

## شناسایی miRNAها و ایزومیرهای جدید در بافت کبد گاوهای شیری

زهره مزدوری<sup>۱</sup>، محمدرضا بختیارزاده<sup>۲\*</sup> و عبدالرضا صالحی<sup>۳</sup>

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۱۴)

### چکیده

تبادل منفی انرژی (NEB) در گاوهای شیری پرتولید در چند هفته نخست پس از زایمان رخ می‌دهد و به دلیل اثرگذاری منفی بر باروری و سلامتی اهمیت اقتصادی زیادی در گله‌های گاو شیری دارد. بنابراین، شناسایی هر چه بهتر سازوکارهای تنظیمی مؤثر در این اختلال سوخت‌وسازی (متابولیسم) اهمیت دارد. یکی از عامل‌های تنظیمی مؤثر در NEB، miRNAها هستند. به‌رغم اهمیت NEB، سازوکارهای تنظیمی مربوط به miRNAها در این دوره به‌خوبی شناخته نشده‌اند. در این بررسی داده‌های miRNA-seq مربوط به بافت کبد هشت گاو شیری هلشتاین موجود در بخش GEO بانک اطلاعاتی NCBI برای شناسایی miRNAها و ایزومیرهای جدید تجزیه و تحلیل شدند. در مجموع، ۲۹۱ miRNA جدید که ژن همتا (همولوگ) در دیگر گونه‌ها داشتند، و ۱۶۴ miRNA جدید بدون همتا شناسایی شد. بررسی عملکرد ژن‌های هدف miRNAهای شناسایی شده نشان داد، این ژن‌ها در مسیرهای زیستی (بیولوژیکی) مرتبط با NEB نقش دارند. افزون بر این ۴۴۶ ایزومیر و ۹۵ miRNA\* جدید برای نخستین بار در ژنگان (ژنوم) گاو گزارش شد. یافته‌های به‌دست‌آمده از این بررسی اطلاعات جدیدی برای درک بهتر نقش تنظیمی miRNAها در NEB فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ایزومیر، بافت کبد، تعادل منفی انرژی.

## Identification of new miRNAs and isomirs in liver tissue of dairy cows

Zohre Mozduri<sup>1</sup>, Mohammad Reza Bakhtiarzadeh<sup>2\*</sup> and Abdolreza Salehi<sup>3</sup>

1, 2, 3. M. Sc. Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran, Iran

(Received: Mar. 9, 2016 - Accepted: Nov. 4, 2016)

### ABSTRACT

Negative energy balance (NEB) occurs in high-producing dairy cows in first few weeks after parturition, that energy demand for maintenance and milk production exceeds the dietary energy intake. NEB has a considerable economic importance due to negative effect on health and fertility in dairy herds, therefore, the identification of its effective regulatory mechanism is important. miRNAs are one of these effective regulatory factors in NEB. Despite of the importance of NEB, the regulatory mechanisms related to miRNAs has not been well documented. In this study miRNA-seq data from liver tissue of eight Holstein dairy cows were analyzed to identify new miRNAs and isomirs. All data have been achieved from GEO in NCBI database. A total of 291 new miRNAs with homologous gene in other species were identified. Moreover, 164 new miRNAs without homologous were identified. Investigation of target genes of these miRNAs lead to identify biological paths related to NEB. Also 466 new isomiR and 95 new miRNA\* were detected for the first time in cow genome. The results of the current study provide new information for better understanding of the regulatory roles of miRNAs in NEB.

**Keywords:** IsomiR, negative energy balance, liver tissue.

## مقدمه

انتخاب ژنتیکی در گاوهای شیری در دهه‌های گذشته، باعث افزایش تولید شیر شده است. در دوره پس از زایش انرژی مورد نیاز برای نگهداری دام و شیردهی از انرژی دریافتی از طریق خوراک بیشتر است که موجب ایجاد تعادل منفی انرژی<sup>۱</sup> (NBE) می‌شود (Wathes *et al.*, 2009). این ناهنجاری سوخت‌وسازی (متابولیسم) بر باروری و سلامت حیوان تأثیر شایان توجهی دارد. گزارش‌ها نشان می‌دهد، NEB باعث تغییر در چرخه تخمدانی، کاهش نرخ باروری و کاهش نرخ زنده‌مانی جنین می‌شود (Diskin & Lucy, 2006; Morris, 2008; aFatima *et al.*, 2014). به‌رغم وجود راهکارهای مختلف مانند مدیریت تغذیه و افزودن مکمل‌های غذایی، برای جلوگیری از ناهنجاری NBE، این ناهنجاری به دلیل تأثیر منفی در سلامت و باروری حیوان، اهمیت زیادی در اقتصاد صنعت گاو شیری دارد (McCabe *et al.*, 2012). همانند دیگر اختلال‌های سوخت‌وسازی (مانند ورم‌پستان و کتوز)، سازوکارهای ژنتیکی و عامل‌های تنظیم‌کننده ژن‌ها (مانند عامل‌های رونویسی و RNAهای غیررمزکننده تنظیمی) نقش مهمی در بروز این ناهنجاری ایفا می‌کنند (Li *et al.*, 2015). بر همین پایه و با توجه به اهمیت این موضوع، بررسی‌های چندی به بررسی درک سازوکارهای تنظیمی NEB پرداخته‌اند که می‌توان به روش‌هایی مانند RT-PCR (Fenwick *et al.*, 2008)، ریزآرایه (Loor *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2010) و RNA-Seq (McCabe *et al.*, 2012) اشاره کرد.

از آنجاکه سوخت‌وساز در یاخته‌های زنده، بر پایه واکنش شیمیایی بین انواع متنوعی از مولکول‌ها مانند پروتئین، DNA، RNA و متابولیت‌های کوچک تنظیم می‌شود، موجودات چندیاخته‌ای پیچیده نیازمند تنظیم زمانی و مکانی بیان ژن هستند (Phillips, 2008). بیان ژن در سطوح چندی پیش از رونویسی، در طول و پس از آن تنظیم می‌شود. از شناسایی قابلیت تنظیم بیان ژن توسط RNAهای غیررمزشونده، بیشتر

از ۱۵ سال می‌گذرد (Clemens *et al.*, 2000)، اما اهمیت آن‌ها به تازگی مورد توجه بیشتر قرار گرفته است. بنا بر گزارش‌های اخیر، ۹۸ درصد ژنگان (ژنوم) انسان غیررمزکننده هست، اما بدون عملکرد نیست (IUM, 2012). فراوان‌ترین شکل RNA کوچک یافت‌شده در یاخته<sup>۲</sup> miRNA نام دارد (Mehta, 2014). ژن‌های miRNA، توالی‌های نوکلئوتیدی کوچک ۲۱-۲۵ بازی هستند که از بخش‌های غیررمزکننده DNA رونویسی می‌شوند (Bartel, 2004). در مرحله اول، رونوشت اولیه miRNA<sup>۳</sup> (pri-miRNA) از DNA ژنگانی با RNA پلی‌مراز II رونویسی می‌شود. اندکی پس از رونویسی، آنزیم دروشا<sup>۴</sup>، pri-miRNA را به یک پیش‌ساز ساقه-حلقه ۷۰ نوکلئوتیدی کوچک‌تر (pre-miRNA<sup>۵</sup>) برش می‌دهد (Mehta, 2014). سپس، این پیش‌ساز وارد سیتوپلاسم شده و توسط آنزیم دایسرها<sup>۶</sup> به صورت ساختار دورشته‌ای miRNA:miRNA\* درآمده و یکی از این رشته‌ها به کمک یک مجموعه پروتئینی با عنوان RISC<sup>۷</sup> به صورت miRNA بالغ ژن‌های هدف خود را شناسایی و عملکرد تنظیمی خود را ایفا می‌کند. برآورد می‌شود که miRNAها، بیان بیش از ۶۰ درصد ژن‌های کدکننده پروتئین پستانداران را تنظیم می‌کنند (Friedman *et al.*, 2009) و با بسیاری از ویژگی‌های مهم اقتصادی در دام‌های اهلی مرتبط هستند (Fatima & Morris, 2013).

