

Alternative Splicing Analysis in Susceptible and Resilient Cattle Following Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) Infection

Fereshteh Ehsanifar¹, Gholam Reza Dashab^{1*}, Hossein Bazzi¹, Mohammad Hosein Banabazi², Hamideh Noori Sadegh¹

1. Faculty of Breeding and Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Associate Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Biosciences (HBIO), Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden.

*Corresponding Author: dashab@uoz.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/IJASR.2026.100641.1334>

Introduction: Lumpy skin disease remains a major economic burden for the cattle industry. By expanding protein functional diversity, alternative splicing can contribute to fine-tuned regulation of host immune and antiviral responses. Here we examined the temporal pattern of alternative splicing in LSDV susceptible and resilient cattle, identified key candidate genes, and asked whether pre-infection molecular differences relate to the distinct clinical outcomes observed in the two groups.

Materials and Methods: Raw single-end RNA-sequencing data were retrieved from the public ArrayExpress repository (accession number E-MTAB-12547), comprising whole-blood samples from five Holstein bulls (three susceptible and two resilient) at four time points: day -5 (pre-infection) and days 3, 7, and 15 post-infections. After quality filtering with Trimmomatic and Cutadapt, and alignment to the Ensembl ARS-UCD2.0 reference genome (release 116) using HISAT2, alternative splicing events were identified with rMATS-turbo. Analyses were performed at two levels: (1) a longitudinal paired design, in which each clinical group was independently compared with its own baseline (six paired tests), consistent with the PAIRADISE statistical framework designed for paired RNA-seq data structures; and (2) a complementary cross-sectional unpaired comparison between the two clinical groups at day -5, to identify background differences independent of infection. Statistical significance criteria were set at FDR < 0.05 and $|\Delta\text{PSI}| \geq 0.10$ (based on JC counts), and technical pseudo-replicates arising from the detection of novel splice sites were removed. Functional enrichment analysis (KEGG and GO) was performed using the DAVID database, protein-protein interaction networks were constructed in STRING, and transcription factors (TFs) were identified using AnimalTFDB (version 4.0). Final candidate genes were visually confirmed with Sashimi plots.

Results and Discussion: The longitudinal analysis identified 57 significant splicing events (23 in the susceptible group, 34 in the resilient group) with no genes shared between groups; most belonged to the RNA-splicing autoregulatory network. The resilient group followed a wave-like pattern splicing response (peaking on day 3, quiescent on day 7, and returning with a focus on *DNM2* by day 15) whereas the susceptible group showed a more continuous, broader splicing response that ultimately centered on *RAB5A* at day 15. Seven final candidate genes were prioritized using a combination of four criteria: effect size (ΔPSI), statistical significance (FDR), persistence across consecutive time points, and pathway specificity; where STRING data were available, network connectivity degree served as an additional interpretive cue. In the resilient group, *DNM2* was selected for its specific link to pathogen entry/clearance pathways, and *SRSF7* for recurring independently at two time points (days 3 and 15). In the susceptible group, *PAPOLA* showed the largest effect size in the longitudinal analysis ($\Delta\text{PSI} = 0.822$) and is implicated in mRNA surveillance; *RPS24* was the only candidate directly linked to a known viral disease (COVID-19); *XRN1* was both enriched in the RNA-degradation pathway and emerged as the hub node with the highest connectivity in the day-3 susceptible-group network; *HNRNPK*, despite a smaller

