تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۶۵۹-۶۴۷

شناسایی و تجزیه و تحلیل *miRNA* ها و ایزومیرهای جدید و ژن‌های هدف آن‌ها در گاوهای شیری مبتلا به ورم‌پستان

الهام جعفری دشتی[۱]، محمدرضا بختیاری‌زاده[۲]*، عبدالرضا صالحی[۳]

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت – ایران
۲. استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت – ایران
۳. دانشیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت – ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۳۰

چکیده

ورم پستان یکی از بیماری‌های عفونی غدد پستان است که هزینه‌های زیادی را به صنعت گاو شیری تحمیل می‌کند. مکانیسم تنظیمی این بیماری پیچیده بوده و تحت کنترل ژن‌های تنظیمی مختلفی قرار دارد. در مطالعه حاضر، به منظور درک بهتر عناصر تنظیمی درگیر در بیماری ورم پستان، نمونه‌های شیر گاوهای سالم و آلوده در طی سری زمانی صفر، ۱۲، ۲، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی جمع‌آوری شد. داده‌های *miRNA-seq* از نمونه‌های شیر به‌دست آمد و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی پیشرفته، *miRNA*های جدید، ژن‌های هدف آن‌ها، عملکرد احتمالی آن‌ها، ایزومیرها و همچنین **miRNA*های جدید شناسایی شد. نتایج منجر به شناسایی نود و دو *miRNA* جدید شد که تعداد بیست و شش *miRNA* دارای ژن همولوگ و شصت و شش *miRNA* فاقد ژن همولوگ در دیگر گونه‌ها بود. بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های هدف، مؤید نقش *miRNA*های جدید در بسیاری از مکانیسم‌های مقابله با التهاب و آلودگی از جمله، پاسخ به تحریکات داخلی و خارجی، مرگ سلولی و تولید ایمنوگلوبین است. همچنین علاوه بر این، صد و سی و پنج **miRNA* جدید نیز شناسایی شد. در مطالعه حاضر ۴۹۳ ایزومیر جدید شناسایی شد که در گونه‌هایی نظیر انسان و موش دارای عملکردهای مرتبط با ایمنی می‌باشند. براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، ژن‌های هدف *miRNA*های جدید در مسیرهای مرتبط با بیماری ورم پستان از جمله ایمنی، مرگ سلولی و التهاب نقش دارند و این مطلب می‌تواند مؤید نقش احتمالی و تنظیمی *miRNA*های جدید شناسایی شده در بروز ورم پستان باشد.

کلیدواژه‌ها: التهاب، ایمنی، توالی‌یابی نسل بعد، سیستم پستانی، *miRNA-seq*

* نویسنده مسئول Email: mrbakhtiari@ut.ac.ir

مقدمه

ورم پستان بیماری عفونی غدد پستان است که موجب التهاب بافت پارانشیم، تغییرات نامناسب در این عضو و همچنین تغییرات فیزیکی و شیمیایی در شیر می‌شود و از طریق باکتری‌های گرم منفی (نظیر ای-کولای) و باکتری‌های گرم مثبت (نظیر استافیلوکوکوس ارئوس) ایجاد می‌شود [۱]. به منظور کنترل و درمان این بیماری، مطالعات ژنتیکی و غیرژنتیکی متعددی انجام شده است. یکی از بحث‌های مهم شناخت سازوکار و فاکتورهای تنظیمی مؤثر در این بیماری است. فاکتورهای تنظیمی مختلفی از جمله *RNA* کوچک (*miRNA*) شناسایی شده است. *miRNA*، *RNA* کوچک غیرکدکننده با طول ۲۲-۱۹ نوکلئوتید است که توسط *RNA* پلیمراز *II* رونویسی شده و *pri-miRNA* (*Primary miRNA*) تولید می‌شود. سپس، روی این توالی پردازش انجام داده و *pre-miRNA* (*precursor miRNA*) ساخته می‌شود. این توالی دو رشته‌ای از هسته به سیتوپلاسم انتقال یافته و سپس با پردازش بیشتر و درنهایت باز شدن دو رشته از یکدیگر دو رشته مستقل ایجاد می‌شود، ولی فقط یک رشته به *miRNA* بالغ تبدیل‌شده و رشته مقابل با نام *miRNA** شناخته می‌شود. درنهایت رشته بالغ توسط کمپلکس *RISC* (*RNA-induced silencing comple*) و از طریق جفت شدن دو الی هشت باز در منطقه ´۵ خود با نواحی مکمل غیرترجمه شونده در انتهای ´۳ *mRNA* هدف متصل شده و آن‌ها را خاموش می‌کند و یا اینکه با تحریک رونویسی، عمل تنظیمی خود را روی بیان ژن‌ها ایفا می‌نمایند. لذا، از این طریق در طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی از نظر رشد، مرگ سلولی، تنظیم ایمنی ذاتی و اکتسابی و همچنین عفونت‌های ویروسی نقش دارد [۲ و ۳]. توالی‌های متنوعی تحت عنوان ایزومیر (*Isomir*) می‌توانند از *pre-miRNA* های یکسان ساخته شوند که هدف‌های متفاوتی را دنبال می‌کنند. ایزومیرها اغلب می‌توانند به وسیله جابه‌جایی مکان برش آنزیم‌های دایسر (*Dicer*) و دروشا (*Drosha*) و همچنین اضافه شدن نوکلئوتید در انتهای ´۳ توالی ایجاد شوند، گروه‌بندی کامل ایزومیرها در جدول ۱ ارائه شده است [۴].

جدول ۱ . انواع ایزومیرها

گروه‌بندی	توالی
Pre-miRNA (۴۰-۷۰ نوکلئوتیدی)	TCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTCTGACA
۱) miRNA بالغ استاندارد	CAACACCAGTCGATGGGCTGT
۲) ایزومیر با اضافه شدن باز برخلاف الگو (NTA)	CAACACCAGTCGATGGGCTGTAA
۳) ایزومیر با کوتاه شدن خوانش در انتهای ´۳ (lv3pT)	CAACACCAGTCGATGGGC
۴) ایزومیر با اضافه شدن باز در انتهای ´۳ متناسب با الگو (lv3pE)	CAACACCAGTCGATGGGCTGT
۵) ایزومیر با کوتاه شدن در انتهای ´۵ (lv5pT)	ACACCAGTCGATGGGCTG
۶) ایزومیر با اضافه شدن باز در انتهای ´۵ متناسب با الگو (lv5pE)	GGCAACACCAGTCGATGGGCTGT
۷) ایزومیر با چندین تنوع (mv)	GCAACACCAGTCGATGGGCTG

اساس نقش *miRNA* ها در تنظیم ایمنی ذاتی و اکتسابی به خوبی بررسی شده است، به‌طوری‌که پیش‌بینی می‌شود، این ژن‌ها به تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی سلول‌های اپیتلیال در هر مرحله از ورم پستان را تنظیم نمایند که می‌تواند نماینده نقش *miRNA* در این ناهنجاری باشد [۱]. در یک تحقیق، تفاوت در بیان چهارده *miRNA* مرتبط با ایمنی داخلی و عملکردهای سلولی پستان در مقابل آلودگی غدد پستان با باکتری استافیلوکوکوس اوبریس معنی‌دار بود [۵].