افزون بر نقش گسترده و پیچیده miRNA در یاخته هر روز بر پیچیدگی این عامل‌های تنظیمی نیز افزوده می‌شود. به‌عنوان مثال، به‌رغم تصور اولیه که از هر pre-miRNA در سیتوپلاسم تنها یکی از رشته‌ها به‌عنوان miRNA بالغ فعالیت می‌کند، شواهد اخیر نشان می‌دهد که هر دو رشته می‌توانند به‌عنوان miRNA بالغ فعالیت کنند. با این وجود یکی از رشته‌ها به‌عنوان miRNA غالب (به‌عنوان مثال has-let-7c)

2. Micro RNA
3. Primary miRNA
4. Drosha
5. Precursor miRNA
6. Dicer
7. RNA-induced silencing complex

1. Negative Energy Balance

همچنین گزارش شده که اگرچه ایزومیرها الگوهای بیان همسانی با miRNAهای متعارف خود نشان می‌دهند، با این حال می‌توانند هدف‌های متنوعی داشته باشند (Peng *et al.*, 2012). بنابراین این یافته‌ها اهمیت شناسایی ایزومیرها مختص هر بافت را نشان می‌دهند. با توجه به اینکه miRNAها نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن‌های کبدی در شرایط NEB پس از زایمان در گاوهای شیری بازی می‌کنند (Fatima *et al.*, 2014a)، در نتیجه شناسایی نقش تنظیمی miRNAها و همچنین miRNAهای جدید می‌تواند به شناسایی هر چه بیشتر سازوکارهای تنظیمی مؤثر در NEB کمک کند (Fatima *et al.*, 2014a). تاکنون بررسی‌های چندی با هدف شناسایی miRNAها در گاو شیرین صورت گرفته است. در یک بررسی با استفاده از تجزیه ریزآرایه به شناسایی miRNAهای با بیان متمایز در کبد در شرایط NEB پرداخته شد. پنج miRNA شامل miR-140، miR-31، miR-1281، miR-2885 و miR-17-5p در پاسخ به NEB تغییر کردند (Fatima *et al.*, 2014). در بررسی دیگر، فراوانی کلی و توزیع miRNAها در هر دو شرایط تعادل منفی انرژی شدید<sup>۲</sup> (SNEB) و خفیف<sup>۳</sup> (MNEB) با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید<sup>۴</sup> (NGS) بررسی شد. نتایج نشان داد، بیان miRNAهای کبدی در NEB پس از زایمان تغییر می‌کند و ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده این miRNAها در زیست‌ساخت (بیوسنتز) چربی (لیپید) و محور سوماتوتروپیک دخیل هستند (Fatima *et al.*, 2014b).

نسخه کنونی (نسخه ۲۱) بانک اطلاعاتی miRBase که کامل‌ترین بانک اطلاعاتی مرتبط با miRNAها است ۸۰۸ توالی پیش‌ساز و ۷۹۳ توالی بالغ برای گونه *Bos taurus* (گاو) دارد (<http://www.mirbase.org>). در این راستا استفاده از داده‌های miRNA-seq به دست‌آمده از NGS امکان شناسایی این ژن‌ها را با قابلیت اعتماد بالا فراهم کرده است. با توجه به اهمیت miRNAها در سازوکارهای

فعالیت می‌کند و رشته دیگر با عنوان \*miRNA (به‌عنوان مثال \*has-let-7c) و با فراوانی کمتر فعالیت تنظیمی خواهد داشت. با توجه به این نکته که miRNA و \*miRNA توالی‌های متفاوتی دارند، بنابراین مجموعه RNAهای کدشونده متفاوتی را مورد هدف تنظیمی قرار می‌دهند (Bortoluzzi *et al.*, 2012). بنابراین هر دو رشته miRNA از پیش‌ساز اولیه می‌توانند در یاخته وجود داشته و به‌طور عملکردی مؤثر باشند، اما گاهی شکل \*miRNA غالب می‌شود. این دو شکل miRNA با مجموعه mRNAهای کدشونده هدف متفاوتی مرتبط هستند و به‌صورت منحصربه‌فردی فعالیت‌های یاخته را تنظیم می‌کنند (Bortoluzzi *et al.*, 2012).

افزون بر این، بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که چندشکلی تک نوکلئوتیدی در هر دو سمت ۳' و ۵' توالی miRNA بالغ (و درون ژن)، طیف گسترده‌ای از انواع هم‌جور (ایزوفرم)ها را برای هر miRNA ایجاد می‌کند که با عنوان ایزومیر<sup>۱</sup> هستند (Li *et al.*, 2010). به عبارت دیگر miRNAها می‌توانند تغییرپذیری‌ها پس از رونویسی نشان دهند. به‌عنوان مثال حذف‌ها در انتهای ۳' miRNAها ممکن است اختصاصی بودن ناحیه اتصال miRNA را تغییر دهد (Lawless *et al.*, 2013). در نتیجه یک miRNA بالغ می‌تواند با تفاوت‌های یک یا چند نوکلئوتیدی ایزومیرهای متفاوتی ایجاد و ژن‌های مختلفی را هدف قرار دهد (Fernandez-Valverde *et al.*, 2010). بنابراین سازوکارهای مؤثر در تولید ایزومیرها و ارتباط زیستی (بیولوژیکی)شان، پیچیدگی سازوکارهای مولکولی مرتبط با بیان mRNA به‌واسطه miRNA را افزایش می‌دهد (Timoneda *et al.*, 2013). گزارش شده است که در حیوان‌ها (از دروروفیلا ملانوگاستر تا انسان) و گیاهان، توالی‌های بالغ miRNA ثابت نیستند و مخلوطی از miRNAها با طول متنوع (تغییر در توالی‌ها شامل تغییر باز در سمت 3'، 5' و یا درون miRNA) دارند که در مجموع ایزومیرها نامیده می‌شوند (Fernandez-Valverde *et al.*, 2010).

2. Sever Negative Energy Balance  
3. Mild Negative Energy Balance  
4. Next Generation Sequencing

1. Isomir

Trimomatic از نرم‌افزار (Edwards, 2011). سپس از نرم‌افزار V0.32 برای پیرایش داده‌های miRNA-seq و حذف بازهای با کیفیت پائین ( $<20$  کیفیت) و حذف توالی‌های سازگار شده (آداپتوری) استفاده شد (Bolger *et al.*, 2014). خوانش‌های با کیفیت پایین و خوانش‌هایی که پس از پیرایش کوتاه‌تر از ۱۸ نوکلئوتید بودند حذف شدند. در ادامه خوانش‌های پیرایش‌شده برای کنترل کیفیت ثانویه با استفاده از نرم‌افزار FASTQC بررسی شدند (Schmieder & Edwards, 2011).