effect size, was retained for its role in the spliceosome pathway and network-level support; and *RAB5A* was included for its involvement in several pathogen entry/clearance pathways together with a significant day-15 event. Notably, *XRN1*, *HNRNPK*, and *RAB5A* have each been reported elsewhere as host targets exploited by other viruses (including influenza A and foot-and-mouth disease virus) for replication, raising the possibility of an analogous role in LSDV, though this remains speculative. Two genes, *APC* and *SOS2*, were statistically very significant but were excluded from the candidate list given their modest effect sizes and annotation across dozens of broad, non-specific pathways, a pattern typical of network hub genes. The PPI analysis lent partial support to this selection. In the susceptible group, significant networks were found on day 3 (16 nodes, 7 edges; $P = 0.001$) and day 7 (3 nodes, 1 edge; $P = 0.03$), while the resilient group's day-3 network (21 nodes, 4 edges) did not reach significance ($P = 0.07$); no edges were detected on day 15 in either group. Within the significant day-3 susceptible network, *XRN1*, *RPS24*, and *PAPOLA* formed a connected subnetwork (independent evidence for their functional relationship beyond enrichment analysis) whereas *HNRNPK* interacted only with *SRSF10*. Of the 57 identified genes, seven (*ZNF276*, *ZNF131*, *TFDP2*, *MLX*, *ZNF410*, *BCLAF1*, and *NR2C2*) were annotated as transcription factors via AnimalTFDB, none overlapping with the seven main candidates. These TF genes were enriched in two GO terms related to RNA polymerase II-mediated transcriptional regulation (5 and 4 genes respectively; Benjamini = 0.0115 and 0.0198). Given the study's limited sample size, however, this should be treated as a preliminary, exploratory pattern rather than firm evidence of a regulatory role. The complementary day -5 comparison revealed 353 significant events between the two groups, reflecting background molecular differences that predate infection; four of these genes (*SRSF7*, *HNRNPK*, *XRN1*, *RAB5A*) overlapped with the longitudinal candidates. KEGG enrichment of this gene set highlighted ribosome- and COVID-19-related pathways in the resilient group, and platelet activation, tuberculosis, and nucleocytoplasmic transport pathways in the susceptible group. At the individual-gene level, several innate immunity genes also showed differential pre-infection retention: *CLEC4D*, *IFI47*, *NMI*, and *CASP1* in the resilient group, and *STAT1*, *IFI27L2*, and *CD163* in the susceptible group—a pattern suggesting that baseline differences are concentrated around pathogen-sensing and interferon-signaling components. PPI network significance does not establish causality for any splicing event, relying only on known full-length protein interactions.

Conclusion: This study suggests that alternative splicing may act as a regulatory layer underlying the differential splicing response of cattle to LSDV, with RNA-processing machinery, pathogen entry pathways, and immune signaling all implicated (albeit through different gene sets) in both clinical groups. Pre-infection molecular differences further point to a potential biomarker for predicting susceptibility or resistance. Given the limited sample size (three susceptible versus two resilient animals) and the exploratory nature of this analysis, all findings (candidate genes and enriched pathways alike) should be regarded as preliminary molecular candidates requiring independent validation in larger populations.

Keywords: Alternative splicing, Holstein, Lumpy skin disease, Transcript, rMATS

تحليل پيرایش جایگزین در گاوهای حساس و تاب‌آور پس از آلودگی به ویروس بیماری پوستی لمپی
(LSDV)

فرشته احسانی فر^۱، غلامرضا داشاب^{۱*}، حسین بزی^۱، محمد حسین بنابازی^۲، حمیده نوری صادق^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۶/۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۷/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۸/۰۴

۱. ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲. دانشیار گروه علوم زیستی دامی، مرکز دامپزشکی و علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی سوئد، ۷۵۰۰۷ اوپسالا، سوئد.

*نویسنده مسئول: dashab@uoz.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/IJASR.2026.100641.1334>

چکیده

بیماری پوستی لمپی از چالش‌های اقتصادی در صنعت دامپروری گاو است. پیرایش جایگزین (یک لایه‌ی تنظیمی پسارونویسی) در پاسخ میزبان به عفونت‌های ویروسی نقش دارد و تاکنون در پاسخ گاوهای بیمار بررسی نشده است. هدف این مطالعه، شناسایی پیرایش‌های جایگزین در گاوهای آلوده به بیماری لمپی اسکین در طی زمان عفونت بود. داده‌های RNA-seq تک‌انتها از پنج رأس گاو نر (سه حساس، دو تاب‌آور) در چهار زمان (قبل و روزهای ۳، ۷ و ۱۵ پس از آلودگی) بررسی شدند. رویدادهای پیرایشی با rMATS-turbo در طرح طولی جفت‌شده‌ی درون فردی شناسایی و با معیار FDR و ΔPSI فیلتر شدند؛ یک تحلیل مکمل غیرجفت‌شده برای پیش از آلودگی نیز انجام شد. غنی‌سازی مسیرهای زیستی در DAVID و شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئینی در STRING انجام شد. در تحلیل طولی ۵۷ رویداد پیرایش معنی‌دار (۲۳ در گروه حساس، ۳۴ در گروه تاب‌آور) بدون همپوشانی بین دو گروه شناسایی شد. هفت ژن کاندیدا *SRSF7* و *DNM2* (در گروه تاب‌آور)، *PAPOLA*، *RPS24*، *XRN1* و *HNRNPK* و *RAB5A* (در گروه حساس) با نمودار ساشیمی تایید بصری شدند. چهار ژن *PAPOLA*، *RPS24*، *XRN1* و *HNRNPK* توسط شبکه‌ی PPI نیز حمایت شدند. مقایسه‌ی مکمل دو گروه پیش از آلودگی، ۳۵۳ رویداد معنی‌دار را که نشان‌دهنده‌ی تفاوت‌های مولکولی زمینه‌ای پیش از عفونت است را آشکار کرد. چهار ژن *SRSF7*، *HNRNPK*، *XRN1* و *RAB5A* بین این دو تحلیل مشترک بودند. این مطالعه برای نخستین بار، پیرایش جایگزین را به‌عنوان یک لایه‌ی تنظیمی مرتبط با پاسخ میزبان به LSDV معرفی و تفاوت‌های مولکولی پیش از آلودگی را به‌عنوان نامزد بالقوه‌ی نشانگر زیستی حساسیت/تاب‌آوری پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: بیماری پوستی لمپی، پیرایش جایگزین، رونوشت، هلشتاین، rMATS

