که واریانس بالا و قدرت تفکیک داده‌ها را تأیید می‌کند (شکل E-۱). نمودار آتش‌فشانی ترانسکرپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار را با در نظر گرفتن حد آستانه $|\log_2 FC| > 2$ ، $FDR < 0.05$ نشان می‌دهد (شکل F-۱). در ادامه پس از تأیید کنترل کیفیت داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها برای شناسایی ترانسکرپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار انجام شد؛ به گونه‌ای که در مجموع ۶۷۲۶ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) شناسایی گردید. با توجه به حد آستانه تعریف شده ($\log_2 \text{fold change (FC)} \geq 2$ and ≤ -2 ، and an) ۱۱۹ mRNA، ۵ miRNA و ۴ lncRNA دارای افزایش بیان و ۱۸۱ mRNA، ۹ miRNA و ۱۰ lncRNA دارای کاهش بیان معنی‌دار بین دو گروه از گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان و گاوه‌های سالم مربوط به کد دسترسی PRJNA911953 از خود نشان دادند. تمامی miRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناخته شده هستند و در پایگاه‌های داده برای آن‌ها نام مشخصی وجود دارد (جدول ۱)، اما lncRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شده جدید بودند و در پایگاه‌های داده موجود نام مشخصی برای آن‌ها وجود ندارد و تنها شناسه ترانسکرپت آن‌ها به همراه موقعیت آن‌ها روی ژنوم ذکر شده است (جدول ۲). بدون شک این lncRNAها با توجه به میزان تفاوت بیان معنی‌داری که دارند، با سایر RNAهای غیرکدکننده درگیر در ورم‌پستان نقش رقابتی در سلول‌های بافت پستان ایفا می‌کنند تا میزان بیان ژن‌های هاب را متناسب با شرایط تنظیم کنند. در این راستا، نیاز به انجام مطالعات بیشتری می‌باشد که به طور عملکردی نقش آن‌ها را در این فرآیند اثبات کنند.



شکل ۱. کیفیت داده‌های RNA-Seq و الگوهای دارای تفاوت بیان را نشان می‌دهد. (A) تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) تفکیک گروه‌های مبتلا به ورم‌پستان (قرمز) و سالم (سبز) را براساس میزان بیان ترانسکرپت‌ها تأیید می‌کند. (B) دندروگرام خوشه‌ای سلسله مراتبی نمونه‌ها با ۵۰۰ ترانسکرپت دارای تفاوت بیان معنی‌دار تفکیک کامل گروه‌ها را اثبات می‌کند. (C) نقشه حرارتی الگوهای هم‌بیان را نمایش داده و سایه‌های قرمز (افزایش بیان) و آبی (کاهش بیان) را نشان می‌دهد. (D) Boxplot با توزیع نرمال‌سازی شده VST همگنی بیان بین نمونه‌ها را نشان می‌دهد. (E) Boxplot از ۲۰ ترانسکرپت دارای بالاترین واریانس بین دو گروه ورم‌پستان و سالم را با مقیاس VST نشان داده شده است. (F) نمودار آتش‌فشانی ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار با $\log_2FC > 2$ و $FDR < 0.05$ شناسایی کرده است.

Figure 1. Quality of RNA-Seq data and differential expression patterns. (A) Principal component analysis (PCA) confirms the separation of mastitis-affected (red) and healthy (green) groups based on transcript expression levels. (B) The hierarchical clustering dendrogram of samples based on 500 significantly differentially expressed transcripts demonstrates complete separation of the groups. (C) The heatmap displays co-expression patterns and shows red shading (upregulation) and blue shading (downregulation). (D) The boxplot with the variance-stabilizing transformation (VST)-normalized distribution shows homogeneity of expression among samples. (E) The boxplot of the 20 transcripts with the highest variance between the mastitis and healthy groups is shown on the VST scale. (F) The volcano plot identifies significantly differentially expressed genes with $\log_2FC > 2$ and false discovery rate (FDR) < 0.05.

جدول ۱. miRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شده بین دو گروه نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر مبتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا و سالم در گاوهای شیری هلشتاین.

Table 1. Significantly differentially expressed miRNAs identified between two groups of milk somatic cell samples from Holstein dairy cows: those with mastitis caused by *Prototheca* spp. and healthy samples.

miRNA name	Chromosome	miRNA start (bp)	miRNA end (bp)	Fold Change	Up/Down Regulation	p_value	FDR
bta-miR-2462	7	80356568	80356636	-2.5582	Down	0.0011	0.0107
bta-miR-12001	5	109644749	109644808	-1.8146	Down	0.0051	0.0327
bta-miR-11981	26	32727287	32727356	-1.6839	Down	0.0032	0.0234
bta-miR-146a	7	72071548	72071646	-1.5681	Down	0.0076	0.0441
bta-miR-1434	7	20030713	20030785	-1.5381	Down	0.0053	0.0341
bta-miR-1835	5	75672810	75672872	-1.3583	Down	0.0039	0.0275
bta-miR-34a	16	44308925	44309031	-1.3182	Down	6.80E-07	3.12E-05
bta-miR-2352	2	24156202	24156277	-1.0721	Down	0.0054	0.0345
bta-miR-6524	26	31451966	31452046	1.1015	Up	1.79E-07	1.05E-05
bta-miR-2285am	22	21806576	21806653	1.1179	Up	0.0056	0.0351
bta-miR-2404	29	1089784	1089849	1.5362	Up	0.0068	0.0408
bta-miR-2887	2	121575106	121575162	2.3013	Up	0.0036	0.0257
bta-miR-2887	27	6217555	6217611	5.8095	Up	5.97E-10	8.36E-08

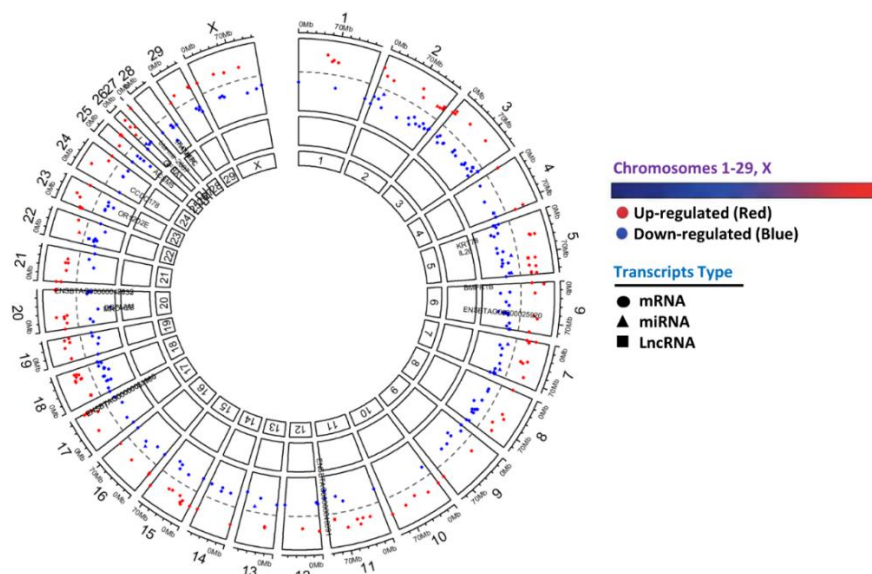
جدول ۲. lncRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شده بین دو گروه نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر مبتلا به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا و سالم در گاوهای شیری هلشتاین.

Table 2. Significantly differentially expressed lncRNAs identified between two groups of milk somatic cell samples from Holstein dairy cows: those with mastitis caused by *Prototheca* spp. and healthy samples.

lncRNA IDs	Chromosome	lncRNA start (bp)	lncRNA end (bp)	Fold Change	Up/Down Regulation	p_value	FDR
ENSBTAG00000048091	11	103237672	103244099	-4.9471	Down	3.59E-07	1.87E-05
ENSBTAG00000050065	20	70031193	70034451	-3.0546	Down	1.26E-09	1.57E-07
ENSBTAG00000053803	28	24209265	24242362	-2.8115	Down	0.0055	0.0349
ENSBTAG00000027341	4	105099902	105101646	-2.3217	Down	0.0017	0.0151
ENSBTAG00000053059	22	13765118	13780782	-2.2223	Down	0.0074	0.0433
ENSBTAG00000053609	7	82850470	82877828	-2.2096	Down	0.0038	0.0269
ENSBTAG00000051207	6	116424941	116427738	-1.7952	Down	0.0028	0.0217
ENSBTAG00000051564	3	107852151	107920485	-1.4771	Down	0.0006	0.0068
ENSBTAG00000053758	22	15126319	15149248	-1.1359	Down	0.0084	0.0476
ENSBTAG00000049314	3	119851899	119863481	-1.1225	Down	0.0018	0.0153
ENSBTAG00000055219	11	89884158	89886970	1.1985	Up	0.0088	0.0489
ENSBTAG00000049639	18	11940991	11943589	1.7145	Up	0.0003	0.0047
ENSBTAG00000048719	5	85456262	85627795	2.0532	Up	0.0028	0.0215
ENSBTAG00000053850	25	25899988	25904843	3.4062	Up	8.52E-15	7.06E-12