### شناسایی miRNAهای جدید

خوانش‌های کنترل کیفیت‌شده در برابر ژنگان گاو (UMD\_3.1) با استفاده از نرم‌افزار Bowtie1 (نسخه 1.0.0) هم‌ردیف شدند (Langmead, 2010)، و خوانش‌هایی که بیشترین یک جفت‌نشده<sup>۲</sup> با ژنگان را داشتند، برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شدند. خوانش‌هایی که به بیش از یک مکان در ژنگان هم‌ردیف شدند از بررسی حذف شدند. در ادامه خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان، برای شناسایی miRNAهای جدید با کمک بسته نرم‌افزاری mirdeep2 (نسخه 0.0.5) بررسی شدند. این نرم‌افزار خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان را با به‌کارگیری الگوریتم‌های مختلف بررسی و به شناسایی miRNAهای شناخته‌شده و جدید می‌پردازد (Friedländer *et al.*, 2012).

فایل مربوط به توالی miRNAهای بالغ و pre-miRNAهای شناخته‌شده در گاو از بانک اطلاعاتی miRBase (<http://www.mirbase.org>) استخراج شد. پس از هم‌ردیفی خوانش‌ها با ژنگان و تعیین جایگاه آن‌ها در ژنگان، شباهت این خوانش‌ها با miRNAهای شناخته‌شده در گاو بررسی شد. هدف از این بررسی شناسایی خوانش‌های مرتبط با miRNAهای شناخته‌شده در گاو بود. با توجه به اینکه هدف این بررسی شناسایی miRNAهای جدید بود خوانش‌های مربوط به miRNAهای شناخته‌شده، از

تنظیمی بیماری‌های مختلف به‌ویژه NEB و با توجه به اینکه دوره پس از زایمان اهمیت حیاتی برای سلامت و تولیدمثل گاوهای شیری دارد (Sheldon, 2004) شناسایی miRNAهای جدید در این رابطه می‌تواند راه را برای درک بهتر نقش تنظیمی miRNAها و کمک به بهبود NEB در گاوهای شیری هموار کند. در همین رابطه بیان miRNAهای کبدی در تعادل منفی انرژی پس از زایمان تغییر می‌کند و همچنین miRNAها بخشی از شبکه تنظیمی بزرگ‌تری هستند که بیان ژن‌های کبدی را در شرایط تعادل منفی انرژی شدید تنظیم می‌کنند (Fatima, 2014)، بنابراین هدف این مطالعه، کشف miRNAs\* و ایزومیرهای جدید با استفاده از داده‌های miRNA-Seq در NEB با به‌کارگیری روش‌های داده‌پردازی زیستی (بیوانفورماتیکی) است.

### مواد و روش‌ها

#### داده‌های مورد استفاده

در این بررسی از داده‌های miRNA-seq مربوط به بافت کبد هشت گاو شیری شامل چهار نمونه MNEB و چهار نمونه SNEB در دوره اولیه پس از زایمان که با دستگاه Illumina HiSeq2000 ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) توالی‌یابی شده‌اند استفاده شد. داده‌ها از پایگاه داده<sup>۱</sup> GEO موجود در NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با رس‌شمار GSE55882 دریافت شدند (bFatima *et al.*, 2014). این داده‌ها برای بررسی فراوانی کلی و توزیع miRNAها در بافت کبد گاوهای شیری پس از زایمان در دو شرایط SNEB و MNEB با استفاده از روش NGS ایجاد شده‌اند (bFatima *et al.*, 2014). نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی نشان داد که بیان بالای miRNAهای کبدی از جمله miR-140، miR-31، miR-1281، miR-2885 و miR-17-5p در شرایط NEB پس از زایمان تغییر می‌کند (Fatima *et al.*, 2014). کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FASTQC نسخه V0.10.1 انجام شد (Schmieder &

که دست‌کم سی خوانش با آن‌ها مرتبط بود و همچنین ساختار ثانویه معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) داشتند به‌عنوان miRNAهای جدید انتخاب شدند که با عنوان miRNAهای جدید بدون هم‌تا خوانده می‌شوند.

این احتمال وجود دارد که برخی از خوانش‌های توالی‌یابی‌شده مربوط به دیگر RNAهای غیررمزکننده (مانند tRNA، rRNA، snRNA و غیره) باشند. به‌منظور حذف این توالی‌ها در آغاز خوانش‌ها در برابر بانک اطلاعاتی Rfam (http://rnacentral.org/expert-database/rfam) بررسی شد و خوانش‌هایی که شباهت با ژن‌های موجود در این بانک اطلاعاتی داشتند، حذف شدند. همچنین بسته نرم‌افزاری mirdeep2 برای هر نامزد جدید، احتمالی که miRNA جدید شناخته‌شده مثبت واقعی باشد، را نیز برآورد و گزارش می‌کند. در این بررسی برای هر دو بخش تنها نامزدهای جدیدی که احتمال بزرگ‌تر از ۹۰ درصد داشتند، انتخاب شدند.

#### پیش‌بینی هدف‌های miRNAهای جدید

برای پیش‌بینی هدف‌های miRNAهای جدید شناسایی‌شده، توالی‌های 3' UTR به mRNAها در گاو از بانک اطلاعاتی Ensembl (http://asia.ensembl.org/index.html) استخراج شدند و با استفاده از سه نرم‌افزار پیش‌بینی هدف miRNA (PITA، Miranda (نسخه 3.3a) و TargetSpy) بررسی شدند. نرم‌افزار TargetSpy برای شناسایی هدف‌های miRNAها از یک روش محاسباتی بر پایه یادگیری ماشین<sup>۱</sup> بهره می‌گیرد. در این روش طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های ساختاری مرتبط با اتصال miRNAها و ژن‌های هدف در نظر گرفته می‌شود و به‌طور خودکار بهترین هدف‌ها برای هر miRNA شناسایی می‌شود (Sturm et al., 2010). نرم‌افزار Miranda یکی از نرم‌افزارهای پرکاربرد پیش‌بینی هدف برای miRNAها است و ویژگی‌های مختلفی همچون هم‌ردیفی بین mRNA/miRNA را با استفاده از الگوریتم هم‌ردیفی Smith-Waterman،

بررسی حذف شدند. در مرحله بعد به‌منظور شناسایی miRNAهای حفاظت‌شده (miRNAهایی که هم‌تا در دیگر گونه‌های پستانداران دارند) همسانی خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان با miRNAهای شناسایی‌شده در دیگر گونه‌های حیوانی موجود در بانک اطلاعاتی miRBase بررسی شد. در صورت وجود همسانی بین خوانش مورد بررسی و یک miRNA در گونه دیگر و همچنین همسان بودن ساختار سنجاق سری، خوانش‌ها به‌عنوان miRNAهای جدید در ژنگان گاو که هم‌تا در دیگر گونه‌ها دارند، معرفی شدند.