مقدمه

بیماری لمپی اسکین (LSD)^۱، یک بیماری فرامرزی است که توسط ویروسی از جنس *Capripoxvirus* (CaPVs) متعلق به خانواده *Poxviridae* ایجاد می‌شود. ژنوم این ویروس‌ها (CaPVs) از DNA دورشته‌ای به طول تقریبی ۱۵۰ کیلو جفت باز تشکیل شده است که دارای ۱۵۶ ژن، با تراکم کدگذاری ۹۵ درصد است. این ژنوم دارای یک ناحیه کدگذاری مرکزی و دو تکرار ترمینال معکوس یکسان (ITR)^۲ است (El-Nady et al., 2026).

ویروس لمپی اسکین نسبت به سایر اعضای خانواده CaPVs دارای نه ژن اضافی برای ایجاد عفونت در گاو است (Afzal et al., 2024; Eltom et al., 2021). میزبان این ویروس در سال‌های اخیر علاوه بر گاو و گاومیش، گاومیش‌های وحشی سیاه و آبی، گاومیش کوهی، زرافه، ایمپالا، کودوی بزرگ، گاومیش آفریقایی و سایر گونه‌های جانوری گزارش شده‌اند (Akther et al., 2023).

LSD یکی از چالش‌های اقتصادی مهم صنعت دامپروری گاو است؛ این بیماری علاوه بر ایجاد عوارض پوستی، به دلیل ایجاد زخم منجر به عفونت‌های باکتریایی ثانویه و عوارض آن می‌شود (Kumar et al., 2025). کاهش تولید شیر، کاهش وزن، رشد ضعیف، سقط جنین، آسیب پوستی، ذات‌الریه، ورم پستان، ناباروری و همچنین مرگ و میر خسارات اقتصادی شدیدی را به همراه دارد. هزینه اقدامات درمانی و کنترلی مانند واکسیناسیون و همچنین هزینه‌های غیرمستقیم محدودیت‌های اجباری در جابجایی حیوانات این خسارت اقتصادی را دوچندان می‌کند (Bakar et al., 2021). خسارت اقتصادی ناشی از هر شیوع در سطح گاوداری تا حدود ۱۱۷۶ دلار برآورد شده است (Molla et al., 2017). در سطح منطقه‌ای می‌تواند به ده‌ها تا صدها میلیون دلار در سال برسد (Chouhan et al., 2022; Rajendran et al., 2025).

شیوع LSD در ایران از سال ۲۰۱۴ گزارش شده است. کانون‌های این بیماری در چندین استان (به‌ویژه مناطق غربی و شمال‌غربی) شناسایی شده است (Ardestani & Mokhtari, 2020; Sameea Yousefi et al., 2017). با توجه به ماهیت فرامرزی بیماری، حضور آن در کشورهای همسایه و احتمال گسترش از طریق حشرات ناقل و جابه‌جایی دام، خطر بروز مجدد و گسترش آن همچنان وجود دارد. بنابراین، درک مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز تفاوت‌های فردی در تاب‌آوری یا حساسیت دام‌ها به این ویروس، برای توسعه راهبردهای پیشگیرانه مبتنی بر انتخاب ژنتیکی و نشانگرهای مولکولی در سطح ملی و منطقه‌ای اهمیت دارد.

با توجه به پاسخ متفاوت دام‌ها در مواجهه با این ویروس، بررسی عوامل ژنتیکی مؤثر بر پاسخ میزبان بر اساس نظارت بر مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی، مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است؛ چرا که درک مکانیسم پاسخ‌های متفاوت می‌تواند بهبود ژنتیکی برای تاب‌آوری در برابر بیماری را تسریع کند. در این راستا مطالعات زیادی بر LSD انجام شده که در بیشتر موارد بر ساختار، عملکرد و نحوه بیماری‌زایی ویروس متمرکز بودند (Das et al., 2021; El-Nady et al., 2026; Kumar et al., 2025).