نمودار circos موقعیت و پراکندگی ترانسکرپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار (miRNA، mRNA و lncRNA) شناسایی شده را روی کروموزوم‌های گاو نشان می‌دهد (شکل ۲). به طور کلی، بیشترین تعداد ترانسکرپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار روی کروموزوم‌های ۲ و ۵ مشاهده شد (۲۸ ترانسکرپت روی هر کروموزوم). برای mRNAها، کروموزوم‌های ۲، ۵، ۱۸ و ۶ به ترتیب تعداد ۲۶، ۲۵، ۲۳ و ۲۱ mRNA را به خود اختصاص داده بودند. برای miRNAها، بیشترین فراوانی روی کروموزوم‌های ۱۸، ۲، ۵ و ۲۶ بود که به ترتیب شامل ۳، ۲، ۲ و ۲ miRNA بودند. همچنین بیشترین تعداد lncRNAهای دارای تفاوت بیان معنی‌دار روی کروموزوم‌های ۲۲، ۳ و ۱۱ هر کدام با دو lncRNA متمرکز بود. این الگوها فراوانی ترانسکرپت‌ها روی کروموزوم‌ها را نشان می‌دهد؛ به گونه‌ای که برخی کروموزوم‌ها، به‌ویژه کروموزوم‌های ۲ و ۵ به عنوان کروموزوم‌های هاب معنی‌دار برای تنظیم سازوکارهای مولکولی در پاسخ به عفونت‌های داخل پستانی مرتبط با ورم‌پستان هستند. این الگوی ناهمگن توزیع ترانسکرپت‌های دارای بیان نشان می‌دهد که ترانسکرپت‌های معنی‌دار مؤثر در پاسخ به ورم‌پستان به طور یکنواخت در ژنوم پخش نشده و تعدادی از کروموزوم‌ها نقش پررنگ‌تری در تنظیم این بیماری ایفا می‌کنند. تجمع ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار روی کروموزوم‌های ۲ و ۵ با مطالعات پویش کل ژنوم (GWAS^۱) که توسط Tiezzi و همکاران (۲۰۱۵) و Lund و همکاران (۲۰۰۸) درباره کد شدن ژن‌های مرتبط با تنظیم سیستم ایمنی و پاسخ‌های التهابی در این نواحی ژنومی در گاوهای هلشتاین انجام شده است، همخوانی دارد. اگرچه پژوهش‌های مذکور به طور خاص بر روی ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا انجام نشده‌اند، اما همخوانی نتایج

پژوهش حاضر با یافته‌های آن‌ها نشان‌دهنده اعتبار بیولوژیک این کروموزوم‌ها در پاسخ به ورم‌پستان در سطح وسیع‌تری می‌باشد. با توجه به کمبود مطالعات ترانسکریپتومی اختصاصی برای این پاتورن، استفاده از نتایج پژوهش‌های GWAS به عنوان شواهد حمایتی در سطح کروموزومی یک رویکرد پذیرفته‌شده در مطالعات بیوانفورماتیک است.



شکل ۲. نمودار Circos که موقعیت کروموزومی و پراکندگی ترانسکریپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار را در تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای پروفایل‌های ترانسکریپتومی نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان و سالم را در گاوهای هلشتاین نشان می‌دهد.

Figure 2. Circos plot illustrating the chromosomal localization and distribution of significantly differentially expressed transcripts in a comparative analysis of transcriptomic profiles between mastitis-affected and healthy samples in Holstein dairy cows.

تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار

پس از تجزیه و تحلیل پروفایل‌های ترانسکریپتومی مربوط به دو گروه از گاوهای مبتلا به ورم‌پستان و سالم، روی ماتریس حاوی شمارش خام ژن‌ها برای حذف ژن‌هایی که بیان بسیار کمی در بیشتر نمونه‌ها داشتند، در مجموع ۷۰۰ ژن با بالاترین میزان بیان (نه واریانس بین دو گروه) برای ساخت شبکه استخراج شدند. این ارزیابی برای پایدارسازی واریانس و آماده‌سازی داده‌ها برای تجزیه و تحلیل‌های روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار انجام شد.

برای رعایت معیارهای توپولوژی تقریبی بدون مقیاس، آستانه نرم توان بتا روی ۱۹ تنظیم شد که در آن $R^2 > 0.80$ بود. با در نظر گرفتن نمونه‌های گاو ورم‌پستان به عنوان مجموعه مرجع، خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی و رویه‌های برش شاخه پویا منجر به شناسایی ۱۹ ماژول شد. هر کدام از ماژول‌های شناسایی شده به عنوان شاخه‌ای از درخت خوشه‌بندی حاصل با یک رنگ جداگانه برجسته‌گذاری شد؛ به گونه‌ای که اندازه‌های مختلفی را با میانگین ۳۶۸ ژن نشان دادند (شکل ۳). ماژول فیروزه‌ای بیشترین تعداد ژن (۱۰۶۳) را داشت، در حالی که ماژول خاکستری با ۳ ژن کمترین تعداد را به خود اختصاص داده بود. این تعداد بسیار پایین ژن در ماژول خاکستری نشان می‌دهد که بیشتر ژن‌های شناسایی شده (ژن‌های فیلترشده با واریانس بالا) بیان همزمان داشتند و در بین ماژول‌های شناسایی شده پراکنده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار، ماژول‌های هم‌بیان ژنی را در داده‌های ترانسکریپتومی نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای شیری هلشتاین مبتلا به ورم‌پستان و سالم را شناسایی کرد که به طور معنی‌داری با وضعیت ورم‌پستان مرتبط بودند. چهار ماژول با همبستگی مثبت قوی ($r > 0.6$) و سطح معنی‌داری ($p\text{-value} < 0.05$) شامل نارنجی

1Soft Threshold Power Beta

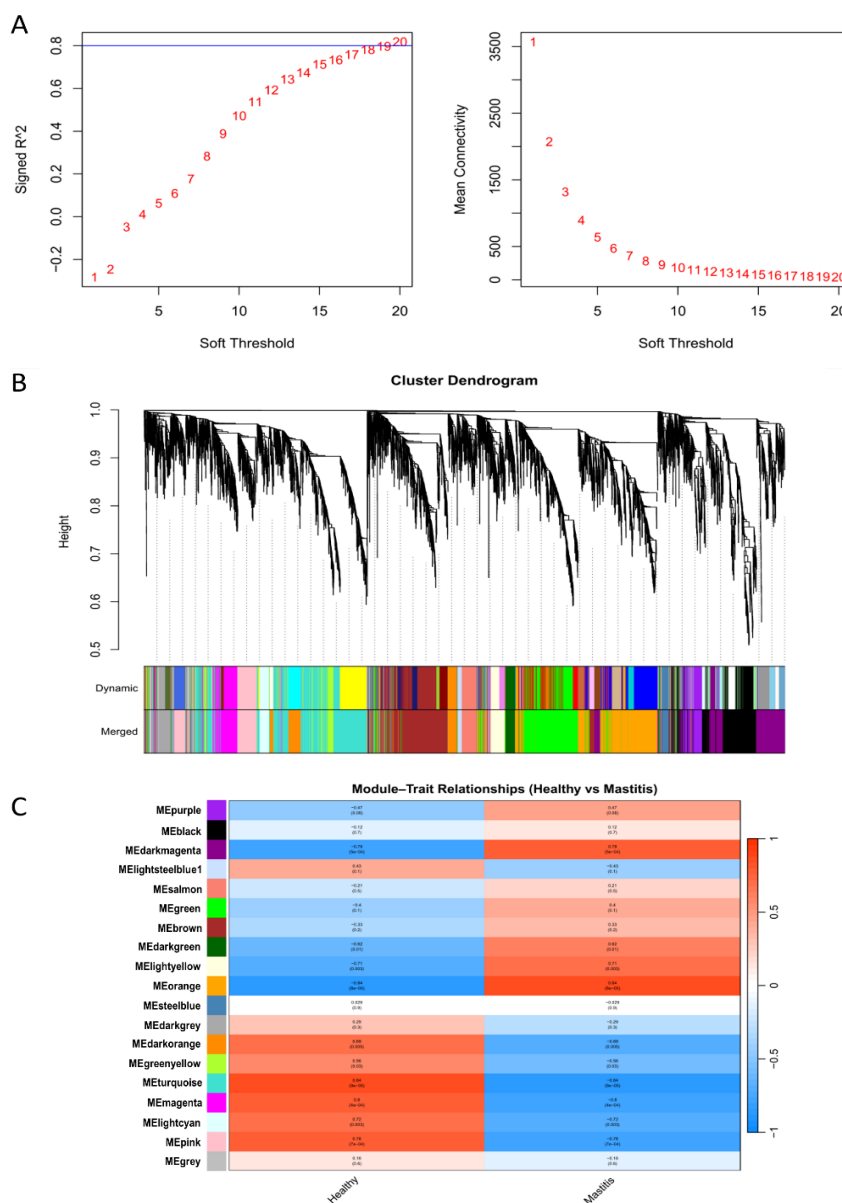
2Hierarchic Clustering

3Dynamic Branch Cutting Procedures

4Turquoise

5Orange

$r = 0.786$, p -value = 5.15×10^{-4} , No.) سرخابی تیره ($r = 0.842$, p -value = 8.09×10^{-5} , No. Genes: 897)
^۳ $r = 0.622$, p -value =) و سبز تیره ($r = 0.709$, p -value = 0.0031, No. Genes: 199) زرد روشن (Genes: 581
 بودند. در مقابل، پنج ماژول همبستگی منفی قوی ($r < -0.6$) و سطح معنی‌داری (p -value < 0.05) شناسایی شدند که شامل ماژول‌های فیروزه‌ای ($r = -0.84$, p -value = 8.79×10^{-5} , No. Genes: 1063) سرخابی
 ($r = -0.718$, p -value = 0.0026, No.) فیروزه‌ای روشن ($r = -0.796$, p -value = 3.87×10^{-4} , No. Genes: 313)
^۴ $r = -0.775$, p -value =) و صورتی ($r = -0.687$, p -value = 0.0006, No. Genes: 283) نارنجی تیره (Genes: 135)
 بودند. (0.029, No. Genes: 384)