بررسی و پیش‌بینی ساختار ثانویه توالی‌ها توسط نرم‌افزار RNAfold (نسخه 1.8.4) انجام شد (Denman, 1993). فایل مربوط به توالی miRNAهای بالغ و pre-miRNAهای شناخته‌شده در دیگر گونه‌های حیوانی از بانک اطلاعاتی miRBase استخراج شد. بسته نرم‌افزاری mirdeep2 برای هر یک از نامزد (کاندید)های جدید شناسایی‌شده بر پایه معیارهایی همچون پایداری ساختار ثانویه، شمارخوانش مربوط به هر نامزد و پیش‌بینی محل برش آنزیم دایسر و با استفاده از آمار بیزی یک امتیاز برآورد می‌کند، که بیانگر اعتبار نامزد شناخته‌شده به‌عنوان miRNA جدید است (Friedländer et al., 2012). در این بررسی، تنها نامزدهای جدید شناسایی‌شده با امتیاز بیشتر از ۳ که دست‌کم ۱۰ خوانش با آن‌ها مرتبط بود و همچنین ساختار ثانویه معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) داشتند به‌عنوان miRNAهای جدید انتخاب شدند که تحت عنوان miRNAهای جدید دارای هم‌تا خوانده می‌شوند (Xu et al., 2014). در مرحله آخر، خوانش‌هایی که با هیچ‌یک از miRNAهای شناخته‌شده در گاو و دیگر گونه‌های حیوانی مرتبط نبودند برای شناسایی miRNAهای جدید که هم‌تا در دیگر گونه‌های حیوانی ندارند بررسی شدند. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار RNAfold ساختار ثانویه این توالی‌ها بررسی و با استفاده از آمار بیزی ویژگی‌های این ساختارها با ویژگی‌های miRNAهای شناخته‌شده مقایسه و امتیازدهی شد. در این بررسی برای افزایش درستی نتایج، تنها نامزدهای جدید شناسایی‌شده با امتیاز بیشتر از ۱۰

انجام شد (Barturen *et al.*, 2014). با استفاده از این نرم‌افزار می‌توان وجود  $miRNA^*$  را در  $pre-miRNA$ های شناخته‌شده که تنها یک  $miRNA$  بالغ دارند، بررسی کرد. خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان که با یک  $pre-miRNA$  شناخته‌شده مرتبط هستند، بررسی شد و در صورت وجود دست‌کم یک خوانش هم‌ردیف‌شده با بازوی مقابل  $miRNA$  بالغ، به‌عنوان  $miRNA^*$  جدید معرفی شدند. بر همین پایه خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان به همراه فایل مربوط به توالی  $miRNA$ های بالغ و  $pre-miRNA$ های شناخته‌شده در گاو با نرم‌افزار sRNAbench بررسی شد. با انتخاب فراسنجه‌های پیش‌فرض، پیش‌بینی ساختار سنجاق سری احتمالی که دو رشته یک  $miRNA$  را تعریف می‌کنند انجام شد.

یکی از ویژگی‌های مهم  $miRNA$ ها حفاظت‌شدگی آن‌ها بین گونه‌های مختلف است. بنابراین یکی از روش‌های تأیید  $miRNA^*$ های شناسایی‌شده در این بررسی، ارزیابی آن‌ها در دیگر گونه‌هاست. نظر به اینکه شمار ژن‌های شناخته‌شده در ژنگان انسان و موش نسبت به ژنگان گاو کامل‌تر و دقیق‌تر است، انتظار بر این است که بیشتر  $miRNA^*$  مرتبط با  $miRNA$ های مختلف در این دو گونه شناخته‌شده باشد. در صورتی که  $miRNA^*$ هایی که در این بررسی شناسایی شده‌اند در این دو گونه نیز گزارش شده باشند، مهر تأییدی بر نتایج این بررسی خواهد بود. بر همین پایه  $miRNA^*$ های شناخته‌شده در این بررسی در این دو گونه ارزیابی شد.

#### شناسایی ایزومیرهای جدید

برای شناسایی ایزومیرهای مربوط به  $miRNA$ های شناخته‌شده در گاو از نرم‌افزار sRNAbench استفاده شد (Barturen *et al.*, 2014). در ادامه خوانش‌ها دوباره با ژنگان گاو و با کمک نرم‌افزار Bowtie1 (نسخه 1.0.0) (Langmead, 2010)، هم‌ردیف شدند و بر پایه الگوریتم جستجوی ایزومیرها در نرم‌افزار sRNAbench، ایزومیرها شناسایی شدند. انواع ایزومیرهای بررسی شده در این پژوهش عبارت بودند از: ۱- ایزومیرهایی با اضافه شدن بازهایی که با ژنگان همخوانی ندارند (به ترتیب با عنوان NTA، NTU، NTC و NTG برای بازهای غیرالگوی A،

انرژی آزاد  $miRNA/mRNA$  را با استفاده از بسته نرم‌افزاری Vienna و محاسبه میزان حفاظت‌شدگی نواحی هدف هر یک از  $miRNA$ ها را با استفاده از امتیاز PhastCons برای پیش‌بینی هدف هر  $miRNA$  در نظر می‌گیرد. در پایان، بر پایه ترکیب این ویژگی‌ها برای هر یک از  $miRNA$ ها، هدف‌های احتمالی تعیین می‌شوند (John *et al.*, 2004). همچنین نرم‌افزار PITA از دیگر نرم‌افزارهای پرکاربرد شناسایی هدف برای  $miRNA$ ها است که فرض می‌کند ساختار  $mRNA$  بر پایه ویژگی‌های ترمودینامیکی نقش مهمی در شناسایی هدف برای  $miRNA$ ها بازی می‌کند. با در نظر گرفتن این فرض چگونگی اتصال  $miRNA$  به یک  $mRNA$  بر پایه ساختار ثانویه بررسی شده و هدف‌ها شناسایی می‌شوند (Kertesz *et al.*, 2007). در این بررسی ژن هدف هر  $miRNA$  توسط هر سه نرم‌افزار و با استفاده از فراسنجه‌های پیش‌فرض شناسایی شد. نظر به اینکه هر یک از نرم‌افزارها فرض‌های متفاوتی برای پیش‌بینی دارند، پیشنهاد شده است که از چندین نرم‌افزار برای پیش‌بینی هدف‌های  $miRNA$ ها استفاده شود (Tabas-Madrid *et al.*, 2014). در این بررسی برای افزایش درستی در صورتی که یک ژن با دست‌کم دو نرم‌افزار به‌عنوان ژن هدف برای یک  $miRNA$  پیش‌بینی شود به‌عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد. پس از شناسایی هدف‌ها برای هر یک از  $miRNA$ های جدید شناسایی‌شده، گروه‌های کارکردی این ژن‌ها با استفاده از بانک اطلاعاتی DAVID<sup>1</sup> انجام شد و عبارات معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. هدف از این تجزیه و تحلیل بررسی این نکته است که آیا ژن‌های شناسایی‌شده برای هر  $miRNA$  با عبارت‌های زیستی مرتبط با مرحله زیستی مورد نظر (در این بررسی NEB در دو حالت SNEB و MNEB در بافت کبد) ارتباط دارند یا خیر؟

#### شناسایی $miRNA^*$ های جدید

شناسایی  $miRNA^*$  توسط نرم‌افزار sRNAbench (<http://bioinfo5.ugr.es/srnatoolbox/srnabench>)

1. Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)

## نتایج و بحث

در این بررسی در آغاز برای شناسایی miRNAهای جدید خوانش‌ها با ژنگان گاو هم‌ردیف شدند. در جدول ۱ اطلاعات مربوط به شمار خوانش‌های خام، پس از حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان ارائه شده است.