اولین بار در سال ۱۹۹۳ دو *miRNA* به نام‌های *let-7* و *lin-4* در گونه‌ی *c.elegans* شناسایی شد. باتوجه به اهمیت این ژن‌ها در سازوکارهای تنظیمی مطالعات زیادی به منظور شناسایی بیشتر *miRNA* ها انجام شد [۶]. از سال ۲۰۰۵ فناوری توالی‌یابی نسل بعد، *NGS* (*Next Generation Sequencing*) به طور قابل توجهی هزینه و زمان شناسایی *miRNA* های جدید را کاهش داد و در موضوع مطالعات پزشکی و دارویی تغییرات زیادی ایجاد کرد. با کمک این فناوری اساس نقش *miRNA* ها در تنظیم ایمنی ذاتی و اکتسابی نیز به خوبی بررسی شده است، به‌طوری‌که پیش‌بینی می‌شود، ژن‌های هدف *miRNA* پاسخ‌های ایمنی ذاتی سلول‌های اپیتلیال در مراحل تولید و ترشح سیتوکین/کموکاین در مقابل ورم پستان را تنظیم نماید که می‌تواند بیانگر نقش *miRNA* در این ناهنجاری باشد [۱]. در مطالعه‌ای دیگر به بررسی نقش *miRNA* هایی همچون *miR-223*، *miR-31* و *miR-181a* در تنظیم سیستم ایمنی و دیگر مسیرهای بیولوژیکی مؤثر در ورم پستان از جمله متابولیسم چربی، رشد و مرگ سلولی در بافت پستانی آلوده به ورم پستان پرداخته شد و نتایج حاکی از آن بود که این *miRNA* ها با تنظیم ژن‌های موثر در این مسیرها مرتبط با ورم پستان هستند [۵]. *miR-155* و *miR-146* *miRNA* هایی هستند که در طی ورم پستان بیان آن‌ها در لنفوسیت‌های *B* و *T* افزایش یافته و به مقابله با آلودگی‌های باکتریایی می‌پردازند [۵]. به‌طورکلی، *miRNA* های مختلف می‌توانند از طریق تنظیم ژن‌های مسیر ایمنی، التهاب و مرگ سلولی در طی ورم پستان مؤثر باشند. همچنین، مطالعاتی به بررسی مستقیم ژن‌ها در ورم پستان پرداخته‌اند که بارزترین این ژن‌ها *TLR* هایی همچون *TLR-2* و *TLR-4* هستند که جزء اولین ژن‌های ایمنی ذاتی بیان شده در طی ورم پستان هستند [۷].

باتوجه به بانک اطلاعاتی *miRBase* (مرجعی مناسب برای توالی *miRNA* های شناسایی شده) طی ۲۰ سال گذشته تعداد *miRNA* های شناسایی شده در کلیه گونه‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافته است. با شناسایی بیشتر ایزومیرها و *miRNA* های جدید می‌توان اطلاعات بیشتر در زمینه نقش تنظیمی *miRNA* کسب نمود. باتوجه به اهمیت نقش *miRNA* در ورم پستان، شناسایی *miRNA* های جدید در درک بهتر سازوکارهای تنظیمی مرتبط با این بیماری مؤثر است. هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی *miRNA*های جدید، **miRNA* و همچنین ایزومیرهای جدید موجود در داده‌های *miRNA-seq* ورم‌پستان با استفاده از روش‌های مختلف بیوانفورماتیکی است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از داده‌های موجود در بخش *GEO* سایت *NCBI* با شماره دسترسی *GSE51858* استفاده شد که در آن از شیر پنج گاو هلشتاین آلوده از طریق پستانک‌های راست جلویی با ۵۰۰ واحد کلنی عامل ورم‌پستانی استافیلوکوکوس اوبریس در سری زمانی صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶

و ۴۸ ساعت پس از آلودگی و همچنین از شیر پنج گاو هلشتاین سالم از نظر بالینی در همان سری زمانی نمونه‌برداری شده بود. همچنین با استفاده از پلت فرم *Illumina HiSeq2000* توالی نمونه‌های موردنظر به صورت خوانش‌های ۵۰ بازی توالی‌یابی شده است[۸]. باتوجه به هدف که شناسایی *miRNA*ها، ایزومیرها و *miRNA**های جدید در بافت پستانی و بیماری ورم پستان است از داده‌های هر دو گروه همراه با یکدیگر برای شناسایی این ژن‌ها استفاده شد. در مطالعه‌ای که داده‌ها از آن استفاده شده است به بررسی بیان متفاوت *miRNA*ها در دو حالت بیمار و سالم انجام شده است که در مطالعه حاضر این آنالیز تکرار نشد.

ابتدا کیفیت نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC (نسخه 0.10.0) بررسی شد. سپس به منظور حذف توالی‌های آداپتور ´۳ از نرم‌افزار Cutadapt (نسخه ۱/۲) استفاده شد و بعد از حذف آلودگی‌ها، خوانش‌های با طول کمتر از ۱۸ نوکلئوتید حذف شدند. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار Fastq Quality Filter (نسخه 0.13.2) خوانش‌های با کیفیت کم (*phred*< ۲۰) حذف شدند. درنهایت، خوانش‌هایی که مراحل مذکور را با موفقیت گذراندند، به وسیله از نرم‌افزار Bowtie (نسخه 1.1.2) و بدون درنظر گرفتن mismatch با ژنوم گاو (UMD3.1) هم‌ردیف شدند. فقط خوانش‌هایی که با یک مکان از ژنوم هم‌ردیف شده بودند درنظر گرفته شد. توالی ژنوم گاو از بانک اطلاعاتی Ensemble دریافت شد.