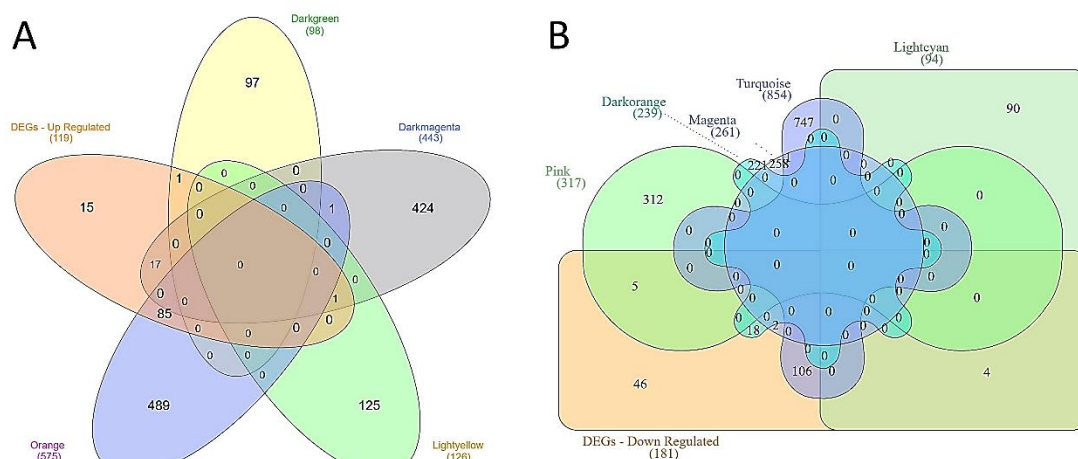
Darkmagenta
 Lightyellow
 Darkgreen
 Turquoise
 Magenta
 Lightcyan
 Darkorange
 Pink

شکل ۳. ماژول‌های هم‌بیان ژن که ژن‌های با بیان قابل اعتماد (با تعداد خوانش بیش از ۱۰ در بیش از ۳ نمونه) را در ۲۲ ماژول گروه‌بندی کرده‌اند. (A) مقدار ۱۹ به عنوان قدرت آستانه نرم تعیین شد. (B) ارتفاع (محور y) نشان‌دهنده فاصله هم‌بیان و محور x مربوط به ژن‌ها است. رنگ‌ها نشان‌دهنده ۱۹ ماژول هستند. ماژول خاکستری نشان‌دهنده ژن‌هایی است که به هیچ یک از ۱۹ ماژول اختصاص داده نشده‌اند. (C) روابط ماژول-صفت بین ماژول‌های شناسایی شده و گروه‌های تیمار (نمونه‌های گروه ورم‌پستان در مقابل نمونه‌های گروه سالم). همبستگی بین صفات و ژن‌های ویژه ماژول برای محاسبه رابطه استفاده شد. رنگ قرمز نشان‌دهنده همبستگی مثبت قوی در حالی که رنگ آبی نشان‌دهنده همبستگی منفی قوی است. ردیف‌ها نشان‌دهنده ماژول‌ها و ستون‌ها نشان‌دهنده گروه‌های تیمار هستند. ردیف اول در هر سلول سلول نشان‌دهنده همبستگی و ردیف دوم نشان‌دهنده سطح معنی‌داری (p-value) است.

Figure 3. Gene co-expression modules grouping reliably expressed genes (read counts >10 in more than 3 samples) into 22 modules. (A) A value of 19 was determined as the soft-thresholding power. (B) The height (y-axis) represents co-expression distance, and the x-axis corresponds to genes. Colors indicate 19 modules. The grey module represents genes that were not assigned to any of the 19 modules. (C) Module-trait relationships between the identified modules and treatment groups (mastitis group samples vs. healthy group samples). Correlations between traits and module eigengenes were used to calculate the relationships. Red indicates a strong positive correlation, whereas blue indicates a strong negative correlation. Rows represent modules, and columns represent treatment groups. The first row in each cell indicates the correlation, and the second row indicates the significance level (p-value).

ژن‌های مشترک بین تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و ماژول‌های هم‌بیانی ژنی وزن‌دار

برای شناسایی ژن‌های مشترک بین لیست‌های ژنی دارای افزایش و کاهش بیان حاصل از تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و لیست ژن‌های موجود در ماژول‌های هم‌بیانی (ژن‌هایی که حاشیه‌نویسی عملکردی داشتند) دارای افزایش و کاهش بیان، نمودار ون رسم گردید. در مجموع ۱۰۴ و ۱۳۵ ژن به ترتیب بین لیست ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان حاصل از تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و لیست‌های مربوط به ماژول‌های هم‌بیان دارای افزایش و کاهش شناسایی شدند (شکل ۴).



شکل ۴. نمودار ون مرتبط با ژن‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار جهت شناسایی ژن‌های مشترک. (A) ژن‌های مشترک شناسایی شده بین ژن‌های دارای افزایش بیان در تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های مرتبط با ماژول‌های دارای افزایش هم‌بیان. (B) ژن‌های مشترک شناسایی شده بین ژن‌های دارای کاهش بیان در تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های مرتبط با ماژول‌های دارای کاهش هم‌بیان.

Figure 4. Venn diagram of significantly differentially expressed genes for the identification of common genes. (A) Common genes identified between upregulated genes in comparative transcriptome analysis and genes associated with modules showing increased co-expression. (B) Common genes identified between downregulated genes in comparative transcriptome analysis and genes associated with modules showing decreased co-expression.

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی و حاشیه‌نویسی ژن‌ها

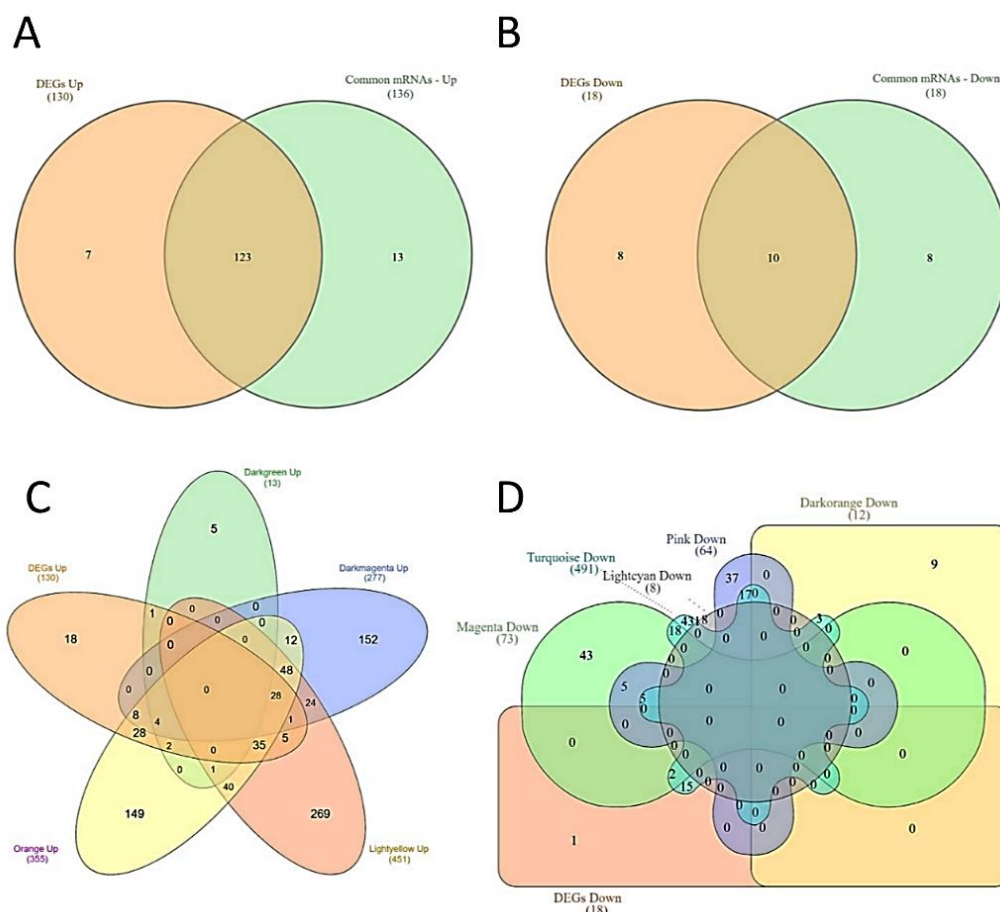
برای شناسایی مسیرهای متابولیکی-سیگنالی عملکردی مشترک حاصل از لیست‌های ژنی مرتبط با تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن‌دار، در ابتدا برای لیست‌های ژنی دارای افزایش و کاهش بیان معنی‌دار حاصل از تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای مسیرهای عملکردی مرتبط با فرآیندهای زیستی، عملکردهای مولکولی، اجزای سلولی و مسیرهای سیگنالی شناسایی شدند. همچنین برای ژن‌های مشترک شناسایی شده بین دو روش تجزیه و تحلیل انجام شده و برای لیست ژنی مرتبط با هر کدام از ماژول‌های معنی‌دار شناسایی شده این تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی انجام شد. در مجموع ۱۲۳ و ۱۰ مسیر بین لیست مسیرهای عملکردی مرتبط با لیست ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان حاصل از

ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های مشترک شناسایی شده بین دو روش تجزیه و تحلیل شناسایی شد. از طرف دیگر با مقایسه لیست مسیرهای عملکردی حاصل از ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان حاصل از تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و لیست ژنی مازول‌های هم‌بیانی دارای افزایش و کاهش بیان به طور جداگانه، ۱۱۲ و ۱۷ مسیر بین این دو مجموعه مشترک بودند. با توجه به مقایسه‌های انجام شده بین چهار لیست مسیر خروجی حاصل از نمودارهای وِن مشخص شد که بیشتر مسیرهای مرتبط با ژن‌های دارای افزایش و یا کاهش بیان مشترک هستند و تفاوت بسیار کمی بین خروجی‌های حاصل وجود دارد (لیست مسیرهای مرتبط با افزایش و کاهش بیان به طور جداگانه).