U، C و G، ۲- ایزومیرهایی با طول بلندتر از miRNA متعارف گزارش‌شده در miRBase در سمت ۳' (Iv3pE) یا ۵' (Iv5pE)، ۳- ایزومیرهایی با طول کوچک‌تر از miRNA متعارف گزارش‌شده در miRBase در سمت ۳' (Iv3pT) یا ۵' (Iv5pT) و ۴- ایزومیرهای با تفاوت شمار باز در هر دو سمت (mv).

جدول ۱. خلاصهٔ مربوط به شمار خوانش‌ها پیش و پس از پیرایش و شمار خوانش‌های هم‌ردیف‌شده با ژنگان گاو

Table 1. Summary of reads before and after trimming and number of mapped reads to the cow genome

Sample	Number of reads on each sample before trimming	Number of reads on each sample after trimming	Number and percentage of mapped reads
2MNEB <sup>1</sup>	35,079,188	33,653,428	22,872,216 (0.68)
3 MNEB	44,401,783	43,641,870	30,453,938 (0.70)
4MNEB	40,699,727	334,672,27	22,959,287 (0.70)
5MNEB	38,751,887	38,323,954	34,352,883 (0.90)
7SNEB <sup>2</sup>	35,531,177	33,752,175	21,850,263 (0.65)
8SNEB	42,701,190	42,357,385	28,308,898 (0.66)
9SNEB	39,733,845	35,811,568	24,800,874 (0.70)
10SNEB	37,834,521	35,328,558	22,661,044 (0.65)

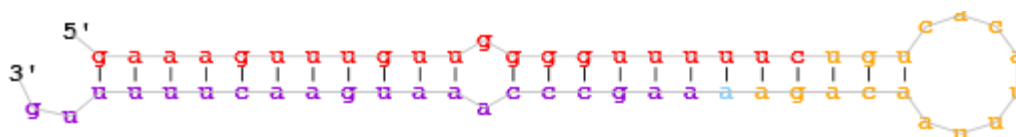
1. Medium negative energy balance

2. Sever negative energy balance

جدید دارای همتا، کاهش یافت (جدول ۲ به‌عنوان مثال، ۱۰ miRNA جدید برتر شناسایی‌شده با نرم‌افزار miRDeep2 را نشان می‌دهد). همچنین تصویر مربوطه به ساختار ثانویه miRNA پیش‌بینی‌شده برای یکی از miRNAهای جدید دارای همتا شناسایی‌شده به‌وسیلهٔ miRDeep2 با رس‌شمار ۲۹۸۷۴\_۳، که با has-miR-561-3p هم‌مانگی دارد (به‌بیان‌دیگر miRNA همتا آن در انسان has-miR-561-3p است) در شکل ۱ ارائه شده است.

## شناسایی miRNAهای جدید

خروجی تجزیه‌وتحلیل داده‌های miRNA-seq، فهرستی از miRNAهای جدید و شناخته‌شده است. نتایج این بررسی برای نخستین بار منجر به شناسایی و معرفی ۲۹۱ miRNA جدید دارای همتا، در گاو شد که تاکنون در بانک اطلاعاتی miRBase گزارش نشده است. برای افزایش درستی و کاهش خطای مثبت دروغین با در نظر گرفتن امتیاز بالای ۳ و شمار کل خوانش بالای ۱۰، این شمار به ۱۶۸ miRNA



شکل ۱. ساختار ثانویهٔ پیش‌بینی‌شده برای miRNA جدید با رس‌شمار ۲۹۸۷۴\_۳ که با has-miR-561-3p همسانی دارد.

توالی به رنگ قرمز توالی بالغ و توالی به رنگ بنفش \*miRNA را نشان می‌دهد.

Figure 1. miRNA secondary structure predicted for a novel miRNA with accession number 29874\_3 which has homology with has-miR-561-3p. The sequence of the mature sequence is red and purple shows miRNA\* sequence.

در میان ۱۰ miRNA داشت. همچنین miRNA با رس‌شمار ۲۰\_۱۷۸۸۵ که ۶۷ ژن را هدف قرار می‌دهد، کمترین ژن هدف را در میان ۱۰ miRNA تنظیم می‌کند. در جدول ۲ نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی ژن‌های هدف برای ۱۰ miRNA و برخی

نتایج این بخش نشان داد که به‌طورکلی ۳۷۳ ژن هدف برای مجموع این ۱۰ miRNA به‌دست آمد. در این میان miRNA با رس‌شمار ۲۹۸۷۴\_۳ که ۹۹۷ ژن را مورد هدف تنظیمی (اتصال به ژن هدف و خاموشی آن) قرار می‌دهد، بیشترین شمار ژن هدف را

مسیرهای زیستی معنی‌دار مرتبط با این ژن‌ها ارائه شده است. نتایج بررسی مسیرهای زیستی ژن‌های شناسایی شده نشان داد، miRNAهای شناسایی شده عملکردهای متنوع و مرتبط با NEB دارند.

جدول ۲. ویژگی‌های مختلف مربوط به ۱۰ miRNA شناسایی شده برتر دارای همتا

Table 2. Different features of the top 10 novel miRNA with homology

Accession number	miRDeep2 Score	Number of reads	miRNA homology	Mature miRNA sequence	Number of predicted target genes	Gene ontology ( $P < 0.05$ )
3_29874	580	1116	hsa-miR-561-3p	gaaaguuuguuggguuuuuc	997	JNK cascade
3_31257	10	10	hsa-miR-637	acuggggguugagaauugcgcu	220	The process of biosynthesis of lipids and phospholipids
25_23278	5.6	77	hsa-miR-1269a	guggacuggaggggcauccuu	304	Carbohydrate metabolic process
20_17885	5.6	12	efu-miR-411	ucgguggaaggggaaau	67	-
24_22900	5.5	372	hsa-miR-92a-2-5p	ggggggggggcgccggg	120	Regulated by stress-activated protein kinase
5_35624	5.5	60	mmu-miR-122-5p	aggagugucgggacaaggccu	170	The process of lipid biosynthesis
6_36835	5.5	19	hsa-miR-940	aagcagcagagauaggcugu	360	-
11_2572	5.4	481	mmu-miR-185-5p	uggagagaacaggugcuuu	433	Process immune system
16_9592	5.4	292	hsa-miR-548d-3p	aaaaaacaggagugacuuuu	839	By stress-activated protein kinase signaling pathway
22_20626	5.6	46	hsa-miR-1236-5p	agagugaccugcgccgcccac	217	Nucleotide-Sugar transfer

miR-411 افزایش یافته‌های کبدی سرطانی را القا می‌کند درحالی‌که مهار miR-411 این تأثیر را کاهش می‌دهد (Xia *et al.*, 2015). گزارش شده است که ژن miR-122 یک miRNA حفاظت‌شده ویژه کبد است (bFatima *et al.*, 2014). دیگر miRNA شناسایی شده در این بررسی miR-185 بود. گزارش شده است که miR-185 جذب کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بالا را از راه مهار پس از رونویسی سرکوب می‌کند (Wang *et al.*, 2013). در این بررسی، ۱۶۴ miRNA جدید بدون همتا نیز شناسایی شد، با در نظر گرفتن امتیاز بالای ۱۰ و شمار خوانش‌های بالای ۳۰، این شمار به ۲۲ miRNA کاهش یافت. به‌طور میانگین، ۳۷۳ ژن هدف برای ۱۰ miRNA بدون همتا برتر شناسایی شده، به‌دست آمد. miRNA با رس‌شمار ۱۸\_۱۲۸۱۵ که ۵۵۴ ژن را هدف قرار می‌دهد، بیشترین شمار ژن هدف را در میان ۱۰ miRNA داشت و عبارات زیستی پاسخ به محرک هورمون استروئیدی، آبشار<sup>۲</sup> MAPKKK، آبشار<sup>۳</sup> JNK، توسعه سامانه ایمنی برای ژن‌های هدف این miRNA معنادار شد. همچنین miRNA با رس‌شمار ۱۴\_۶۱۸۷ که ۱۹