خوانش‌های هم‌ردیف شده در مرحله قبل به منظور شناسایی *miRNA* های جدید به وسیله نرم‌افزار Mirdeep2 (نسخه 0.0.5) بررسی شدند. این نرم‌افزار خوانش‌های هم‌ردیف شده با ژنوم را با به کارگیری الگوریتم‌های مختلف بررسی و *miRNA* های شناخته شده و جدید را مشخص می‌نماید. در تحقیق حاضر، توالی *miRNA* های بالغ شناخته شده در گاو و سایر گونه‌ها از بانک اطلاعاتی *miRBAse* (نسخه ۲۱) استخراج شد.

نرم‌افزار Mirdeep2 از روش‌های آماری بیزی به منظور امتیاز دادن به ساختارهای شناخته شده استفاده می‌نماید. شناسایی *miRNA* ها در چند مرحله بررسی شد: ۱) انطباق خوانش‌های هم‌ردیف شده با ژنوم با *miRNA* های شناخته شده در گاو و گزارش *miRNA* های شناخته شده. با توجه به اینکه هدف تحقیق، شناسایی *miRNA* های جدید می‌باشد خوانش‌های مربوط به این ژن‌ها حذف شدند. ۲) انطباق خوانش‌های هم‌ردیف شده با ژنوم با *miRNA* های شناخته شده در دیگر گونه‌های حیوانی به منظور شناسایی *miRNA* های جدید حفاظت شده در گاو که دارای همولوگ در سایر گونه‌ها می‌باشند. پس از شناسایی خوانش‌های همولوگ با *miRNA* های شناخته شده در سایر گونه‌های حیوانی، ساختار ثانویه آن‌ها نیز توسط نرم‌افزار RNAfold بررسی شد تا ساختار ثانویه مشابه با *miRNA* ها داشته باشند. در این تحقیق، فقط کاندیدهای جدید شناسایی شده با امتیاز بیشتر از پنج که حداقل ۵۰ خوانش با آن‌ها مرتبط بود و همچنین دارای ساختار ثانویه معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵)، به‌عنوان *miRNA* های جدید انتخاب شدند که تحت عنوان *miRNA* های جدید دارای همولوگ خوانده می‌شوند. مقادیر مورد استفاده برای فیلتر *miRNAs* کاذب براساس مطالعات قبلی درنظر گرفته شد [۳]. ۳) در نهایت خوانش‌هایی که مرتبط با *miRNA* های شناخته شده در گاو و سایر گونه‌های حیوانی نبودند به منظور شناسایی *miRNA* های جدید که دارای همولوگ در دیگر گونه‌های حیوانی نیستند، مورد بررسی بیشتر قرار

گرفتند. بدین‌منظور با استفاده از نرم‌افزار مذکور ساختار ثانویه این توالی‌ها بررسی و ویژگی‌های این ساختارها با ویژگی‌های *miRNA* های شناخته شده مقایسه و امتیاز داده شد. به منظور افزایش صحت نتایج فقط کاندیدهای جدید شناسایی شده با امتیاز بیشتر از ۱۰ که حداقل ۱۰۰ خوانش با آن‌ها مرتبط بود و همچنین دارای ساختار ثانویه معنادار ($P<۰/۰۵$) بودند، به‌عنوان *miRNA* های جدید انتخاب شدند که تحت عنوان *miRNA* های جدید بدون همولوگ خوانده می‌شوند.

همچنین این احتمال وجود دارد که تعدادی از خوانش‌های توالی‌یابی شده مربوط به دیگر *RNA* های غیرکدکننده (مانند *tRNA*، *rRNA*، *snRNA* و غیره) باشند. به منظور حذف این توالی‌ها ابتدا خوانش‌ها در برابر بانک اطلاعاتی Rfam بررسی شده و خوانش‌های دارای شباهت با ژن‌های موجود در این بانک اطلاعاتی حذف شدند.

در این مرحله، با استفاده از نرم‌افزار *sRNAbench* ساختارهای ثانویه‌ای که تنها یک *miRNA* در یکی از بازوهای آن شناخته شده است، بررسی شد. درنتیجه با استفاده از توالی‌های *miRNA* های بالغ و *pre-miRNA* های شناخته شده در گاو خوانش‌های هم ردیف شده با ژنوم به منظور شناسایی **miRNA* جدید در گاو مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. برای *pre-miRNA* های که دارای یک *miRNA* بالغ شناخته شده در یکی از بازوهای خود بودند و در بازوی دیگر دارای خوانش هم ردیف شده بودند، **miRNA* جدید گزارش شد.

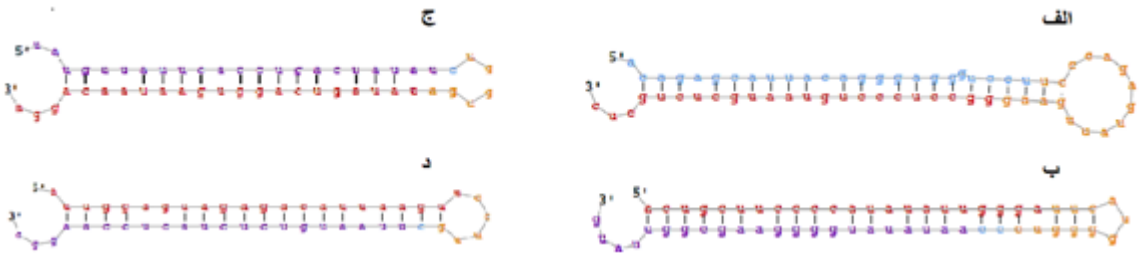
در ادامه به منظور شناسایی ایزومیرهای بیان شده در بیماری ورم‌پستان از نرم‌افزار *sRNAbench* استفاده شد. نرم‌افزار *sRNAbench* از طریق هم‌ردیف کردن خوانش‌ها با ژنوم یا توالی *pre-miRNA* با استفاده از نرم‌افزار Bowtie، قادر به شناسایی ایزومیرهای موجود در داده‌های *miRNA-seq* است. بدین‌منظور خوانش‌ها مجدداً با ژنوم گاو و به وسیله نرم‌افزار Bowtie هم‌ردیف شدند و براساس الگوریتم جستجوی ایزومیرها در نرم‌افزار *sRNAbench* ایزومیرها شناسایی شدند. انواع ایزومیرهای مورد بررسی در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