با این حال، علی‌رغم شناخت نسبتاً جامع از پیامدهای بالینی و اقتصادی LSD، جنبه‌های مولکولی پاسخ میزبان، به‌ویژه نقش رویدادهای پیرایش جایگزین (AS)^۳ در تنظیم بیان ژن‌های ایمنی طی عفونت LSDV، تاکنون کمتر مورد توجه قرار گرفته است. اغلب پژوهش‌های ترانسکریپتومیکس مرتبط با LSDV بر پروفایل بیان miRNA (Truong et al., 2025a) و ncRNA (Truong et al., 2025b) اگزوزومی متمرکز بوده‌اند. در زمینه پاسخ میزبان به LSD، بیان ژن

^۱ Lumpy skin disease

^۲ Inverted terminal repeats

^۳ Alternative splicing

IL1RAP یک عامل تعیین‌کننده بالقوه در تمایز بین گاوهای تاب‌آور و حساس گزارش شده است (Banabazi et al., 2025).

AS یک مکانیسم پایه‌ای است که با حذف یا اضافه کردن انتخابی اگزون‌ها و اینترون‌ها از رونوشت‌های pre-mRNA تنوع رونویسی را ایجاد می‌کند و به تولید ایزوفرم‌های پروتئینی متعدد از یک ژن واحد می‌انجامد. رویدادهای AS در تمایز سلولی، اختصاصی بودن بافت و پاسخ به محرک‌های محیطی نقش دارد و ارگانیسم‌ها را قادر می‌سازد تا با شرایط مختلف سازگار شوند و هموستازی را حفظ کنند (Tran et al., 2025; Wang et al., 2021). این رویدادها به پنج نوع اصلی حذف اگزون (SE)، اگزون متقابلاً انحصاری (MXE)، جایگاه پیرایش '۵' (A5SS)، جایگاه پیرایش '۳' (A3SS) و حفظ اینترون (IR) طبقه‌بندی می‌شوند (Bakhtiarizadeh, 2024). AS تنظیم‌نشده اغلب در پاتوژنز و پیشرفت بیماری‌ها نقش دارد (Wang et al., 2024). بر اساس پایگاه داده Ensemble (نسخه ۲/۰) نسبت رونوشت به ژن در گاو به طور میانگین ۱/۵ می‌باشد که ناشی از AS به ازای هر ژن است.

پیشرفت فناوری‌های RNA-seq و توسعه ابزارهای پیشرفته برای تشخیص، تجزیه و تحلیل رویدادهای مختلف AS این حوزه را به یکی از محورهای مطالعاتی کلیدی در زیست‌شناسی مولکولی تبدیل کرده است (Tran et al., 2025). شواهد روزافزون بر اهمیت و نقش بالقوه AS در انواع مختلف بافت، مراحل رشد و بیماری‌ها تاکید دارند. گزارش‌ها نشان می‌دهند که رویدادهای AS در طول تکامل مهره‌داران به سرعت واگرا شده‌اند و در این زمینه، AS به عنوان یک منبع مهم واگرایی گونه‌های خاص معرفی شده است. این یافته‌ها منجر به علاقه فزاینده به درک رویدادهای AS در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی و همچنین در بین نژادهای مختلف شده است (Bakhtiarizadeh, 2024).

برای تشخیص رویدادهای AS، از تحلیل چند متغیره تکثیر پیرایش رونوشت (rMATS)^۱ استفاده می‌شود. rMATS مدل آماری با چارچوب سلسله مراتبی است که عدم قطعیت نمونه‌برداری در تکرارهای فردی و تنوع میان تکرارها را به طور هم‌زمان در نظر می‌گیرد و برای تحلیل تکرارهای جفت‌شده و جفت‌نشده قابل استفاده است (Shen et al., 2014). این ابزار در مقایسه با روش‌های دیگر تحلیل AS مانند Cufflinks و DiffSplice، به‌ویژه به دلیل در نظر گرفتن بهتر عدم قطعیت در تخمین نسبت ایزوفرم‌ها، عملکرد پایدارتر و دقت بالاتری دارد (Tran et al., 2025). نسخه‌ی شتاب‌یافته‌ی آن، rMATS-turbo، همان چارچوب آماری را با یک گردش کار محاسباتی اصلاح‌شده و بهبود قابل توجه در سرعت و کارایی محاسباتی ارائه می‌دهد (Wang et al., 2024).