با فرض اینکه عامل‌های تنظیمی مانند miRNAها در پاسخ به بیماری‌ها، تنش‌ها و تحریک‌های محیطی بیان می‌شوند، انتظار بر این است که miRNAهای جدید در این بررسی عملکرد مرتبط با بافت کبد و NEB داشته باشند. زیرا این miRNAها در بافت کبد گاوهای در NEB شناسایی شده‌اند. با ارزیابی بررسی‌های گذشته فرضیه بالا قوی‌تر می‌شود، به‌طوری‌که miRNAهای همتای این ژن‌ها، در دیگر گونه‌ها عملکردهای اثبات‌شده مرتبط با بافت کبدی دارند. به‌عنوان مثال، miR-561 و ژن هدفش DAX-1 در فعال‌سازی APAP ناشی از گیرنده هسته‌ای در یاخته‌های کبدی اولیه انسان دخیل هستند (Li *et al.*, 2014). گزارش شده است که بیان نامتعارف miR-1269a در یاخته‌های HCT116 در سرطان کبد و ریه افزایش یافته است (Bu *et al.*, 2015). از دیگر miRNAهای همتا شناسایی شده در این بررسی miR-411 دارد، بیان آن در بافت‌های کبدی سرطانی افزایش می‌یابد. این miRNA بیان<sup>۱</sup> ITCH را تنظیم می‌کنند و افزایش یافته‌ای را در یاخته‌های کبدی سرطانی در انسان تنظیم می‌کند (Xia *et al.*, 2015). بیان نامتعارف (بیان ژن در بافتی که نباید بیان شود)

2. MAP kinase kinase kinase

3. c-Jun N-terminal kinases

1. Itchy E3 ubiquitin protein ligase



نتایج miRNAهای شناسایی شده در NEB بود. جدول ۳ نتایج به دست آمده از این بخش را برای ۱۰ miRNA برتر بدون همتا و همچنین شمار ژنهای هدف شناسایی شده برای هر کدام از ۱۰ miRNA برتر و برخی گروههای کارکردی مرتبط با این ژنها را نشان می دهد.

ژن را هدف قرار می دهد، کمترین ژن هدف را در میان ۱۰ miRNA تنظیم می کند و عبارات زیستی پاسخ ایمنی، فرایند سامانه ایمنی برای ژنهای هدف این miRNA معنادار شد. نتایج مربوط به بررسی گروههای کارکردی همگی بیانگر احتمال وجود نقش تنظیمی

جدول ۳. نتایج مربوط به ۱۰ miRNA شناسایی شده برتر بدون همتا و ویژگیهای مختلف آنها

Table 3. Different features of the top 10 novel miRNA without homology

Name of miRNA	Score of miRDeep2	Number of reads	Mature miRNA sequence	Number of predicted target genes	Gene ontology ( $P < 0.05$ )
13_5619	150	391	aaagguucguuuagguuuuc	332	response to stress
18_12815	510	1006	gaaaguucguucggguuuua	554	the development of the immune system
14_6187	340	463	agggucggccggguuag	19	Immune response, the immune system
1_175711	360	707	ccaaguucguucggguuuu	453	Regulation of immune system, activation of the immune response
23_21424	490	605	aagaguucguucguuuuuc	445	The development of the immune system, metabolic processes lipids
21_19796	450	679	aaguacaggaucccaaugaa	461	Regulation of phosphorylation
2_28601	8900	17340	aaaaguucguucggguuuu	526	JNK Cascade , protein kinase signaling pathway activated by stress
7_39486	3200	6322	aaaaacuacaacgaacuuuga	504	Response to stress
42897_X	430	739	aaaccugaauagaacuuuug	380	Cascade JNK
2_28103	250	4926	gcacgggugguucaguggua	58	-

Wnt نیز از مسیرهای شناسایی شده در این بررسی بود. گزارش شده است که مهار مسیر سیگنال Wnt با استفاده از مهارکنندههای ویژه، تجمع چربی در یاختههای کبدی را افزایش می دهد (Kaur *et al.*, 2011).

#### شناسایی ایزومیرهای جدید

در این بررسی، با استفاده از نرم افزار sRNAbench، ۴۴۶ ایزومیر شناسایی شد. در این میان bta-mir-122، bta-let-7i، bta-let-7c، bta-mir-140، bta-mir-192، bta-let-7g، bta-mir-29a، bta-mir-423-5p، bta-mir-143 و bta-mir-21-5p به ترتیب ۱۰ miRNA با بالاترین شمار ایزومیر بودند (در جدول ۴ پنج ایزومیر برتر ارائه شده است).

نتایج این بخش نشان می دهد که به احتمال miRNAهای جدید شناسایی شده نقشهای مهمی در مراحل مختلف زیستی به ویژه در NEB دارند. به عنوان مثال، از عبارتهای معنادار شناسایی شده در این بررسی، آبشار JNK، MAPKKK و NF-kappaB را می توان نام برد. در این رابطه، در کبد، آبشار JNK از پایین دست گیرندههای TNF در پاسخ به التهاب، میکروب و سم القاء می شود (Papa *et al.*, 2008). فعال سازی مداوم JNK باعث مرگ برنامه ریزی شده یاخته و بقای یاختههای کبدی می شود که این چالشها نیازمند القای مسیر NF-kB است (Papa *et al.*, 2008). مسیر MAPK نقش مهمی در تنظیم هموستاز در کبد و تنظیم هموستازی کلسترول دارد (Go & Mani, 2012). مسیر سیگنال

جدول ۳. خلاصه ای از ویژگیهای مربوط به ایزومیرهای شناسایی شده

Table 4. Summary of identified isomir

Name of miRNA	Total reads	lv5pT	lv5pE	lv3pT	lv3pE	NTA (G)	NTA (C)	NTA (U)	NTA (A)	mv
bta-miR-122	158,050,836	43,948	31	67,504,749	10,649,958	507,843	768,228	2,647,048	12,006,900	83,872
bta-miR-192	17,905,238	523,153	93	11,727,377	55,185	77,960	158,874	2,005,620	695,550	2,564,635
bta-miR-140	3,831,939	998,750	71	892,595	238,794	29,782	33,695	332,250	420,904	544,308
bta-let-7c	2,353,930	1,723	0	638,717	254,919	13,431	12,474	32,003	161,126	1,051
bta-let-7i	1,552,645	96	12	1,301,359	771	4,431	6,642	95,834	38,614	913

بیان شده پس از miR-122 در بررسی‌های کبد انسان Wang (Li *et al.*, 2013) و موش گزارش شده است (et al., 2009). بررسی‌های پیشین نشان می‌دهند که miR-140 بیان بالا در کبد موش و انسان دارد، بیانگر عملکرد احتمالی آن در کبد است (Ferland-McCollough *et al.*, 2010).