به منظور شناسایی ژن‌های هدف *miRNA* های جدید شناسایی شده (دارای همولوگ و بدون همولوگ) توالی‌های *3′ UTR* مربوط به *mRNA* ها در گاو از بانک اطلاعاتی Ensembel استخراج و از سه نرم‌افزار مختلف پیش‌بینی هدف شامل TargetSpy (نسخه 1.1) [۹]، *Miranda* (نسخه 3.3a) و *PITA* (نسخه 6) استفاده شد [۱۰]. با توجه به زیاد بودن درصد مثبت دروغین در نتایج پیش‌بینی هدف برای *miRNA* ها فقط اهدافی که توسط هر سه نرم‌افزار تأیید شدند، گزارش شد. به دلیل اینکه نتایج این بخش منجر به شناسایی چندین ژن هدف بالقوه برای هر *miRNA* خواهد شد، با بررسی گروه‌های کارکردی معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) که ژن‌های هدف هر *miRNA* در آن مؤثرند می‌توان به نقش احتمالی *miRNA* های جدید پی برد. بنابراین، در ادامه با هدف بررسی گروه‌های کارکردی و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با ژن‌های هدف هر *miRNA* از بانک اطلاعاتی DAVID (نسخه 6.7) و با به‌کارگیری پارامترهای پیش‌فرض استفاده شد.

نتایج و بحث

داده‌های *miRNA-seq* مورد استفاده در این تحقیق شامل ۳۹۲,۷۶۴,۸۳۳ خوانش بود. بعد از کنترل کیفیت داده‌ها آلودگی‌های آداپتوری با استفاده از نرم‌افزار Cutadapt حذف شد و تعداد خوانش ها به ۳۷۸،۹۷۵،۶۰۲ کاهش

پیدا کرد (۷۲/۲ درصد). همچنین بازهای با کیفیت کم با استفاده از نرم‌افزارهای دیگری از جمله *Fastq Quality Filter* و *Fastq Quality Trimmer* حذف شد و تعداد خوانش‌ها به ۲۱۴،۶۷۱،۶۰۱ کاهش یافت (۹۹/۸ درصد). خوانش‌های کنترل کیفیت شده دارای طول در محدوده ۱۸ الی ۴۶ نوکلئوتید بود. سپس این خوانش‌ها با ژنوم مرجع گاو (*UMD3.1*) هم‌ردیف شدند. تعداد خوانش‌های هم‌ردیف شده با ژنوم برابر با ۰۷۹،۹۵۳،۳۱۲ (۵۱/۹ درصد) بود. با استفاده از داده‌ها و روش مورد استفاده در این تحقیق، به‌طورکلی یک هزار و صد و هفتاد و سه *miRNA* جدید شناسایی شد. بعد از در نظر گرفتن *miRNA* های دارای ساختار ثانویه معنی‌دار (P<۰/۰۵) تعداد آن‌ها به ۷۰۱ عدد کاهش یافت. از این تعداد، سیصد و بیست و سه *miRNA* دارای همولوگ در سایر گونه‌ها است. پس از اعمال محدودیت در مورد تعداد خوانش و امتیاز مربوطه تعداد بیست و شش *miRNA* دارای همولوگ شناسایی شد. همچنین از هفتصد و یک *miRNA* دارای ساختار ثانویه معنی‌دار تعداد سیصد و هفتاد و هشت *miRNA* فاقد *miRNA* همولوگ در سایر گونه‌ها بود. در رابطه با این *miRNA* های جدید بدون همولوگ نیز بعد از اعمال محدودیت‌های مذکور تعداد به شصت و شش *miRNA* جدید بدون همولوگ کاهش یافت. تعداد زیاد خوانش‌های مرتبط با برخی از *miRNA* های جدید بدون همولوگ در سایر گونه‌ها می‌تواند بالا بودن بیان آن‌ها و جدید بودن آن‌ها در گونه‌ی گاو را تأئید نماید. به عبارت دیگر، این *miRNA* های بدون همولوگ ویژه گونه گاو است و به همین دلیل در سایر گونه‌ها دارای همولوگ نیستند. وجود *miRNA* های ویژه هر گونه در سایر مطالعات مشاهده شده است [۱۱]. درنهایت، ده *miRNA* برتر از هر یک از *miRNA* های دارای همولوگ و بدون همولوگ به منظور بررسی بیشتر انتخاب شد. معیار برتری تعداد خوانشی است که متعلق به *miRNA* جدید می‌باشد. به عبارت دیگر، در بین *miRNA*های جدید شناسایی شده ۱۰ ژن با بیشترین تعداد خوانش انتخاب شدند. ساختارهای ثانویه مربوط به تعدادی از *miRNA* های دارای همولوگ و بدون همولوگ در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱ . ساختارهای ثانویه مربوط به برخی miRNA های دارای همولوگ و بدون همولوگ
الف و ب) miRNA های دارای همولوگ به ترتیب با شناسه موقت ۱۳۲۸۱_۱۸ و ۱۶۴۹۹_۱۹، ج و د) miRNA های بدون همولوگ به ترتیب با شناسه موقت ۳۹۹۵۱_۶ و ۴۱۲۷۰_۷

یکی از روش‌های پرکاربرد درک عملکردهای فیزیولوژیکی *miRNA* های جدید در مطالعات مختلف، بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های هدف آن‌ها و انتساب عملکرد غالب ژن‌های هدفشان به *miRNA* های شناسایی شده می‌باشد. بر همین اساس، ژن‌های هدف *miRNA* های جدید دارای همولوگ و بدون همولوگ بررسی شد.

پس از پیش‌بینی ژن‌های هدف مربوط به ده *miRNA* دارای همولوگ و ده *miRNA* بدون همولوگ در مجموع ۲۳،۰۰۶ ژن هدف پیش‌بینی شد. به منظور کاهش نرخ خطای مثبت دروغین هدف‌های پیش‌بینی شده برای *miRNA* های دارای همولوگ و بدون همولوگ، تنها ژن‌های مشترک شناسایی شده توسط هر سه الگوریتم، گزارش شد. بعد از اعمال این محدودیت تعداد ژن‌های شناسایی شده در هر یک از گروه‌های دارای همولوگ و بدون همولوگ به‌ترتیب ۸۴۳,۲ و ۶۸۳,۲ به‌دست آمد. میانگین ژن‌های هدف *miRNA* های دارای همولوژی و بدون همولوژی به‌ترتیب ۵۰۷ و ۴۲۳ ژن بود.