با توجه به فقدان مطالعات جامع در زمینه‌ی رویدادهای AS در پاسخ گاو به عفونت ویروس LSD، مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به بررسی رویدادهای پیرایش جایگزین متفاوت (DAS)^۲ میان دام‌های تاب‌آور و حساس به این بیماری می‌پردازد. این مطالعه با استفاده از rMATS-turbo، در چهار نقطه‌ی زمانی شامل پنج روز پیش از آلودگی به ویروس (روز -۵) و به ترتیب ۳، ۷، ۱۵ روز پس از آلودگی انجام شد.

علاوه بر تحلیل غنی‌سازی مسیرهای زیستی (KEGG)، ژن‌های DAS شناسایی‌شده از طریق ساخت شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین در پایگاه STRING و نیز شناسایی فاکتورهای رونویسی با استفاده از پایگاه AnimalTFDB (نسخه ۴،۰) تحلیل شدند تا نقش احتمالی آن‌ها در تنظیم پاسخ ایمنی میزبان مشخص گردد. نتایج این

^۱ Replicate Multivariate Analysis of Transcript Splicing (rMATS)

^۲ Differential Alternative Splicing

مطالعه می‌تواند دیدگاه جدیدی نسبت به مکانیسم‌های مولکولی تاب‌آوری و حساسیت به LSD فراهم کند و زمینه را برای شناسایی نشانگرهای زیستی بالقوه جهت برنامه‌های اصلاح ژنتیکی تاب‌آوری به این بیماری هموار سازد.

مواد و روش‌ها

داده‌های خام RNA-Seq تک انتها (single-end) متعلق به پروژه DEFEND (Banabazi *et al.*, 2025) که از نمونه خون کامل ۵ گاو نر هشتتین ۶ ماهه تهیه شده بودند از پایگاه ArrayExpress (با شماره دسترسی E-MTAB-12547) دریافت شده و مورد بررسی قرار گرفتند. کد متعلق به هر نمونه با جزئیات بالینی در جدول ۱ ذکر شده است. این مجموعه شامل ۲۰ نمونه در چهار نقطه زمانی به شرح: پنج روز پیش از آلودگی با ویروس، روز سوم، هفتم و پانزدهم پس از مواجه با ویروس بود. دام‌ها بر اساس امتیاز بالینی روزانه (شامل دریافت غذا، دمای بدن، واکنش‌پذیری عمومی، تعداد و محل ندول‌های پوستی، تورم محل تلقیح و تورم غدد لنفاوی پیش‌کنفی) و بروز یا عدم بروز علائم بالینی آشکار LSD، به دو گروه مستقل دارای علائم بالینی (۳ رأس) و فاقد علائم بالینی (۲ رأس) تقسیم شدند (Banabazi *et al.*, 2025). لازم به ذکر است در مطالعات میزبان-پاتوژن، مقاومت^۱ به عنوان توانایی کاهش تکثیر پاتوژن در میزبان تعریف می‌شود، در حالی که تحمل^۲ به توانایی حفظ هموستازی میزبان در حضور بار پاتوژنی اشاره دارد. در این میان تاب‌آوری^۳ مفهومی مکمل تحمل است که توانایی یک فرد برای بهبود از بیماری را تعیین می‌کند (Gogoi *et al.*, 2022; Hardy *et al.*, 2016; Richardson, 2023). دام تاب‌آور با وجود مواجهه با پاتوژن، فاقد علائم بالینی آشکار باقی می‌ماند، بدون آنکه لزوماً کاهش بار پاتوژن (مقاومت) در آن اثبات شده باشد. در مطالعه‌ی حاضر پس از آلودگی تنها وضعیت بالینی ثبت شده است، لذا از اصطلاح تاب‌آور برای گروه فاقد علائم و اصطلاح حساس برای گروه دارای علائم بیماری استفاده شده است.

جدول ۱- تناظر حیوانات، گروه بالینی و نمونه‌های RNA-seq در چهار نقطه زمانی نمونه‌گیری

Table 1- Correspondence between animals, clinical groups, and RNA-seq samples across the four sampling time points

کد حیوان Animal ID	گروه بالینی Clinical group	کد نمونه پیش از آلودگی ENA Sample accession before infection	کد نمونه روز ۳ پس از آلودگی ENA Sample accession Day 3 post-infection	کد نمونه روز ۷ پس از آلودگی ENA Sample accession Day 7 post-infection	کد نمونه روز ۱۵ پس از آلودگی ENA Sample accession Day 15 post-infection
R29	حساس susceptible	ERS14463554	ERS14463557	ERS14463555	ERS14463556
R30	حساس susceptible	ERS14463560	ERS14463561	ERS14463558	ERS14463559
R31	تاب‌آور resilient	ERS14463564	ERS14463565	ERS14463562	ERS14463563
R32	تاب‌آور resilient	ERS14463568	ERS14463569	ERS14463566	ERS14463567