به طور کلی، مهمترین مسیرهای متابولیکی و سیگنالی مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان شامل پاسخ‌های دفاعی بدن به پاتوژن‌ها، فعالیت و توسعه سیستم ایمنی، تنظیم فعالیت سلول‌های B و T، تولید سایتوکین‌ها و تنظیم پاسخ‌های التهابی در دسته فرآیندهای زیستی، فعالیت سایتوکین‌ها در دسته عملکردهای مولکولی، فعال‌سازی کمپلکس ایمنوگلوبولین‌ها و گیرنده‌های سلول‌های B در دسته اجزای سلولی و در نهایت مسیرهای تعامل گیرنده سایتوکین-سایتوکین، تمایز سلول‌های Th1، Th2، Th17 و مسیر سیگنالی IL-17 در دسته مسیرهای سیگنالی بودند. در مسیر تعاملی گیرنده سایتوکین-سایتوکین، ژن‌های زیادی در پاسخ دفاعی و پاسخ سیستم ایمنی در زمان ابتلا به ورم‌پستان نقش دارند؛ به گونه‌ای که ژن‌های مرتبط کد شده در گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان همواره افزایش بیان از خود نشان داده‌اند (Naserkheil et al., 2022). سایتوکین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی سلولی در دفاع التهابی ذاتی و اکتسابی، رشد، تمایز و ترمیم بافت شناخته می‌شوند و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی میزبان در ورم‌پستان را تقویت می‌نمایند (Taraktsoglou et al., 2011). سایتوکین‌های سرم مانند اینترلوکین-۱۷ نیز ممکن است که شاخص‌های بالقوه‌ای برای ورم‌پستان گاوه‌های شیری در رابطه با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر (SCC) و امتیاز سلول‌های سوماتیک (SCS) باشند. IL-17A به عنوان اصلی‌ترین عضو خانواده IL-17، الگوهای جذب سلولی در محل التهاب را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک نشانگر معنی‌دار فعالیت می‌کند، به گونه‌ای که IL-17A بیشترین شباهت را به سایر اعضای خانواده دارد و مولکولی کلیدی در تنظیم نفوذ نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها می‌باشد (Schnyder-Candrian et al., 2006). از طرفی IL-17A می‌تواند به عنوان نامزد ژنتیکی کلیدی برای تجزیه و تحلیل ارتباط با شمارش سلول‌های سوماتیک و صفات ترکیبات شیر در گاوه‌های شیری باشد (Ghulam Mohyuddin et al., 2022). بنابراین، می‌توان عنوان کرد که ژن‌های دارای افزایش بیان در نمونه‌های ورم‌پستانی نسبت به نمونه‌های سالم، به طور عمده در مسیرهای دفاعی ضدپاتوژن، فعال‌سازی سایتوکین‌ها و مسیر سیگنالی تمایز Th17 فعالیت دارند؛ به گونه‌ای که نشان‌دهنده فعالیت هماهنگ پاسخ سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی است. مسیرهای تعاملی گیرنده سایتوکین-سایتوکین و مسیر سیگنالی IL-17 با تنظیم نفوذ نوتروفیل‌ها و تولید کموکاین، التهاب موضعی را در بافت هدف افزایش می‌دهند. این الگوی بیانی حاصل از هر دو روش تجزیه و تحلیلی تأییدکننده نقش محوری سیستم ایمنی تطبیقی در مهار عفونت پستانی ناشی از گونه‌های پروتوتکا در گاوه‌های شیری هلشتاین است. لازم به ذکر است که افزایش بیان IL-17A در نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان در مقایسه با نمونه‌های سالم، نباید به عنوان نشانگر حساسیت تفسیر گردد، بلکه بیانگر فعال‌سازی پاسخ دفاعی میزبان در برابر پاتوژن می‌باشد. IL-17A به عنوان یک سایتوکین کلیدی در مسیر Th17، نقش اصلی در جذب نوتروفیل‌ها به سمت محل عفونت ایفا می‌کند و افزایش بیان آن نشان‌دهنده تلاش سیستم ایمنی برای مهار و پاکسازی پاتوژن است. در واقع، آنچه مقاومت یا حساسیت را تعیین می‌کند، نه سطح بیان مطلق IL-17A، بلکه سرعت، شدت و زمان‌بندی مناسب پاسخ ایمنی می‌باشد. بنابراین، IL-17A به عنوان یک ژن کاندید برای افزایش مقاومت پیشنهاد می‌شود، با این فرض که تقویت یا تسریع پاسخ این مسیر می‌تواند به مهار کارآمدتر عفونت کمک نماید.

از طرفی دیگر، مهمترین مسیرهای متابولیکی و سیگنالی مرتبط با ژن‌های دارای کاهش بیان شامل پاسخ به دهیدروپیاندروسترون، ۱۱-دئوکسیکورتیکوسترون؛ پاسخ‌های به پروژسترون، استرادیول، هورمون‌های استروئیدی، کورتیکواستروئیدها، کتون، الکل، توسعه ساختار آتاتومی و اندام‌های حیوانی در دسته فرآیندهای زیستی، ناحیه خارج سولولی،

فضای خارج سلولی، لومن دستگاه گلژی، میوفیبریل و سارکومر در دسته اجزای سلولی هستند و همچنین مسیر سیگنالی گلوکاگون در دسته مسیرهای سیگنالی می‌باشد. در مطالعات ترانسکریپتومی و پروتئومی مرتبط با تولید شیر در گاوها، ژن‌های درگیر در پاسخ به دهیدروپیاندروسترون، ۱۱-دئوکسیکورتیکوسترون، پاسخ به پروژسترون و استرادیول در بافت پستان گزارش شده‌اند (Jiménez-Montenegro *et al.*, 2025). دهیدروپیاندروسترون و ۱۱-دئوکسیکورتیکوسترون از قشر فوق کلیه ترشح می‌شوند و در گاوهایی که در شرایط استرس و التهاب هستند با تنظیم پاسخ‌های ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و متابولیسم لیپید، به حفظ عملکرد بافت‌های هدف کمک می‌کنند (Gundlach *et al.*, 2017; Gabai *et al.*, 2020). پروژسترون و استرادیول نیز در گاوهای ماده برای رشد و تمایز سلول‌های اپی‌تلیال پستان قبل از شیردهی ضروری هستند (Ball *et al.*, 2000; Vang *et al.*, 2024). همچنین این اصطلاحات فرایندهای تنظیم‌شده‌ای را پوشش می‌دهند که طی آن بافت پستان گاو از مراحل جنینی تا بلوغ کامل شکل می‌گیرد و به بلوغ عملکردی می‌رسد؛ به گونه‌ای که در تمایز سلولی، مورفوژنز بافت‌ها و تشکیل عضله نیز می‌توانند نقش داشته باشند (Cai *et al.*, 2025). ناحیه خارج سلولی و فضای خارج سلولی به ناحیه خارج از غشای پلاسمایی سلول‌ها اشاره دارند که محل ترشح و ذخیره پروتئین‌های ترشح‌شده همچون هورمون‌ها، سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های شیر (آلفا، بتا و کاپا کازئین‌ها)، فاکتورهای رشد و وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) است. در بافت پستان گاوهای شیری، این وزیکول‌ها حاوی miRNAها، پروتئین‌های ایمنی و لیپیدها هستند که از سلول‌های اپی‌تلیال پستانی ترشح شده و از طریق محور روده-پستان یا مستقیماً در ایمنی موضعی پستان، انتقال ایمنی به گوساله و تنظیم سنتز شیر نقش دارند (Samuel *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2024). گلوکاگون از طریق گیرنده GCGR در سلول‌های اپی‌تلیالی پستان گاو، آدنيلات سیکلاز را فعال کرده و cAMP را افزایش می‌دهد که پروتئین کیناز A را تحریک می‌کند؛ در ورم‌پستان، این مسیر گلوکوکورتیزیس کبدی را تقویت می‌کند، اما در بافت پستان باعث مهار سنتز پروتئین شیر از طریق CREB و اختلال متابولیسم گلوکز می‌شود (Kanehisa *et al.*, 2023). بنابراین، می‌توان عنوان کرد که ژن‌های دارای کاهش بیان در نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان نسبت به نمونه‌های سالم به طور عمده در ایجاد اختلال در مسیرهای هورمونی تنظیم‌کننده (استروئیدها، گلوکاگون) و ساختارهای خارج سلولی (لومن گلژی و وزیکول‌های خارج سلولی) نقش دارند؛ به گونه‌ای که در نهایت با کاهش چشمگیر در میزان بیان آن‌ها، نشان‌دهنده سرکوب سنتز شیر و ترمیم بافت در زمان ابتلا به ورم‌پستان است. این الگو تأییدکننده این امر است که متابولیسم ترشحی بافت پستان تحت تأثیر ابتلا به ورم‌پستان گاو ناشی از پروتوتوکا مختل می‌شود و تعادل هورمونی-متابولیک را به نفع پاسخ التهابی تغییر می‌دهد.



شکل ۵. نمودار ون مرتبط با خروجی‌های حاصل از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی جهت شناسایی مسیرهای عملکردی مشترک. (A) مسیرهای عملکردی مشترک شناسایی شده بین ژن‌های دارای افزایش بیان ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های مشترک شناسایی شده بین دو روش تجزیه و تحلیل ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و روش شبکه هم‌بیانی ژنی و وزن‌دار. (B) مسیرهای عملکردی مشترک شناسایی شده بین ژن‌های دارای کاهش بیان ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های مشترک شناسایی شده بین دو روش تجزیه و تحلیل ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و روش شبکه هم‌بیانی ژنی و وزن‌دار. (C) مسیرهای عملکردی مشترک شناسایی شده بین ژن‌های دارای افزایش بیان ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های هر کدام از ماژول‌های دارای افزایش هم‌بیان حاصل از روش شبکه هم‌بیانی ژنی و وزن‌دار. (D) مسیرهای عملکردی مشترک شناسایی شده بین ژن‌های دارای کاهش بیان ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و ژن‌های هر کدام از ماژول‌های دارای کاهش هم‌بیان حاصل از روش شبکه هم‌بیانی ژنی و وزن‌دار.

Figure 5. Venn diagram of the results obtained from functional enrichment analysis for the identification of common functional pathways. (A) Common functional pathways identified between upregulated genes from comparative transcriptome analysis and common genes identified between the two methods of comparative transcriptome analysis and weighted gene co-expression network analysis. (B) Common functional pathways identified between downregulated genes from comparative transcriptome analysis and common genes identified between the two methods of comparative transcriptome analysis and weighted gene co-expression network analysis. (C) Common functional pathways identified between upregulated genes from comparative transcriptome analysis and genes of each of the modules showing increased co-expression derived from weighted gene co-expression network analysis. (D) Common functional pathways identified between downregulated genes from comparative transcriptome analysis and genes of each of the modules showing decreased co-expression derived from weighted gene co-expression network analysis.