نتایج این بخش نشان داد که عملکرد معنادار ژن‌های هدف سیزده *miRNA* از بیست *miRNA* جدید شناسایی شده در این مطالعه در مسیرهای التهاب، ایمنی، آپوپتوزیز، پاسخ به استرس و پاسخ به تحریکات داخلی و خارجی نقش دارند که مرتبط با بیماری ورم پستان است، زیرا در بیماری ورم پستان این مسیرها کاملاً درگیر خواهند شد. آپوپتوزیز و فعال شدن پاسخ ایمنی ذاتی از جمله پاسخ‌های بسیار مهم ایمنی ذاتی در نظر گرفته می‌شوند و به‌وسیله سیستم پیچیده‌ای که در کنترل بیان ژن شرکت می‌نماید، تنظیم می‌شوند (جدول‌های ۳ و ۴) [۱۲]. همچنین ورم‌پستان به خاطر برهم زدن تعادل در حیوان به عنوان عامل استرس‌زا و محرک خارجی شناخته می‌شود و *miRNA* های دخیل در مسیرهای بیان شده با تنظیم بیان ژن‌های هدف پیش‌بینی شده عمل تنظیمی خود را ایفا می‌نمایند [۱۳].

در گروه *miRNA* های دارای همولوگ به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد ژن هدف مربوط به *miRNA* های با شناسه موقت ۲۱_۲۱۷۲۱ (۱۴۸,۱ ژن) و ۱۷_۱۲۰۱۳ (شش ژن) بود. بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های مورد هدف *miRNA* با شناسه موقت ۲۱_۲۱۷۲۱ و همولوگ *chi-miR-2284a* منجر به شناسایی ۱۸۴ عبارت بیولوژیکی معنادار شد. نتایج نشان‌دهنده نقش این *miRNA* در مسیرهای چرخه سلولی، تکثیر سلول‌های اپیتلیالی، پاسخ در برابر تحریکات داخلی و خارجی و همچنین ایمنی است. مسیرهای مطرح شده از جمله مسیرهای درگیر در بیماری ورم پستان است، زیرا در طی ورم پستان تکثیر سلولی افزایش یافته و این بیماری به عنوان یک تحریک و التهاب در بدن گاو شناخته می‌شود [۱۴]. دیگر *miRNA* برتر در گروه *miRNA*های دارای همولوگ *miRNA* با شناسه موقت ۶۶۵۸_۱۳ و همولوگ *oan-miR-1388-3p* است. در طی مسیرهای ایمنی این *miRNA* به تنظیم ژن‌های تولیدکننده سیتوکین‌های التهابی و همچنین کموکاین‌ها پرداخته و در پاسخ‌های ایمنی نقش بارزی را ایفا می‌کند. از آنجایی‌که در ورم پستان ایمنی از جمله مسیرهای درگیر در این بیماری است، به همین خاطر این *miRNA* جدید از طریق نقش در این مسیر با ورم پستان مرتبط است.

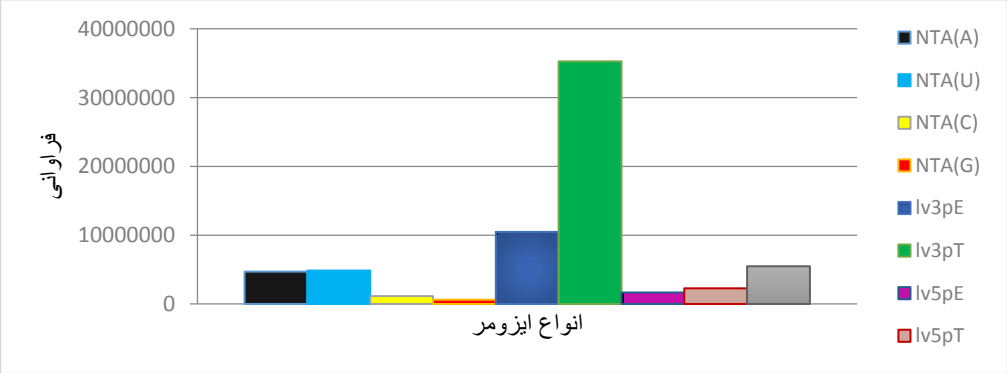
در بین *miRNA* های بدون همولوگ نیز *miRNA* های با شناسه موقت ۱_۱۸۷۲۰ (۱۰۹۸ ژن) و ۲۶_۲۷۷۰۱ (۴۸ ژن) به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد ژن هدف را در بین *miRNA* های این گروه داشتند. بررسی گروه‌های کارکردی ژن‌های مورد هدف *miRNA* با شناسه موقت ۱_۱۸۷۲۰ نشان‌دهنده عملکرد تنظیمی آن روی ژن‌های درگیر در مسیرهای چرخه سلولی، مرگ سلولی، آپوپتوزیز و پاسخ در برابر محرکات شیمیایی مرتبط با ورم پستان بود. در طی ورم‌پستان آپوپتوزیز و مرگ سلولی به‌دلیل از بین بردن سلول‌های التهابی در بافت افزایش یافته و از این‌رو، این *miRNA* با تنظیم ژن‌های این مسیر در بیماری ورم پستان درگیر است [۱۵]. دیگر *miRNA* بدون همولوگ شناخته

شده در این مطالعه *miRNA* با شناسه موقت ۳_۳۴۰۵۵ است. ژن‌های هدف این *miRNA* در مسیرهایی همچون پاسخ به استرس و تحریکات خارجی، تنظیم متابولیسم چربی، ترمیم *DNA*، تجمع و چسبندگی سلولی نقش ایفا می‌کنند. با توجه به اینکه هر عاملی که در بدن موجب برهم زدن تعادل شود، نوعی عامل استرس شناخته می‌شود از این‌رو، ورم پستان در گاو نیز نوعی استرس محسوب می‌شود [۱۳]. این *miRNA* به نوعی با تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به استرس می‌تواند با این بیماری مرتبط باشد. متابولیسم چربی دیگر مسیر مرتبط با ورم‌پستان است، زیرا در طی این بیماری متابولیسم چربی کاهش می‌یابد و از این طریق تمامی ژن‌ها و عوامل تنظیم‌کننده آن‌ها در ورم‌پستان درگیر خواهند شد [۱۶]. لذا، این *miRNA* نیز به نوعی دیگر با این بیماری ارتباط پیدا کرده است. به‌طورکلی، ۴۹۳ ایزومیر برای کل *miRNA* های شناخته شده شناسایی شد. سپس ایزومیرهای با فراوانی کم که می‌توانند مربوط به خطا در توالی‌یابی یا همردیفی اشتباه باشند، با اعمال پارامترهای سخت‌گیرانه حذف شد [۱۷].