#### شناسایی \*miRNAهای جدید

با تجزیه و تحلیل داده‌های miRNA-seq با نرم‌افزار sRNAbench، شمار ۹۵ \*miRNA جدید که پیشتر در بانک اطلاعاتی miRBase گزارش نشده بود، شناسایی شد. با در نظر گرفتن \*miRNAهایی که دست کم ۱۰۰ خوانش با آن‌ها مرتبط بود، این شمار به ۲۲ \*miRNA جدید کاهش یافت (جدول ۵).

بیشترین شمار ایزومیرها مربوط به miR-122 که در آن ایزومیرهای از نوع اضافه شدن آدنوزین بالاترین فراوانی را داشت. فرآیند آدنیله شدن miR-122 در کبد انسان و موش، گزارش شده (Kato *et al.*, 2009) و در مقایسه با دیگر بافت‌ها، بیش از ۵۷ درصد همه miRNAهای بیان شده در کبد را miR-122 تشکیل می‌دهد (Jin *et al.*, 2009)، از این رو، آن را یک miRNA حفاظت شده خاص کبد می‌دانند (bFatima *et al.*, 2014). افزون بر این، miR-122 در حدود ۷۰ درصد کل miRNAها در کبد انسان را تشکیل می‌دهد (Jopling, 2012). همچنین، miR-192 دومین miRNA فراوان در کبد است که با پاسخ یاخته‌ای به تحریک‌های گلوکز مرتبط است (Pogribny *et al.*, 2010) و به‌عنوان یکی از بالاترین miRNAهای

جدول ۴. خلاصه‌ای از ویژگی‌های مربوط به \*miRNAهای جدید شناسایی شده

Table 5. The summary of identified new miRNA\*

Name of miRNA	Sequence	Read count	Name of miRNA	Sequence	Read count
bta-mir-28-3p	TCCAGGAGCTCTCAATCTAGTG	8,151	bta-mir-30a-3p	GCTGCAAACATCCGACTGAAAG	19,127
bta-mir-885-3p	TATCCACTACACCCCGCTGCCT	4,285	bta-mir-340-5p	TTATAAAGCAATGAGACTGATT	8,933
bta-mir-139-3p	ACTCCAACAGGGCCGCTCTCCA	3,606	bta-mir-30e-3p	GCTGTAAACATCCGACTGAAAG	1,912
bta-mir-30f-3p	AGAGTAAACAGCCTTCTCCAG	1,714	bta-mir-92a-1-5p	AGGTTGGGATCGGTTGCAATGCT	1,329
bta-mir-122-3p	AACGCCATTATCACACTAAATA	927	bta-mir-374a-3p	CTTATCAGGTTGTATTGTAATF	615
bta-mir-106b-3p	CCGCACTGTGGTACTTGCTG	587	bta-let-7d-3p	CTATACGACCTGCTGCCTTTCT	546
bta-mir-25-5p	AGGCGGAGACTTGGGCAATTGC	386	bta-mir-204-3p	ACGTCCCTTTGCCTTCCCAGC	281
bta-mir-539-3p	ATACAAGGACAATTTCTTTCT	234	bta-mir-365-2-5p	ACAGCTGCCCTGAAAGTCCCTC	205
bta-mir-532-3p	CCTCCCACACCCAAGGCTTGCA	202	bta-mir-2284w-3p	AAAACCTCAATGAACCTTTTGG	189
bta-mir-376c-3p	AACATAGAGGAAATTCACGT	188	bta-mir-7-2-3p	TATGGCAGACTGTGATTTGTTG	150
bta-mir-301a-5p	AGTAGTGAATAAAGTCAGAGC	135	bta-mir-3432a-2-3p	CCTGAGGGATCTTTAGTTGCTG	135

miRNA در هر دو رشته نیز در گونه‌های نزدیک حفاظت شده است.

#### نتیجه‌گیری

در این بررسی، تجزیه و تحلیل داده‌های miRNA-seq مربوط به گاوهای شیری در NEB منجر به شناسایی miRNAها و \*miRNAهای جدید در ژنگان گاو و همچنین معرفی ایزومیرهای جدید در بافت کبد گاوهای در NEB شد. بررسی ابعاد مختلف ژن‌های جدید شناسایی شده شامل بررسی ژن‌های هم‌تا miRNAهای دارای هم‌تا در دیگر گونه‌ها، بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های هدف miRNAهای بدون هم‌تا جدید، بررسی عملکرد ایزومیرهای جدید شناسایی شده در دیگر

پس از مقایسه ۲۲ \*miRNA جدید شناسایی شده با دو گونه انسان و موش مشخص شد، در انسان و موش به ترتیب ۱۸ و ۱۷ miRNA وجود دارند که برای هر کدام از آن‌ها \*miRNA در بانک اطلاعاتی miRBase گزارش شده است. به بیان دیگر در این بررسی ۲۲ \*miRNA شناسایی شد که \*miRNAها در بررسی از بررسی miRNAها در انسان و موش برای این ۲۲ miRNA مشخص شد که به ترتیب برای ۱۸ و ۱۷ miRNA بیشتر \*miRNA گزارش شده است. بنابراین همخوانی نتایج مربوط به \*miRNA با دیگر گونه‌ها مؤید درستی بالای نتایج به دست آمده و روش مورد استفاده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزون بر حفاظت شده بودند توالی miRNAها، وجود

رسیدن به سازوکارهای تنظیمی موجود در NEB هموار کند. در نتیجه یافته‌های به‌دست‌آمده از این بررسی منبع سودمندی برای درک بهتر نقش تنظیمی miRNAها در بافت کبد گاوهای شیری در NEB فراهم می‌کند.

گونه‌ها و مقایسه \*miRNAهای جدید در دیگر گونه‌ها قابلیت و ظرفیت آن‌ها را به‌عنوان تنظیم‌گرهای جدید در بافت کبد تأیید کرد. شناسایی این ژن‌ها به‌عنوان تنظیم‌گرهای جدید در بافت کبد می‌تواند راه را برای