بازسازی شبکه‌های تنظیمی برهمکنشی miRNA-mRNA

برای بررسی تعاملات بین RNAهای کدکننده و غیرکدکننده (miRNAها) و شناسایی سازوکارهای تنظیم ژنی مرتبط با آن‌ها از لیست‌های ژنی مشترک شناسایی شده (افزایش و کاهش بیان معنی‌دار) بین تجزیه و تحلیل‌های ترانسکرپتوم مقایسه‌ای و ماژول‌های هم‌بیان معنی‌دار مرتبط با شبکه هم‌بیانی ژنی و وزن‌دار استفاده شد. لازم به ذکر است که miRNAهای دخیل در هر شبکه نیز به تفکیک به صورت دو لیست دارای افزایش و کاهش بیان معنی‌دار بودند. این RNAها تفاوت بیان معنی‌دار به صورت افزایش و کاهش بیان بین نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان و سالم از خود نشان داده بودند، در مرحله اول شبکه‌های تعاملی پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده آنالین STRING ترسیم شدند. سپس، با توجه به شناسایی تعاملات بین miRNAها و mRNAها، شبکه‌های تنظیم ژنی مرتبط با لیست RNAهای دارای افزایش و کاهش بیان ترسیم شدند. در نهایت، با ادغام دو

شبکه ترسیم شده (شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین و شبکه تنظیم ژنی؛ به طور تفکیک شده برای ژن‌های دارای افزایش و کاهش بیان)، شبکه‌های تنظیمی دوبخشی miRNA-mRNA در محیط نرم‌افزار Cytoscape بازسازی شدند. این شبکه‌ها تعاملات مستقیم بین miRNAهای تنظیم‌کننده و ژن‌های مورد هدف آن‌ها را به نمایش می‌گذارند؛ به گونه‌ای که با استفاده از این شبکه‌ها می‌توان RNAهای مرکزی و هاب را براساس تعداد لبه‌های آن‌ها در ساختار شبکه شناسایی و معرفی کرد.

شبکه تنظیمی برهمکنشی بازسازی شده مرتبط با ژن‌های دارای افزایش بیان معنی‌دار از ۶۴ گره و ۲۳۴ لبه تشکیل شده است (شکل ۶). در این شبکه، ۱۳ mRNA هاب (*JFNG*, *IL17A*, *CD79A*, *MS4A1*, *CD19*, *JCHAIN*, *FCRL5*, *POU2AF1*) و ۲ miRNA هاب (*CD22* و *CD79B*, *TNFRSF13C*, *CXCR5*, *PAX5*) وجود دارد که به صورت یک ماژول هاب متشکل از ۱۶ گره و ۶۸ لبه ترسیم شده است (شکل ۶). در این ماژول miRNA هاب *bta-miR-2887* وجود دارد که به صورت یک ماژول هاب متشکل از ۱۶ گره و ۶۸ لبه ترسیم شده است (شکل ۶). در این ماژول miRNA هاب *bta-miR-2887* و mRNAهای *IL17A* و *PAX5*, *CXCR5*, *TNFRSF13C*, *CD19*, *JCHAIN* را بسته به عملکردی که دارند، تنظیم می‌کند. از طرف دیگر، miRNA هاب *bta-miR-2404* میزان بیان mRNAهای *FCRL5*, *TNFRSF13C* و *PAX5* را بسته به عملکرد اختصاصی که دارند، کنترل می‌کند. دو mRNA به نام‌های *PAX5* و *TNFRSF13C* توسط دو miRNA هاب ذکر شده به طور مشترک تنظیم می‌شوند.

bta-miR-2887 miRNA در فعالیتهای حیاتی بیولوژیکی مانند تنظیم ایمنی، تکثیر و توسعه سلولی نقش دارد (Shang et al., 2023). این miRNA در مطالعات مختلفی که با هدف شناسایی ترانسکریپت‌های دارای تفاوت بیان معنی‌دار مرتبط با ورم‌پستان ناشی از /شرشیاکلی (Ali et al., 2025) و /استافیلوکوکوس /اورئوس (Li et al., 2015) شناسایی شده است و افزایش بیان معنی‌دار در نمونه‌های ورم‌پستان نسبت به سالم از خود نشان داده است. اخیراً در پژوهشی که با استفاده از توالی‌یابی تک سلول روی سلول‌های سوماتیک شیر گاوه‌های هلستاین منتشر شده است mRNAهای *CD19*, *CD79B*, *MS4A1* و *CD79A* و *TNFRSF13C* به عنوان ژن‌های نشانگر خاص مرتبط با سلول‌های B که در سیستم ایمنی بدن نقش دارند، معرفی شده‌اند (Zorc et al., 2024). ژن *TNFRSF13C* عضو ابرخانواده گیرنده فاکتور نکروز تومور 13C، عضوی از خانواده TNF/TNFR است و گیرنده BAFF را در سلول‌های B کدگذاری می‌کند. این ژن با چندین فرآیند بیولوژیکی، مانند افزایش بقای سلول‌های B در شرایط آزمایشگاهی و تنظیم جمعیت سلول‌های B و پاسخ‌های ایمنی مرتبط دانسته شده است (Smulski and Eibel, 2018). همچنین گزارش شده است که در مسیرهای سیگنالی تعامل گیرنده سایتوکین-سایتوکین و NF-kappa B نقش فعالی دارد (Chen et al., 2021). *FCRL5* می‌تواند با تأثیر بر انتقال سیگنال گیرنده‌های سلول‌های ایمنی، پاسخ ایمنی را تنظیم کند (Zhu et al., 2013). همچنین گزارش شده است که در گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان فعال شدن فاکتور رونویسی TCF3 مستقیماً در افزایش بیان ژن‌های هدف *CD79B* و *PAX5* جهت پیشبرد تمایز سلول‌های B نقش دارد (Vanzin et al., 2025). از طرفی دیگر، در نمونه‌های بافت پستان گوسفندان مبتلا به ورم‌پستان نیز ژن‌های *CD19*, *CD79A* و *CD79B* افزایش بیان معنی‌دار از خود نشان داده بودند؛ به گونه‌ای که آن‌ها در مسیر سیگنالی گیرنده سلول‌های B^۲ و نقص ایمنی اولیه درگیر بودند. پروتئین کد شده توسط ژن *CD19* در اپی‌تلیوم پستانی و بافت‌های همبند داخل لوبولی در بافت‌های پستانی مبتلا به ورم‌پستان نسبت به بافت‌های پستانی سالم افزایش بیان بیشتری داشتند و پروتئین کد شده توسط ژن *CD79B* افزایش بیان معنی‌دار بیشتری را در اپی‌تلیوم پستانی نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان نشان داده بود، در حالی که در اپی‌تلیوم پستانی نمونه‌های سالم مهار شده بود (Li et al., 2019). IL-8 عملکرد خود را با اتصال به ژن‌های خانواده CXCR، مانند CXCR5 اعمال می‌کند، که به نوبه خود کموتاکسی و کموکاین را آغاز کرده و دفاع ایمنی پستان را فعال و تقویت می‌کند (Islam et al., 2020; Narayana et al., 2023; Yanthi et al., 2025). ژن *IL17A* می‌تواند یکی از ژن‌های کاندید برای افزایش مقاومت به

1Single-cell RNA sequencing

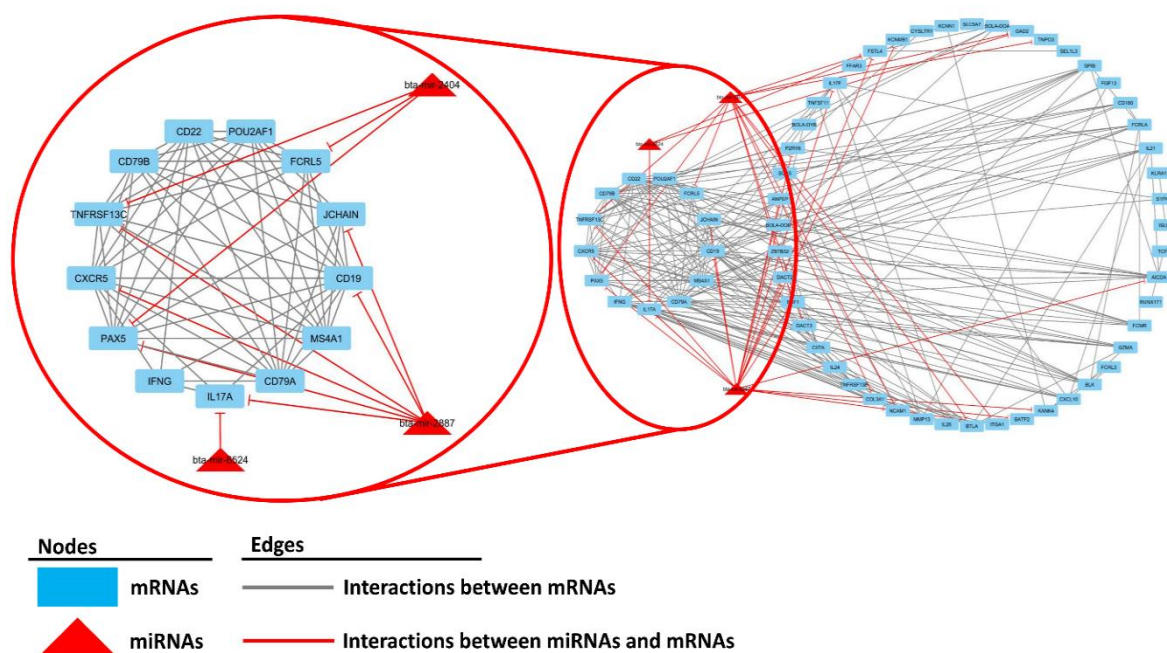
2B Cell Receptor Signaling

3Primary immunodeficiency

4Chemotaxis

5Chemokine

ورم‌پستان باشد، به گونه‌ای که با سیستم‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی مرتبط است و به عنوان یک نشانگر پاسخ ایمنی می‌تواند در تنظیم نفوذ نوتروفیل و ائوزینوفیل نقش داشته باشد (Ghulam Mohyuddin et al., 2022).