عمده‌ترین نوع ایزومیر در بین ایزومیرهای شناسایی شده تنوع‌های طولی ′۳ بود (شکل ۲). نتایج ۱۰ ایزومیر غالب مورد بررسی توسط نرم‌افزار *sRNAbench* را نشان می‌دهد که در تحقیق حاضر نیز بررسی شد و در بین ۱۰ ایزومیر مورد بررسی، هفت ایزومیر در مطالعات مختلف به عنوان ایزومیر جدید در سایر گونه‌ها از جمله انسان، موش و خوک نیز شناسایی شده‌اند (جدول ۲) [۱۸]. ایزومیر *miR-21-5p* بالاترین خوانش (۲۴۲،۷۸۱،۱۸ خوانش) را در میان ایزومیرهای شناسایی شده به خود اختصاص داد. در مطالعات مختلف افزایش بیان ایزومیرهای *miR-21-5p* دارای عملکرد مهم در تکثیر، مهاجرت، تهاجم و بقا و کاهش بیان آن‌ها موجب القاء، آپوپتوز، تکثیر سلولی و تهاجم شده است [۱۹]. باتوجه به عملکردهای تحت تنظیم این ایزومیر و نیز دقت به مطلب که در طی ورم پستان آپوپتوزیز سلول‌های درگیر بالا می‌رود تا سلول‌های التهابی از بین روند و از طرف دیگر، تهاجم سلولی در طی التهاب نیز افزایش می‌یابد، می‌توان عملکرد این ایزومیر شناخته شده را در ورم پستان توجیه کرد.

جدول ۲. ۱۰. ایزومیر برتر شناسایی شده و درصد حضور انواع تنوع‌های آن‌ها

نام	شمار خوانش	٪NTA(A)	٪NTA(U)	٪NTA(C)	٪NTA(G)	٪lv3pE	٪lv3pT	٪lv5pE	٪lv5pT	٪mv
bta-miR-21-5p	۱۸,۲۴۲,۷۸۱	۵/۵۸	۰/۲۸	۳/۳۶	۰/۸۳	۰/۰۱	۸۹/۴۹	۰/۰۴	۰/۱۳	۰/۲۳
bta-miR-142-5p	۳,۵۴۱,۹۲۱	۲/۴۹	۱/۳۷	۰/۵۶	۰/۳۰۵	۴۶/۳۷	۱/۴۰۳	۱۷/۰۸	۰/۰۲	۳۲/۸۶
bta-miR-191	۵,۸۷۰,۵۹۸	۷/۳۳	۱/۹۷	۰/۵۲	۱/۳۷	۶۲/۶۵	۱۴/۰۸	۰/۰۰۰۴	۸/۰۳	۴/۰۱
bta-miR-148a	۲,۲۸۶,۰۶۰	۱۰/۷۴	۱۳/۳۲	۰/۲۸	۰/۳۵	۶۹/۳۶	۵/۵۵	۰/۰۱۶	۰/۱۷۶	۰/۱۸۶
bta-miR-186	۱,۷۹۹,۷۲۱	۵/۵۶	۱/۵۷	۰/۱۴۴	۲/۸۲۶	۵۹/۹۵	۲۷/۴۶	۰/۱۰۷	۰/۹۶۱	۱/۳۹۴
bta-miR-30d	۱,۵۷۰,۱۹۰	۶/۷۵۰	۱۲/۰۱۴	۰/۲۱۶	۲/۴۹۳	۰/۰۶۵	۷۸/۲۵۲	۰/۰۰۱	۰/۱۴۱	۰/۰۶۴
bta-miR-423-3p	۱,۴۰۹,۹۶۱	۱۱/۵۱۲	۱۵/۹۲۵	۰/۱۲۹	۰/۴۹۸	۰/۰۱۰۷	۰/۸۹۷	۰/۰۱۹	۶۳/۴۰۵	۷/۶۰۱
bta-miR-30e-5p	۱,۶۴۲,۳۵۱	۴/۷۶۱	۲۰/۷۰۸	۰/۲۹۸	۴/۸۵۲	۰/۱۸۳	۳۹/۵۴۲	۰/۱۸۴	۲۷/۶۷۰	۱/۷۹۸
bta-miR-223	۵۳۵,۰۹۰	۳/۶۷	۲۸/۷۱۲	۰/۵۲۳	۲/۱۸	۴/۴۴۸	۵۷/۴۱۴	۰/۰۰۰۱	۰/۷۵۳	۲/۲۹۷
bta-miR-423-5p	۳۳۳,۶۷۴	۱۰/۰۱۶	۱۲/۶۶۴	۰/۱۵۴	۰/۷۱۱	۴۰/۲۷۲	۳۵/۵۶۸	۰/۰۵۹	۰/۱۴۸	۰/۴۰۴



شکل ۲ . توزیع دسته‌بندی ایزومیرهای شناسایی شده، بیشترین فراوانی مربوط به ایزومیرهای دارای تنوع طولی در ´۳ (IV3pT) می‌باشد. علائم اختصاری نام ایزومیرها در جدول ۱ بیان شده است.