## REFERENCES

1. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
2. Barturen, G., Rueda, A., Hamberg, M., Alganza, A., Lebron, R., Kotsyfakis, M., Shi, B. J., Koppers-Lalic, D. & Hackenberg, M. (2014). sRNAbench: profiling of small RNAs and its sequence variants in single or multi-species high-throughput experiments. *Methods in Next Generation Sequencing*, 1, 21-31.
3. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, btu170, 1-7.
4. Bortoluzzi, S., Bisognin, A., Biasiolo, M., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Norfo, R., Manfredini, R. & Vannucchi, A. M. (2012). Characterization and discovery of novel miRNAs and moRNAs in JAK2V617F-mutated SET2 cells. *Blood*, 119, e120-e130.
5. Bu, P., Wang, L., Chen, K. Y., Rakhilin, N., Sun, J., Closa, A., Tung, K. L., King, S., Varanko, A. K. & Xu, Y. (2015). miR-1269 promotes metastasis and forms a positive feedback loop with TGF- $\beta$ . *Nature communications*, 6, 1-12.
6. Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, R., Hemmings, B. A. & Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6499-6503.
7. Denman, R. (1993). Using RNAFOLD to predict the activity of small catalytic RNAs. *Biotechniques*, 15, 1090-1095.
8. Diskin, M. & Morris, D. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 260-267.
9. Fatima, A., Analysis of hepatic microRNA expression in postpartum dairy cows in negative energy balance. (2014). *National University of Ireland*, Galway.
10. Fatima, A. & Morris, D. G. (2013). MicroRNAs in domestic livestock. *Physiological Genomics*, 45, 685-696.
11. Fatima, A., Waters, S., O'Boyle, P., Seoighe, C. & Morris, D. G. (2014a). Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle. *BMC Genomics*, 15, 1-10.
12. Fatima, A., Lynn, D. J., O'Boyle, P., Seoighe, C. & Morris, D. (2014b). The miRNAome of the postpartum dairy cow liver in negative energy balance. *BMC genomics*, 15, 1-8.
13. Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Kenny, D. A., Diskin, M. G., Patton, J., Murphy, J. J. & Wathes, D. C. (2008). Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 34, 31-44.
14. Ferland-McCollough, D., Ozanne, S., Siddle, K., Willis, A. & Bushell, M. (2010). The involvement of microRNAs in Type2 diabetes. *Biochemical Society Transactions*, 38, 1565-1570.
15. Fernandez-Valverde, S. L., Taft, R. J. & Mattick, J. S. (2010). Dynamic isomiR regulation in *Drosophila* development. *Rna*, 16, 1881-1888.
16. Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W. & Rajewsky, N. (2012). miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 40, 37-52.
17. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19, 92-105.
18. Go, G. W. & Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 85, 19-28.
19. IUM, T. (2012). ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *SCIENCE*, 337, 1159-1161.
20. Jin, W., Grant, J. R., Stothard, P., Moore, S. S. & Guan, L. L. (2009). Characterization of bovine miRNAs by sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Molecular Biology*, 10, 1-11.
21. John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C. & Marks, D. S. (2004). Human microRNA targets. *PLoS Biol*, 2, 1-11.
22. Jopling, C. (2012). Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA biology*, 9, 137-142.
23. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S.i., Baba, T. & Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2. *Genes & Development*, 23, 433-438.

24. Kaur, K., Pandey, A. K., Srivastava, S., Srivastava, A. K. & Datta, M. (2011). Comprehensive miRNome and in silico analyses identify the Wnt signaling pathway to be altered in the diabetic liver. *Molecular BioSystems*, 7, 3234-3244.
25. Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. & Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics*, 39, 1278-1284.
26. Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current Protocols in Bioinformatics*, 11.17. 11-11.17. 14.
27. Lawless, N., Foroushani, A. B., McCabe, M. S., O'Farrelly, C. & Lynn, D. J. (2013). Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a Gram-positive bacterial infection. *PLOS ONE*, 8, 1-13.
28. Li, J. Y., Yong, T. Y., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. (2010). Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology*, 15, 599-608.
29. Li, M., Yang, Y., He, Z. X., Zhou, Z. W., Yang, T., Guo, P., Zhang, X. & Zhou, S. F. (2014). MicroRNA-561 promotes acetaminophen-induced hepatotoxicity in hepg2 cells and primary human hepatocytes through downregulation of the nuclear receptor corepressor dosage-sensitive sex-reversal adrenal hypoplasia congenital critical region on the x chromosome, gene 1 (dax-1). *Drug Metabolism and Disposition*, 42, 44-61.
30. Li, N., You, X., Chen, T., Mackowiak, S. D., Friedländer, M. R., Weigt, M., Du, H., Gogol-Döring, A., Chang, Z. & Dieterich, C. (2013). Global profiling of miRNAs and the hairpin precursors: insights into miRNA processing and novel miRNA discovery. *Nucleic Acids Research*, gkt072, 1-16.
31. 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. (2015). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 4997-5013.
32. Loor, J. J., Everts, R. E., Bionaz, M., Dann, H. M., Morin, D. E., Oliveira, R., Rodriguez-Zas, S.L., Drackley, J. K. & Lewin, H. A. (2007). Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological Genomics*, 32, 105-116.
33. Lucy, M. (2006). Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 64, 237-254.
34. McCabe, M., Waters, S., Morris, D., Kenny, D., Lynn, D. & Creevey, C. (2012). RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance. *BMC Genomics*, 13, 1-11.
35. McCarthy, S. D., Waters, S. M., Kenny, D. A., Diskin, M. G., Fitzpatrick, R., Patton, J., Wathes, D. C. & Morris, D. G. (2010). Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiological Genomics*, 42, 188-199.
36. Mehta, J. P. (2014). Sequencing Small RNA: Introduction and Data Analysis Fundamentals. *RNA Mapping*, Springer, 1182, 93-103.
37. Nielsen, M., Hansen, J., Hedegaard, J., Nielsen, R., Panitz, F., Bendixen, C. & Thomsen, B. (2010). MicroRNA identity and abundance in porcine skeletal muscles determined by deep sequencing. *Animal Genetics*, 41, 159-168.
38. Papa, S., Zazzeroni, F., Fu, Y. X., Bubici, C., Alvarez, K., Dean, K., Christiansen, P. A., Anders, R. A. & Franzoso, G. (2008). Gadd45 $\beta$  promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 1911-1923.
39. Peng, Z., Cheng, Y., Tan, B.C.M., Kang, L., Tian, Z., Zhu, Y., Zhang, W., Liang, Y., Hu, X. & Tan, X. (2012). Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nature Biotechnology*, 30, 253-260.
40. Phillips, T. (2008). Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education*, 6, 775-781.
41. Pogribny, I. P., Starlard-Davenport, A., Tryndyak, V. P., Han, T., Ross, S. A., Rusyn, I. & Beland, F. A. (2010). Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Laboratory Investigation*, 90, 1437-1446.
42. Schmieder, R. & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27, 863-864.
43. Sheldon, I. M. (2004). The postpartum uterus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20, 569-591.
44. Sturm, M., Hackenberg, M., Langenberger, D. & Frishman, D. (2010). TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. *BMC bioinformatics*, 11, 1-17.
45. Tabas-Madrid, D., Muniategui, A., Sánchez-Caballero, I., Martínez-Herrera, D. J., Sorzano, C. O. S., Rubio, A. & Pascual-Montano, A. (2014). Improving miRNA-mRNA interaction predictions. *BMC Genomics*, 15, 1-12.

46. Timoneda, O., Balcells, I., Núñez, J. I., Egea, R., Vera, G., Castelló, A., Tomàs, A. & Sánchez, A. (2013). miRNA expression profile analysis in kidney of different porcine breeds. *PLoS One*, 8, 1-13.
47. Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L. E. & Galas, D. J. (2009). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. In: *Proceedings of the national academy of sciences*, 106, 4402-4407.
48. Wang, L., Jia, X. J., Jiang, H.J., Du, Y., Yang, F., Si, S. Y. & Hong, B. (2013). MicroRNAs 185, 96, and 223 repress selective high-density lipoprotein cholesterol uptake through posttranscriptional inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, 33, 1956-1964.
49. Wathes, D. C., Cheng, Z., Chowdhury, W., Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Morris, D. G., Patton, J. & Murphy, J. J. (2009). Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39, 1-13.
50. Xia, K., Zhang, Y., Cao, S., Wu, Y., Guo, W., Yuan, W. & Zhang, S. (2015). miR-411 regulated ITCH expression and promoted cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 70, 158-163.
51. Xu, G., Gao, Z., He, W., Ma, Y., Feng, X., Cai, T., Lu, F., Liu, L. & Li, W. (2014). microRNA expression in hepatitis B virus infected primary tree shrew hepatocytes and the independence of intracellular miR-122 level for de novo HBV infection in culture. *Virology*, 448, 247-254.