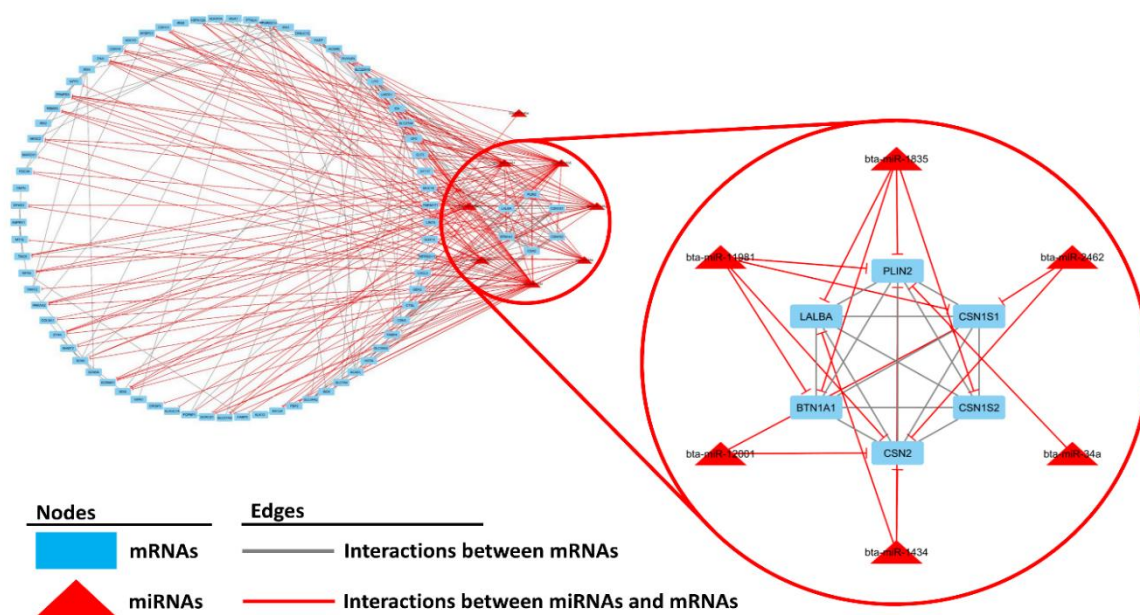
شکل ۶. شبکه تنظیمی دوبرخی هم‌بیان miRNA-mRNA مرتبط با ترانسکرپت‌های هم‌بیان دارای افزایش بیان (شامل ۳ miRNA و ۶۱ mRNA) در نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر گاوهایی شیری هلشتاین مبتلا به ورم‌پستان ناشی از پروتوتکاها.

Figure 6. Bipartite miRNA-mRNA co-expression regulatory network associated with upregulated co-expressed transcripts (including 3 miRNAs and 61 mRNAs) in milk somatic cell samples from Holstein dairy cows with mastitis caused by *Prototheca* spp.

شبکه تنظیمی دیگر، یعنی شبکه تنظیمی برهمکنشی بازسازی شده مرتبط با ژن‌های دارای کاهش بیان معنی‌دار از ۸۷ گره و ۲۷۱ لبه تشکیل شده است (شکل ۷). در این شبکه، ۶ mRNA هاب (*LALBA*, *BTN1A1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN1S1*) و ۶ miRNA هاب (*bta-miR-1181*, *bta-miR-12001*, *bta-miR-1434*, *bta-miR-34a*, *bta-miR-2462*) و وجود دارد که به صورت یک ماژول هاب متشکل از ۱۲ گره و ۳۱ لبه ترسیم شده است (شکل ۷). در این ماژول، miRNA هاب *bta-miR-1835* با mRNA های *LALBA* و *BTN1A1* را بسته به عملکردی که دارند، تنظیم می‌کند. از طرف دیگر، miRNA هاب *bta-miR-1181* میزان بیان mRNA های *CSN2*, *CSN1S1*, *PLIN2* و *BTN1A1* را کنترل می‌کند. دو mRNA به نام‌های *PLIN2* و *BTN1A1* توسط دو miRNA هاب ذکر شده به طور مشترک تنظیم می‌شوند.

سه ژن خانواده کازئین‌ها یعنی *CSN2* (β -casein)، *CSN1S1* (α 1-casein) و *CSN1S2* (α 2-casein) که تقریباً ۸۰ درصد از محتوای پروتئین شیر گاوها را کدگذاری می‌کنند (روی کروموزوم ۶ قرار دارند)، به همراه ژن پروتئین آب پنیر، *LALBA* (روی کروموزوم ۵ قرار دارد)، در نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر گاوهایی مبتلا به ورم‌پستان نسبت به سالم کاهش بیان معنی‌داری از خود نشان داده‌اند. ژن *LALBA* پروتئین آلفا-لاکتالبومین را رمزگذاری می‌کند و برای سنتز لاکتوز ضروری است؛ به گونه‌ای که نقش مهمی در تولید شیر به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی ترشح شیر ایفا می‌کند (Farrell et al., 2004; Zidi et al., 2014). یک توضیح احتمالی برای سطوح پایین‌تر بیان این ژن‌ها می‌تواند این باشد که محتوای پروتئین در شیر گاوهایی مبتلا به ورم‌پستان به دلیل رابطه ژنتیکی آنتاگونیستی بین ورم‌پستان و میزان پروتئین کاهش می‌یابد (Naserkheil et al., 2022). در مطالعه Moyes و همکاران (۲۰۰۹)، ژن *BTN1A1* در مقایسه نمونه‌های مبتلا به ورم‌پستان نسبت به نمونه‌های سالم

کاهش بیان معنی‌داری را نشان داده است که مطابق با کاهش بیان معنی‌دار در این پژوهش ($FC = -3.76$) می‌باشد. این ژن کدکننده بوتیروفیلین پروتئین اصلی با قطره چربی شیر می‌باشد و یکی از ژن‌های اصلی درگیر در متابولیسم لیپیدها می‌باشد (Moyes *et al.*, 2009). تری‌گلیسیریدها بین دو لوبول شبکه آندوپلاسمی تشکیل می‌شوند و نقش مهمی در تشکیل قطرات لیپیدی دارند. ترشح خارج سلولی قطرات لیپیدی با همکاری بین پروتئین مرتبط با تمایز چربی (PLIN2/ADFP)، گزانتین دهیدروژناز (XDH^2) و عضو زیرخانواده ۱ بوتیروفیلین ($BTN1A1^3$) انجام می‌شود (Li *et al.*, 2015). بیشتر چربی شیر تولید شده در طول دوره شیردهی از طریق فرآیند پیچیدن غشای قطرات لیپیدی سیتوپلاسمی به شیر ترشح می‌شود. ژن *PLIN2* یک پروتئین متصل شونده به قطرات لیپیدی سیتوپلاسمی است (Chong *et al.*, 2011); به گونه‌ای که بیان بیش از حد آن می‌تواند تجمع لیپید و غلظت تری‌گلیسیریدها را در سلول‌های اپی‌تلیالی غده پستانی افزایش دهد و مکمل اسید اولئیک می‌تواند تعامل آن را با سطح قطرات لیپیدی سیتوپلاسمی افزایش دهد. بنابراین کاهش بیان ژن *PLIN2* در نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان با کاهش تجمع چربی‌ها و غلظت تری‌گلیسیریدها همراه خواهد بود (Shi *et al.*, 2015; Mu *et al.*, 2021).



شکل ۷. شبکه تنظیمی دوبرخی هم‌بیان miRNA-mRNA مرتبط با ترانسکرپت‌های هم‌بیان دارای کاهش بیان (شامل ۸ miRNA و ۷۹ mRNA) در نمونه‌های سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای شیری هلستاین مبتلا به ورم پستان ناشی از پروتوتکاها.

Figure 7. Bipartite miRNA-mRNA co-expression regulatory network associated with downregulated co-expressed transcripts (including 8 miRNAs and 79 mRNAs) in milk somatic cell samples from Holstein dairy cows with mastitis caused by *Prototheca* spp.

در تفسیر شبکه‌های تنظیمی دوبرخی، در شبکه تنظیمی اول (شکل ۶) کلیه miRNAها و mRNAهای هدف افزایش بیان و در شبکه تنظیمی دوم (شکل ۷) کاهش بیان معنی‌دار داشتند. الگوی همبستگی مثبت بین بیان miRNA و mRNA در هر دو شبکه، با مکانیسم کلاسیک تنظیم منفی مستقیم سازگار نیست. این الگو می‌تواند ناشی از مکانیسم‌های غیرمستقیم مانند RNAهای رقابتی درون‌زا ($ceRNA^4$)، کنترل توسط فاکتور رونویسی مشترک و یا بازخوردهای پیچیده در شرایط پاتولوژیک باشد. بنابراین، همبستگی مثبت مشاهده‌شده به معنای نبود ارتباط تنظیمی نبوده، بلکه بیانگر وجود ارتباطات غیرمستقیم یا تنظیم از طریق شبکه‌های رقابتی درون سلولی می‌باشد که خود یافته‌ای ارزشمند است. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که در پاسخ به عفونت ناشی از گونه‌های پروتوتکا، تنظیمات پس از رونویسی از طریق شبکه‌های پیچیده و غیرخطی اعمال می‌شوند که نیازمند مطالعات تجربی تکمیلی برای اعتبارسنجی دقیق‌تر می‌باشند.