باتوجه به مطالعات انجام شده روی ایزومیرهای *miR-142-5p* در انسان، عملکرد این ایزومیر در مسیرهای سیگنال‌دهی از جمله چرخه سلولی، تنوع سلولی، *MAPK* و بسیاری از مسیرهای مرتبط با سرطان از جمله پاسخ‌های ایمنی کنترل‌کننده فعالیت لکوسایت‌ها و پاسخ‌های التهابی تأیید شده است. التهاب و ایمنی بارزترین فرایندهای درگیر در ورم پستان است و از طرف دیگر، این ایزومیر با نقش تنظیمی خود در این فرایندها نقش تنظیمی خود را در این بیماری توجیه می‌کند. بررسی‌های انجام شده روی ایزومیرهای *miR-191* نیز نشان‌دهنده نقش این ایزومیر در ایمنی ذاتی و اکتسابی بوده است [۲۰]. ایزومیرهای این *miRNA* نیز باعث کاهش تکثیر سلولی و رشد تومور می‌شود [۲۱]. باتوجه به مطالبی که بیان شد، نقش این ایزومیر در ایمنی ذاتی و اکتسابی و همچنین تنظیم تکثیر سلولی، رابطه تنظیمی این ایزومیر را در ورم پستان روشن می‌کند. مطالعات صورت گرفته بر روی ایزومیرهای *miR-148a* در موش بیانگر نقش آن در تکثیر سلولی، تنوع سلولی و آپوپتوزیز می‌باشد [۲۲]. تکثیر سلولی و آپوپتوزیز سلول‌های پستان در طی ورم پستان القا شده و زیاد می‌شود [۲۳]، باتوجه به این مطلب این ایزومیر با تنظیم این مسیرها می‌تواند در ورم‌پستان درگیر باشد و عملکرد تنظیمی خود را ایفا کند. دیگر ایزومیر شناسایی شده *miR-186* است که در انسان به عنوان یک مهارکننده تومور شناخته شده است [۲۴]. این ایزومیر یک مهارکننده رشد، تنظیم‌کننده تکثیر و تهاجم سلولی است و در تنوع سلولی نیز نقش دارد. از مهمترین عملکردهای شناخته شده این ایزومیر القای آپوپتوزیز است [۲۵]. همان‌طورکه پیشتر بیان شد، در طی ورم پستان تهاجم سلولی، آپوپتوزیز و تکثیر سلولی درگیر خواهند شد، از این‌رو *miRNA* مذکور می‌تواند از طریق تنظیم ژن‌های این مسیر در ورم پستان نقش داشته باشد.

ایزومیرهای شناسایی شده در مطالعه حاضر مربوط به گاوهای مبتلا به ورم پستان و سالم می‌باشد که در آن‌ها سیستم ایمنی و پاسخ‌های دفاعی فعال بوده و سازوکارهای تنظیمی مربوطه نیز فعال می‌باشد. نقش این ایزومیرها نیز در مطالعات قبلی در دیگر گونه‌ها نیز مؤید همین نقش برای آن‌هاست که می‌تواند به عنوان تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر باشد. بنابراین، نتایج مطالعات مختلف حاکی از آن است که *miRNA* ها با تغییر توالی خود ژن‌های مختلفی را در مسیرهای بیولوژیکی متفاوت مانند ورم پستان تنظیم می‌کنند.

همچنین با استفاده از نرم‌افزار *sRNAbench* انواع *miRNA** های جدید موجود در ژنوم گاو شناسایی شد. به منظور نام‌گزاری *miRNA** های جدید براساس نام *pre-miRNA* آن‌ها و مکان آن‌ها روی ساختار سنجاق سری، از اضافه کردن *p*-۳ و *p*-۵ در انتهای نام آن‌ها استفاده می‌شود. این *miRNA** ها در بازوی مقابل *miRNA* های شناخته شده در *pre-miRNA* هایی است که تنها یک *miRNA* آن شناخته شده است. تعداد *miRNA** های جدید شناسایی شده با استفاده از داده‌های مورد استفاده در این مطالعه ۱۳۵ عدد بود و با انتخاب *miRNA** های با بیان بیش از ۵۰ خوانش، این تعداد به ۷۳ عدد کاهش پیدا کرد.

پس از بررسی *pre-miRNA* این *miRNA** در بانک اطلاعاتی *miRBase* مشخص شد که در همه این هفتاد و سه *pre-miRNA* تنها یک *miRNA* گزارش شده است و *miRNA** شناسایی شده در این مطالعه دقیقاً در بازوی مقابل *miRNA* گزارش شده در این بانک اطلاعاتی است.

باتوجه به حفاظت شده بودن ساختار *miRNA*ها در دیگر گونه‌ها و مطالعات بیشتر در گونه‌هایی همچون انسان و موش به مقایسه ساختار *pre-miRNA* مربوط به این ۷۳ ژن در دو گونه انسان و موش پرداخته شد.

هدف از این بررسی، این امر است که آیا برای این ۷۳ ژن در این دو گونه دو *miRNA* در هر دو بازو گزارش شده است یا خیر؟ نتایج بررسی نشان داد که از بین هفتاد و سه *miRNA** مورد بررسی، پنجاه و هشت *pre-miRNA* در انسان و پنجاه و سه *pre-miRNA* در موش دارای دو *miRNA* در هر دو بازوی خود هستند. این نتایج تأییدی بر نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر است. به عبارت دیگر، هفتاد و سه *miRNA** گزارش شده هم در بافت پستانی گاوهای شیری بیان داشته و اکثراً در دیگر گونه‌ها نیز از قبل گزارش شده‌اند که این دلایل امکان اعتماد به نتایج حاصله را بیشتر می‌کند.

جدول ۳ . بررسی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده و مسیرهای تنظیم‌شونده توسط ۱۰ miRNA دارای همولوگ

شناسه موقت miRNA	ژن‌های هدف پیش‌بینی شده	مسیرهای تنظیم شونده توسط miRNA (مرتبط با ورم پستان)[1]	miRNA همولوگ
۱۲۰۱۳_۱۷	۶	_	mmu-miR3960
۱۴_۷۷۰۶	۲۹۱	پاسخ به تحریکات خارجی	hsa-miR-7705
۱۳_۶۶۵۸	۴۸۰	چرخه سلولی، تولید سیتوکین	oan-miR-1388-3p
۱۳_۵۵۷۹	۳۱۹	رشد سیستم ایمنی، تولید ایمنوگلوبین، پاسخ به تحریکات	efu-miR-9248
۱۰_۱۷۸	۳۰۸	پاسخ به تحریکات خارجی، تنظیم پاسخ به استرس	oan-miR-1356
۲۱_۲۱۷۴۴	۹۰۷	پاسخ به محرک هورمون استروئید	chi-miR-2284a
۲۱_۲۱۷۲۱	۱۰۸۰	رشد سیستم ایمنی، تنظیم تکثیر سلول اپیتلیال، پاسخ به محرک شیمیایی	chi-miR-2284a
۱۷_۱۲۳۵۵	۲۹۰	مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، تنظیم فرایندهای سلولی	mmu-miR-1968-5p
۱۱_۲۲۷۰	۹۳۵	تنظیم فرایند سلولی، تنظیم فرایند سیستم ایمنی، پاسخ به محرکات شیمیایی	hsa-miR-548n
۳_۳۴۶۸۵	۲۰۹	تنظیم چرخه سلولی	hsa-miR-637

۱ – مسیرهای بیان‌شده بر اساس گروه‌های کارکردی ژن‌های هدف مربوط به هر یک از miRNA ها می‌باشد که برخی از آن‌ها ارائه شده است.

جدول ۴ . بررسی ژن‌های هدف پیش‌بینی شده و مسیرهای تنظیم‌شونده توسط ۱۰ miRNA بدون همولوگ

شناسه موقت	ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده	مسیرهای تنظیم‌شونده توسط miRNA (مرتبط با ورم پستان)
۳_۳۴۰۵۵	۵۸۲	چرخه سلولی، پاسخ سلولی به استرس، پاسخ سلولی به محرکات
X_۴۷۳۱۹	۱۵۴	فرایندهای سلولی
۲۶_۲۷۷۰۱	۴۷	_
۱۰_۱۲۳۲	۱۰۸	فرایندهای سلولی
۹_۴۵۵۵۱	۶۹۳	فرایندهای سلولی، فرایندهای چرخه سلولی، پاسخ به تحریکات خارجی
۱۹_۱۷۵۱۶	۴۳۵	فرایندهای سلولی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، پاسخ به تحریکات شیمیایی، پاسخ به استرس
۳_۳۳۶۶۵	۱۶۹	تنظیم فرایندهای سلولی
X_۴۷۲۹۴	۴۹۴	پاسخ ایمنی، فرایند سیستم ایمنی، مسیر سیگنال‌دهی سیتوکین‌ها
۲۷_۲۸۲۶۵	۲۹۰	فرایندهای سلولی
۱_۱۸۷۲۰	۱,۰۳۲	پاسخ به تحریکات شیمیایی، تنظیم مرگ سلول، آپوپتوزیز، فرایند چرخه سلولی

براساس نقش مرتبط ژن‌های هدف miRNAهای شناسایی شده در این مطالعه با ورم پستان (مانند التهاب، کنترل پاسخ‌های ایمنی و آپوپتوزیز) می‌توان بیان کرد که miRNAهای شناسایی شده در این مطالعه دارای اهمیت زیادی می‌باشند. با توجه به اهمیت نقش تنظیمی miRNAها روی ژن‌های مؤثر در ورم پستان، شناسایی بیشتر miRNAهای جدید همچون مطالعه حاضر ما را در درک بهتر سازوکارهای تنظیمی مرتبط با این بیماری یاری می‌نماید.

منابع

1. Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, et al. (2014) Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. BMC Genomics. 15: 181-183.

2. Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X (2014) Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. BMC Genomics. 15: 1-3.

3. Xu G, Gao Z, He W, Ma Y, Feng X, et al. (2014) microRNA expression in hepatitis B virus infected primary treeshrew hepatocytes and the independence of intracellular miR-122 level for de novo HBV infection in culture. Virology. 448: 247-254.

4. Lu S, Sun Y-H and Chiang VL (2009) Adenylation of plant miRNAs. Nucleic Acids Research: gkp031.

5. Naeem A, Zhong K, Moisá S, Drackley J, Moyes K, et al. (2012) Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with Streptococcus uberis. Journal of Dairy Science. 95: 6397-6408.

6. Gigli I and Maizon DO (2013) microRNAs and the mammary gland: a new understanding of gene expression. Genetics and Molecular Biology. 36: 465-474.

7. Li R, Zhang C-L, Liao X-X, Chen D, Wang W-Q, et al. (2015) Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with Staphylococcus aureus. International Journal of Molecular Sciences. 16: 4997-5013.

8. Lawless N, Reinhardt TA, Bryan K, Baker M, Pesch B, et al. (2014) MicroRNA regulation of bovine monocyte inflammatory and metabolic networks in an in vivo infection model. G3: Genes, Genomes, Genetics. 4: 957-971.

9. Sturm M, Hackenberg M, Langenberger D and Frishman D (2010) TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. BMC Bioinformatics. 11: 292-309.

10. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U and Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nature Genetics. 39: 1278-1284.

11. Le Guillou S, Marthey S, Laloë D, Laubier J, Mobuchon L, et al. (2014) Characterisation and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes. PloS One. 9: 3-8.

12. Zheng Y, Chen K-l, Zheng X-m, Li H-x and Wang G-l (2014) Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows. Cell Stress and Chaperones. 19: 973-981.

13. Hopster H, Van der Werf JT and Blokhuis HJ (1998) Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 66: 83-97.

14. Chang BS, Bohach GA, Lee S, Davis WC, Fox LK, et al. (2005) Immunosuppression by T regulatory cells in cows infected with Staphylococcal superantigen. Journal of Veterinary Science. 6: 247-249.

15. Long E, Capuco A, Wood D, Sonstegard T, Tomita G, et al. (2001) Escherichia coli induces apoptosis and proliferation of mammary cells. Cell Death and Differentiation. 8: 808-816.

16. Arias N, Aguirre L, Fernández-Quintela A, González M, Lasa A, et al. (2015) MicroRNAs involved in the browning process of adipocytes. Journal of Physiology and Biochemistry. 72: 509-521.

17. Farrell D, Shaughnessy RG, Britton L, MacHugh DE, Markey B, et al. (2015) The Identification of Circulating MiRNA in Bovine Serum and Their Potential as Novel Biomarkers of Early Mycobacterium avium subsp paratuberculosis Infection. PloS One. 10: e0134310.

18. Ma J, Li N, Guarnera M and Jiang F (2013) Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. Biomarker Insights. 8: 127-129.

19. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, et al. (2009) High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-β1. Breast Cancer Research and Treatment. 117: 131-140.

20. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, et al. (2012) Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. Journal of Crohn's and Colitis. 6: 900-904.

21. Peng W-Z, Ma R, Wang F, Yu J and Liu Z-B

(2014) Role of miR-191/425 cluster in tumorigenesis and diagnosis of gastric cancer. International Journal of Molecular Sciences. 15: 4031-4048.

22. Watahiki A, Wang Y, Morris J, Dennis K, O'Dwyer HM, et al. (2011) MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. PloS One. 6: e24950.

23. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, et al. (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature. 451: 1125-1129.

24. Yao K, He L, Gan Y, Zeng Q, Dai Y, et al. (2015) MiR-186 suppresses the growth and metastasis of bladder cancer by targeting NSBP1. Diagnostic Pathology. 10: 1-10.

25. Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, et al. (2008) miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. Cancer Cell. 14: 382-393.