1Butyrophilin

2Xanthine dehydrogenase

3Butyrophilin subfamily 1 member A1

4Competitive Endogenous RNA

استفاده از رویکرد ادغام چندلایه‌ای عملکردی؛ یعنی ادغام تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم مقایسه‌ای، روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن دار، شبکه‌های تعاملی پروتئین-پروتئین و شبکه‌های تنظیمی دوبخشی برهم‌کنشی تصویری جامع‌تر نسبت به تنها انجام یک تجزیه و تحلیل ارائه می‌دهد؛ با این دیدگاه که ژن‌های مشترک بین تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم مقایسه‌ای و روش شبکه هم‌بیانی ژنی وزن دار به خصوص ژن‌های هاب در شبکه‌های تنظیمی دوبخشی برهم‌کنشی محتمل‌ترین کاندیدها برای نقش‌های کلیدی در مسیرهای عملکردی مرتبط با سیستم ایمنی بدن (به ویژه پاسخ ایمنی تطبیقی)، پاسخ‌های التهابی و سنتز شیر و ترکیبات آن در ورم‌پستان گاوه‌های شیری هستند. این مطالعه با توجه به این که روی یک پاتوژن خاص و نوظهور در ورم‌پستان تمرکز داشت و تنها روی نژاد هلشتاین و در یک گله انجام شده بود، با محدودیت تعداد نمونه‌های پایین همراه بود، بدون شک در مطالعات آینده با افزایش تعداد نمونه‌ها و گسترش آن به نژادها و گله‌های دیگر در کشورهای مختلف می‌توان نتایج مناسب و کاربردی را شناسایی و در صنعت برای کاهش ابتلا به ورم‌پستان در گله‌ها به کار برد. هر چند که در این پژوهش با تعداد نمونه پایین، رویکرد صرفاً بیوانفورماتیکی (با توجه به رویکرد ادغام چندلایه‌ای عملکردی) نتایج بسیار با ارزش و معنی‌داری ارائه گردید، برای تأیید و اعتبارسنجی نتایج حاصل از آن لازم است مطالعات در حجم بزرگ‌تر و با تعداد نمونه بیشتر همراه با مطالعات عملکردی آزمایشگاهی روی RNAهای هاب شناسایی شده انجام شود.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، مجموعه‌ای از ترانسکریپت‌های کلیدی و مسیرهای عملکردی مرتبط با ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا از طریق ادغام چند لایه‌ای تجزیه و تحلیل‌های ترانسکریپتوم مقایسه‌ای، شبکه هم‌بیانی ژنی وزن دار، شبکه تعاملی پروتئین-پروتئین و شبکه‌های تنظیمی دوبخشی miRNA-mRNA شناسایی شدند. براساس شبکه‌های تنظیمی بازسازی شده، ۱۳ mRNA و ۲ miRNA هاب با افزایش بیان معنی‌دار و همچنین ۶ mRNA و ۶ miRNA هاب با کاهش بیان معنی‌دار شناسایی شدند. ترانسکریپت‌های هاب با افزایش بیان به طور عمده در پاسخ‌های دفاعی، توسعه سیستم ایمنی، تنظیم پاسخ‌های التهابی، مسیر سیگنالی IL-17 و سیستم ایمنی تطبیقی نقش دارند، در حالی که ترانسکریپت‌های هاب با کاهش بیان در سنتز شیر، حفظ عملکرد بافت پستان، تنظیم هورمون‌های رشد و تمایز سلول‌های اپی‌تلیال و مسیر سیگنالی گلوکاگون دخیل هستند که مهار سنتز پروتئین شیر و اختلال در متابولیسم گلوکز را به دنبال دارد. لازم به تأکید است که یافته‌های حاصل از تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی حاضر، به دلیل محدودیت حجم نمونه و عدم اعتبارسنجی تجربی در شرایط *in vivo* و یا *in vitro* فاقد قابلیت تعمیم‌پذیری به عنوان نتایج قطعی می‌باشند؛ بنابراین، تفسیر نتایج باید با احتیاط صورت پذیرد. با این وجود، ترانسکریپت‌های هاب معرفی شده پتانسیل بالایی به عنوان بیومارکرهای تشخیصی یا اهداف درمانی بالقوه برای غربالگری حساسیت یا مقاومت به ورم‌پستان ناشی از گونه‌های پروتوتکا دارند، هر چند تأیید کاربرد بالینی آن‌ها نیازمند مطالعات تکمیلی تجربی و میدانی در جمعیت‌های بزرگ‌تر و اعتبارسنجی آزمایشگاهی بر روی ترانسکریپت‌های هاب معرفی شده می‌باشد. در مجموع، رویکرد ادغام چندلایه‌ای انجام شده در این پژوهش می‌تواند بینش‌های تکمیلی در مورد سازوکارهای ژنتیکی و تنظیم ژنی درگیر در ورم‌پستان ارائه دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان این پژوهش، از پژوهشگران پروژه تحقیقاتی با کد دسترسی PRJNA911953 به دلیل تولید و به اشتراک‌گذاری داده‌های ترانسکریپتومی خود در پایگاه داده NCBI صمیمانه تشکر می‌کنند. دسترسی آزاد به این داده‌ها، انجام تجزیه و تحلیل‌های تکمیلی و نوآورانه پژوهش حاضر، از جمله تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزن دار (WGCNA) و بازسازی شبکه‌های تنظیمی دوبخشی mRNA-miRNA را میسر ساخته است. بدین وسیله از تلاش‌های ارزشمند این پژوهشگران در پیشبرد دانش مرتبط با ورم‌پستان گاوه‌های شیری تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 270.
- Al-Harbi, H., Ranjbar, S., Moore, R. J., & Alawneh, J. I. (2021). Bacteria isolated from milk of dairy cows with and without clinical mastitis in different regions of Australia and their AMR profiles. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 743725.
- Ali, A. H., Najjar, Z., Liu, S. Q., & Ayyash, M. (2025). MicroRNAs from colostrum and mature cow milk: High-throughput sequencing and functional enrichment. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 100337.
- Andrew S. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data. Fast QC. 532, 1. Available Online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Aparicio-Roque, C., Alaniz-Gutiérrez, L., Jiménez-Jiménez, R. A., Rendón-Rendón, M. C., Mendoza-Núñez, M. A., & González-Álvarez, V. H. (2025). Bovine mastitis: Prevalence and economic losses. *Agro Productividad*, 18(9).
- Asselstine, V., Miglior, F., Suárez-Vega, A., Fonseca, P.A.S., Mallard, B., Karrow, N., Islas-Trejo, A., Medrano, J.F. & Cánovas, A. (2019). Genetic mechanisms regulating the host response during mastitis. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 9043-9059.
- Bakhtiarizadeh, M. R., Hosseinpour, B., Shahhoseini, M., Korte, A., & Gifani, P. (2018). Weighted gene co-expression network analysis of endometriosis and identification of functional modules associated with its main hallmarks. *Frontiers in Genetics*, 9, 453.
- Bakhtiarizadeh, M. R., Mirzaei, S., Norouzi, M., Sheybani, N., & Vafaei Sadi, M. S. (2020). Identification of gene modules and hub genes involved in mastitis development using a systems biology approach. *Frontiers in Genetics*, 11, 722.
- Ball, S., Polson, K., Emeny, J., Eyestone, W., & Akers, R. M. (2000). Induced lactation in prepubertal Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2459-2463.
- Bisutti, V., Mach, N., Giannuzzi, D., Vanzin, A., Capra, E., Negrini, R., Gelain, M.E., Cecchinato, A., Ajmone-Marsan, P. and Pegolo, S. (2023). Transcriptome-wide mapping of milk somatic cells upon subclinical mastitis infection in dairy cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 93.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116-128.
- Cai, W., Cole, J. B., Goddard, M. E., Li, J., Zhang, S., & Song, J. (2025). Mammary gland multi-omics data reveals new genetic insights into milk production traits in dairy cattle. *PLoS Genetics*, 21(4), e1011675.
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1712.
- Chen, Y., Jing, H., Chen, M., Liang, W., Yang, J., Deng, G., & Guo, M. (2021). Transcriptional profiling of exosomes derived from *Staphylococcus aureus*-infected bovine mammary epithelial cell line MAC-T by RNA-Seq analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 8460355.
- Chong, B. M., Reigan, P., Mayle-Combs, K. D., Orlicky, D. J., & McManaman, J. L. (2011). Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(6), 211-217.
- Dehghanian Reyhan, V., Sadeghi, M., & Ghafouri, F. (2022). Method of weighted gene co-expression network analysis and its application in animal and poultry breeding and genetics. *Professional Journal of Domestic*, 22(2), 5-13. (In Persian)
- Dejyong, T., Chanachai, K., Immak, N., Prarakamawongsa, T., Rukkwamsuk, T., Tago Pacheco, D., & Phimpraphai, W. (2022). An economic analysis of high milk somatic cell counts in dairy cattle in Chiang Mai, Thailand. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 958163.
- Farrell Jr, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
- Gabai, G., Mongillo, P., Giaretta, E., & Marinelli, L. (2020). Do dehydroepiandrosterone (DHEA) and

- its sulfate (DHEAS) play a role in the stress response in domestic animals?. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 588835.
- Ghafouri, F., Dehghanian Reyhan, V., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S. R., Kastelic, J. P., Barkema, H. W., & Shirali, M. (2024a). Competing endogenous RNAs (ceRNAs) and application of their regulatory networks in complex traits and diseases of ruminants. *Ruminants*, 4(2), 165-181.
- Ghafouri, F., Dehghanian Reyhan, V., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S. R., Kastelic, J. P., Barkema, H. W., & Shirali, M. (2024b). Integrated Analysis of Transcriptome Profiles and lncRNA-miRNA-mRNA Competing Endogenous RNA Regulatory Network to Identify Biological Functional Effects of Genes and Pathways Associated with Johne's Disease in Dairy Cattle. *Non-coding RNA*, 10(4), 38.
- Ghafouri, F., Naserkheil, M., Sadeghi, M., Miraei-Ashtiani, S.R., Kastelic, J.P., Barkema, H.W., Razban, V. & Shirali, M. (2025). Emerging Strategies to Better Control Bovine Mastitis: A Perspective for Detection, Diagnosis and Control of Mastitis Pathogens. *Professional Journal of Domestic*, 25(2), 6-15.
- Ghulam Mohyuddin, S., Liang, Y., Ni, W., Adam Idriss Arbab, A., Zhang, H., Li, M., Yang, Z., Karrow, N.A. & Mao, Y. (2022). Polymorphisms of the IL-17A gene influence milk production traits and somatic cell score in Chinese Holstein cows. *Bioengineering*, 9(9), 448.
- Ghulam Mohyuddin, S., Liang, Y., Ni, W., Adam Idriss Arbab, A., Zhang, H., Li, M., Yang, Z., Karrow, N.A. and Mao, Y. (2022). Polymorphisms of the IL-17A gene influence milk production traits and somatic cell score in Chinese Holstein cows. *Bioengineering*, 9(9), 448.
- Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., & Brors, B. (2014). "Circlize" implements and enhances circular visualization in R.
- Gundlach, N. H., Feldmann, M., Gundelach, Y., Gil, M. A., Siebert, U., Hoedemaker, M., & Schmicke, M. (2017). Dehydroepiandrosterone and cortisol/dehydroepiandrosterone ratios in dairy cattle with postpartum metritis. *Research in Veterinary Science*, 115, 530-533.
- He, W., Ma, S., Lei, L., He, J., Li, X., Tao, J., Wang, X., Song, S., Wang, Y., Wang, Y. & Shen, J. (2020). Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. *Veterinary Microbiology*, 242, 108570.
- Huang, Q., Xiao, Y., & Sun, P. (2024). Rumen-mammary gland axis and bacterial extracellular vesicles: Exploring a new perspective on heat stress in dairy cows. *Animal Nutrition*, 19, 70-75.
- Islam, M.A., Takagi, M., Fukuyama, K., Komatsu, R., Albarracin, L., Nochi, T., Suda, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Rutten, V., Eden, W.V. and Villena, J. (2020). Transcriptome analysis of the inflammatory responses of bovine mammary epithelial cells: Exploring immunomodulatory target genes for bovine mastitis. *Pathogens*, 9(3), 200.
- Jagielski, T., & Lagneau, P. E. (2007). Protothecosis. A pseudofungal infection. *Journal De Mycologie Médicale*, 17(4), 261-270.
- Jagielski, T., Bakula, Z., Di Mauro, S., Casciari, C., Cambiotti, V., Krukowski, H., Turchetti, B., Ricchi, M., Manuali, E. & Buzzini, P. (2017). A comparative study of the in vitro activity of iodopropynyl butylcarbamate and amphotericin B against *Prototheca* spp. isolates from European dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7435-7445.
- Jagielski, T., Roeske, K., Bakula, Z., Piech, T., Wlazlo, Ł., Bochniarz, M., Woch, P. & Krukowski, H. (2019). A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 619-628.
- Jiménez-Montenegro, L., Alfonso, L., Soret, B., Mendizabal, J. A., & Urrutia, O. (2025). Transcriptomic profiling of milk fat globules in cows with different β -casein genotypes. *Scientific Reports*, 15(1), 33511.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587-D592.
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357-360.
- Kolde, R. & Vilo, J. (2015). *Pheatmap: Pretty heatmaps*. R package version 1.0.12.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 559.
- Li, J., Luo, J., Wang, H., Shi, H., Zhu, J., Sun, Y., ... & Yao, D. (2015). Adipose triglyceride lipase

- regulates lipid metabolism in dairy goat mammary epithelial cells. *Gene*, 554(1), 125-130.
- Li, R., Zhang, C.L., Liao, X.X., Chen, D., Wang, W.Q., Zhu, Y.H., Geng, X.H., Ji, D.J., Mao, Y.J., Gong, Y.C. and Yang, Z.P. (2015). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4997-5013.
- Li, T., Gao, J., Zhao, X., & Ma, Y. (2019). Digital gene expression analyses of mammary glands from meat ewes naturally infected with clinical mastitis. *Royal Society Open Science*, 6(7), 181604.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Lund, M. S., Guldbandsen, B., Buitenhuis, A. J., Thomsen, B., & Bendixen, C. (2008). Detection of quantitative trait loci in Danish Holstein cattle affecting clinical mastitis, somatic cell score, udder conformation traits, and assessment of associated effects on milk yield. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 4028-4036.
- M Moyes, K.M., Drackley, J.K., Morin, D.E., Bionaz, M., Rodriguez-Zas, S.L., Everts, R.E., Lewin, H.A. and Looor, J.J. (2009). Gene network and pathway analysis of bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPAR γ signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism. *BMC Genomics*, 10(1), 542.
- Mu, T., Hu, H., Ma, Y., Feng, X., Zhang, J., & Gu, Y. (2021). Regulation of key genes for milk fat synthesis in ruminants. *Frontiers in Nutrition*, 8, 765147.
- Narayana, S.G., de Jong, E., Schenkel, F.S., Fonseca, P.A., Chud, T.C., Powell, D., Wachoski-Dark, G., Ronksley, P.E., Miglior, F., Orsel, K. and Barkema, H.W. (2023). Underlying genetic architecture of resistance to mastitis in dairy cattle: A systematic review and gene prioritization analysis of genome-wide association studies. *Journal of Dairy Science*, 106(1), 323-351.
- Naserkheil, M., Ghafouri, F., Zakizadeh, S., Pirany, N., Manzari, Z., Ghorbani, S., Banabazi, M.H., Bakhtiarizadeh, M.R., Huq, M.A., Park, M.N. & Barkema, H.W. (2022). Multi-omics integration and network analysis reveal potential hub genes and genetic mechanisms regulating bovine mastitis. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(1), 309-328.
- Nielen, M., Spigt, M. H., Schukken, Y. H., Deluyker, H. A., Maatje, K., & Brand, A. (1995). Application of a neural network to analyse on-line milking parlour data for the detection of clinical mastitis in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 22(1-2), 15-28.
- Pegolo, S., Toscano, A., Bisutti, V., Giannuzzi, D., Vanzin, A., Lisuzzo, A., Bonsembiante, F., Gelain, M.E. & Cecchinato, A. (2022). *Streptococcus agalactiae* and *Prototheca* spp. induce different mammary gland leukocyte responses in Holstein cows. *JDS Communications*, 3(4), 270-274.
- Puerto, M. A., Shepley, E., Cue, R. I., Warner, D., Dubuc, J., & Vasseur, E. (2021). The hidden cost of disease: I. Impact of the first incidence of mastitis on production and economic indicators of primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7932-7943.
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(3), 257-264.
- Samuel, M., Sanwlani, R., Pathan, M., Anand, S., Johnston, E.L., Ang, C.S., Kaparakis-Liaskos, M. and Mathivanan, S. (2023). Isolation and characterization of cow-, buffalo-, sheep-and goat-milk-derived extracellular vesicles. *Cells*, 12(20), 2491.
- Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., Fossiez, F., Ryffel, B. & Schnyder, B. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(12), 2715-2725.
- Shang, J., Ning, J., Bai, X., Cao, X., Yue, X., & Yang, M. (2023). Identification and analysis of miRNAs expression profiles in human, bovine, and donkey milk exosomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252, 126321.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Shave, C. D., Millyard, L., & May, R. C. (2021). Now for something completely different: *Prototheca*, pathogenic algae. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009362.

- Shi, H.B., Yu, K., Luo, J., Li, J., Tian, H.B., Zhu, J.J., Sun, Y.T., Yao, D.W., Xu, H.F., Shi, H.P. and Looor, J.J. (2015). Adipocyte differentiation-related protein promotes lipid accumulation in goat mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6954-6964.
- Smulski, C. R., & Eibel, H. (2018). *BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival. Front Immunol* 9: 2285.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P. & Jensen, L.J. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607-D613.
- Taraktoglou, M., Szalabska, U., Magee, D. A., Browne, J. A., Sweeney, T., Gormley, E., & MacHugh, D. E. (2011). Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages exposed to bacterial antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(1-2), 130-139.
- Tiezzi, F., Parker-Gaddis, K. L., Cole, J. B., Clay, J. S., & Maltecca, C. (2015). A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One*, 10(2), e0114919.
- Vang, A. L., Dorea, J. R., & Hernandez, L. L. (2024). Graduate Student Literature Review: Mammary gland development in dairy cattle—Quantifying growth and development. *Journal of Dairy Science*, 107(12), 11611-11620.
- Vanzin, A., Bisutti, V., Cánovas, A., Cecchinato, A., Gallo, L., Giannuzzi, D., & Pegolo, S. (2025). Exploring splice variants in milk leukocytes of dairy cows with subclinical intramammary infection due to *Prototheca* spp. and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Dairy Science*.
- Welderufael, B. G., Løvendahl, P., De Koning, D. J., Janss, L. L., & Fikse, W. F. (2018). Genome-wide association study for susceptibility to and recoverability from mastitis in Danish Holstein cows. *Frontiers in Genetics*, 9, 141.
- Wickham, H. (2016). Data analysis. In *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Cham: Springer international publishing, 189-201
- Yanthi, N.D., Anggraeni, A., Said, S., Saputra, S., Soejoedono, R.D., Muladno, M., Herlina, N., Fauziah, I., Nugroho, H.A., Nasrulloh, M.F. and Tiffarent, R. (2025). Differential expression of TLR and CXCR genes in mammary HC11 cells challenged with *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*: Implications for mastitis resistance. *Veterinary World*, 18(4), 1014.
- Zhu, Z., Li, R., Li, H., Zhou, T., & Davis, R. S. (2013). FCRL5 exerts binary and compartment-specific influence on innate-like B-cell receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), E1282-E1290.
- Zidi, A., Casas, E., Amills, M., Jordana, J., Carrizosa, J., Urrutia, B., & Serradilla, J. M. (2014). Genetic variation at the caprine lactalbumin, alpha (LALBA) gene and its association with milk lactose concentration. *Animal Genetics*, 45(4).
- Zorc, M., Dolinar, M., & Dovč, P. (2024). A single-cell transcriptome of bovine milk somatic cells. *Genes*, 15(3), 349.