² Resistance

³ Tolerance

⁴ Resilience

کیفیت خوانش‌ها، با استفاده از ابزار FastQC نسخه ۰/۱۲/۱ (Andrews, 2010) بررسی شد. حذف آداپتورها و برش بازهای بی کیفیت توسط Trimmomatic نسخه ۰/۴۰ با پارامتر MINLEN:36 و TRAILING: 10 (Bolger *et al.*, 2014) انجام شد. آداپتورهای احتمالی باقی مانده با Cutadapt نسخه ۵/۲ (Martin, 2011) حذف شدند. به دلیل برش کیفی، طول نهایی خوانش‌ها متفاوت بود. سپس خوانش‌ها با HISAT2 نسخه ۲/۲/۲ (Kim *et al.*, 2019) به ژنوم مرجع ARS-UCD2.0 (نسخه ۱۱۶ در Ensembl) هم‌تراز شدند. پس از هم‌ترازی، فایل SAM تولید شده با استفاده از SortSam Picard نسخه ۳/۴/۰ مرتب و با SAMtools نسخه ۱/۲۳/۱ (Danecek *et al.*, 2021) ایندکس شدند. در مرحله‌ی بعد، به منظور شناسایی هر پنج نوع رویداد DAS (شامل A3SS, A5SS, MXE, SE و IR) میان دام‌های تاب‌آور و حساس در هر نقطه‌ی زمانی، از نرم‌افزار rMATS-turbo (Wang *et al.*, 2024) استفاده شد. فایل‌های BAM خروجی مرحله قبل (که مرتب و ایندکس شدند) ورودی این مرحله بودند. rMATS-turbo در لینوکس با محیط مجزای Conda نصب شد. برای مدل آماری جفت‌شده (paired-stats)، پکیج تخصصی R به نام PAIRADISE نسخه ۱/۰ (Demirdjian *et al.*, 2020) همراه با پکیج‌های وابسته (doParallel, foreach, iterators و nloptr) نصب شدند. با توجه به تفاوت طول نهایی خوانش‌ها ناشی از مرحله‌ی برش کیفی، تحلیل با پارامترهای `--t single --mel readLength 108 --variable-read-length --allow-clipping --novelSS --mil 50 --paired-stats --nthread 8` اجرا شد؛ فعال‌سازی گزینه‌ی `variable-read-length` امکان پردازش خوانش‌هایی با طول متغیر را پس از برش کیفی فراهم کرد و گزینه‌ی `novelSS` شناسایی محل‌های اتصال پیرایش نوین^۱ را که در مرجع ثبت نشده‌اند نیز ممکن ساخت. هر پنج نوع رویداد AS برای هر مقایسه‌ی گروهی مورد بررسی قرار گرفتند.

rMATS-turbo رویدادهای AS را با شاخص درصد پیرایش درون (Ψ یا Ψ^2) یا کمی‌سازی می‌کند. PSI درصد رونوشت‌های شامل یک اگزون یا محل پیرایش خاص را نشان می‌دهد و از شمارش خوانش‌های RNA-seq که از آن اگزون یا اتصال پیرایشی پشتیبانی می‌کنند محاسبه می‌شود؛ این مقدار براساس طول مؤثر ایزوفرم‌های متمایز رونوشت (برای مثال ایزوفرم دارای اگزون در برابر ایزوفرم فاقد اگزون) نرمال‌سازی شدند (Wang *et al.*, 2024) به‌عنوان مثال، برای یک رویداد SE، PSI را می‌توان از فرمول زیر محاسبه کرد:

$$\Psi = \frac{\frac{I}{L_I}}{\frac{I}{L_I} + \frac{S}{L_S}} \quad \text{معادله (۱)}$$

^۱ Novel Splice Sites

^۲ Percent Spliced In

در معادله فوق I نشان دهنده تعداد خوانش‌های پشتیبان ایزوفرم شامل اگزون (inclusion) و S تعداد خوانش‌های پشتیبان ایزوفرم حذف کننده اگزون (skipping) می‌باشند؛ L_S و L_I به ترتیب طول‌های موثر^۱ ایزوفرم شامل اگزون و ایزوفرم حذف کننده اگزون را نشان می‌دهند (Wang et al., 2024). مقدار ΔPSI به صورت تفاضل میانگین Ψ بین دو گروه مقایسه شده تعریف شدند. تحلیل آماری بر پایه‌ی شمارش خوانش‌های محل اتصال پیرایش (JC) انجام شد. این انتخاب محافظه‌کارانه‌تر و طبق استاندارد رایج است. در این مطالعه تحلیل برای شناسایی رویدادها و برآورد PSI در دو سطح اجرا شد:

الف) تحلیل طولی جفت شده (Paired Longitudinal) درون فردی: در این تحلیل هر یک از دو گروه حساس و تاب‌آور به طور مستقل در هر نقطه زمانی پس از آلودگی (روز ۳، ۷ و ۱۵) با روز پایه خود آن گروه (روز ۵- پیش از آلودگی) مقایسه شدند (در مجموع ۶ آزمایش جفت‌شده‌ی جداگانه؛ سه اجرا برای هر گروه بالینی). در این تحلیل با فعال‌سازی گزینه paired-stats--، مدل PAIRADISE از طریق فراخوانی درون‌فرآیندی در rMATS-turbo برای آزمون آماری نهایی معنی‌داری ΔPSI استفاده شد.

ب) تحلیل مقطعی غیر جفت شده پایه (Basic Unpaired Cross-Sectional Analysis) بین گروهی: در این تحلیل دام‌های حساس در برابر تاب‌آور، در روز ۵- (پیش از آلودگی)، به‌صورت غیر جفت شده مقایسه شدند تا رویدادهای AS زمینه‌ای مستقل از عفونت شناسایی گردد. معنی‌داری ΔPSI در این تحلیل بر پایه‌ی آزمون پیش‌فرض نسبت درست‌نمایی (Likelihood-Ratio Test) rMATS-turbo محاسبه شد.

استفاده هم‌زمان از طرح طولی جفت شده (برای مقایسه‌ی درون‌فردی هر گروه با خط پایه‌ی خود) و طرح مکمل مقطعی غیر جفت شده (برای مقایسه‌ی بین‌گروهی در نقطه‌ی زمانی ثابت) با استاندارد پیشنهادی نرم‌افزار rMATS-turbo و چارچوب آماری PAIRADISE که به‌طور خاص برای تحلیل داده‌ها RNA-seq با ساختار جفت شده طراحی شده است، هم‌راستا است؛ اهمیت لحاظ کردن ساختار جفت شده در کاهش تنوع فردی و افزایش توان آماری در مطالعات RNA-seq پیش‌تر نیز مستند شده است (Chung et al., 2013). به‌منظور رفع شبه‌تکرار^۲ ناشی از --novelSS، رویدادهای AS بر اساس شناسه‌ی ژن (GeneID) و فاصله‌ی مختصات ژنومی (≥ 10 جفت‌باز) خوشه‌بندی شدند و از هر خوشه، رویداد با کمترین FDR به‌عنوان نماینده انتخاب شد. رویدادهای AS با معیار $FDR < 0.05$ و $|\Delta PSI| \geq 0.10$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. تحلیل پایه (حساس در برابر تاب‌آور، روز ۵-) با همان آستانه‌ی تحلیل طولی ($FDR < 0.05$ و $|\Delta PSI| \geq 0.10$) و همان رویه‌ی رفع شبه‌تکرار فنی انجام شد. قوی‌ترین ژن‌های دارای پیرایش متفاوت پیش از آلودگی (بر اساس بیشترین $|\Delta PSI|$) به‌عنوان یافته‌ی تفسیری در بحث معرفی شدند و همراه با نقش عملکردی شناخته‌شده‌ی برای هر ژن، این یافته به‌عنوان یک فرضیه مبنی بر اینکه تفاوت‌های زمینه‌ای پیش از آلودگی ممکن است در نوع پاسخ پیرایش هر گروه به عفونت مؤثر باشند، مطرح گردید.

برای درک و تفسیر عملکرد ژن‌های دارای DAS معنی‌دار، غنی‌سازی مسیرهای KEGG با استفاده از پایگاه DAVID (Huang et al., 2009; Sherman et al., 2022) بر پایه‌ی نام رسمی ژن به‌طور مجزا برای هر گروه/روز انجام شد. پس‌زمینه‌ی (background) تحلیل غنی‌سازی به‌طور جداگانه برای دو نوع مقایسه به صورت اختصاصی تعریف شد. در

^۱ Effective length

^۲ Pseudo-replication

تحلیل طولی جفت شده، پس‌زمینه در سطح هر گروه بالینی به‌طور مستقل تعیین شد که شامل فهرست ترکیبی اسامی ژن‌های واجد شرایط آزمون آماری در هر سه مقایسه‌ی طولی آن گروه (روزهای ۳، ۷ و ۱۵ در برابر روز ۵-) بود. پس‌زمینه‌ی مشترک برای تحلیل غنی‌سازی همان گروه به‌کار رفت؛ در مقایسه‌ی پایه (حساس در برابر تاب‌آور، روز ۵- پیش از آلودگی)، از آنجا که این مقایسه ذاتاً بین‌گروهی بود، پس‌زمینه از ترکیب ژن‌های واجد شرایط آزمون آماری هر دو گروه بالینی تشکیل شد. در تمامی موارد، پس‌زمینه‌ی سفارشی (نه پیش‌فرض کل ژنوم) به DAVID ارسال و صحت اعمال آن از طریق مقدار Pop Total گزارش‌شده در خروجی این ابزار تأیید شد.

شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI) برای هر یک از شش مقایسه‌ی طولی، بر پایه‌ی فهرست کامل ژن‌های دارای DAS معنی‌دار همان مقایسه در پایگاه STRING (string-db.org) نسخه‌ی ۱۲/۰ (Szkarczyk et al., 2023) براساس تنظیمات پیش‌فرض این پایگاه استخراج شد. امتیاز اطمینان حداقل^۱ برابر با ۰/۴ (medium confidence)، بدون افزودن تعامل‌گر اضافی^۲ خارج از فهرست ورودی و صرفاً محدود به ژن‌های معنی‌دار هر مقایسه با انتخاب گونه Bos taurus محاسبه شد. معنی‌داری هر شبکه با آزمون غنی‌سازی PPI داخلی STRING، بر پایه‌ی مقایسه‌ی تعداد یال‌های مشاهده‌شده با تعداد مورد انتظار در یک شبکه‌ی تصادفی هم‌اندازه، ارزیابی شد. همچنین ژن‌های دارای DAS معنی‌دار در پایگاه AnimalTFDB (<https://guolab.wchscu.cn/AnimalTFDB4>) نسخه‌ی ۴/۰ (Shen et al., 2023) حاشیه‌نویسی شدند تا فاکتورهای رونویسی (TFs) احتمالی میان آن‌ها شناسایی شوند.

اولویت‌بندی ژن‌های منفرد بر پایه‌ی ترکیبی از چهار معیار شامل: اندازه‌ی اثر (ΔPSI)، سطح معنی‌داری آماری (FDR)، تداوم حضور در نقاط زمانی متوالی و اختصاصی بودن مسیر (با اولویت کمتر برای مسیرهای بسیار عمومی) انجام شد. در مواردی که داده‌ی شبکه‌ی STRING در دسترس بود، درجه‌ی اتصال (Degree) هر ژن کاندید در شبکه (یعنی تعداد یال‌های مستقیم آن ژن به سایر گره‌های شبکه) به‌عنوان شاهد تکمیلی تفسیری در کنار چهار معیار اصلی (اندازه‌ی اثر، تداوم حضور، معنی‌داری آماری و اختصاصی بودن مسیر) در نظر گرفته شد.

مجسم‌سازی نتایج: رویدادهای پیرایشی منتخب با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری rmats2sashimiplo (<https://github.com/Xinglab/rmats2sashimiplo>) بر اساس سطوح PSI به دست آمده از rMATS-turbo تجسم شدند. نمودار دایره‌ای (Circos plot) توزیع ژنومی رویدادهای AS با بسته‌ی R circlize (v0.4.18) (Gu et al., 2014) ترسیم شد. نمودار Sankey ارتباط ژن-مسیر عملکردی با بسته‌ی R networkD3 (v0.4.1) (Allaire et al., 2017) ساخته شد.

نتایج و بحث

در مجموع، ۵۳۶/۴ میلیون خوانش متعلق به ۲۰ نمونه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به طور میانگین ۲۶/۸ میلیون خوانش در هر نمونه، که شامل بازه‌ای از ۱۵/۱ تا ۳۲/۶ میلیون خوانش بودند. در نهایت ۹۶/۳٪ از خوانش‌ها با موفقیت هم-تراز شدند. درصد هم‌ترازی در نمونه‌های مختلف از ۹۵/۱٪ تا ۹۶/۸٪ متغیر بود.

تحلیل طولی جفت شده درون فردی: جدول ۲ تعداد رویدادهای پیرایشی معنی‌دار را به تفکیک گروه بالینی، روز و نوع AS را نشان می‌دهد. در شش تحلیل طولی جفت شده در طول دوره‌ی زمانی، ۵۷ رویداد DAS در گروه تاب‌آور (۳۴

^۱minimum required interaction score

^۲ Additional interactors = none

رویداد، متعلق به ۳۳ ژن یکتا) و گروه حساس (۲۳ رویداد، متعلق به ۲۳ ژن یکتا) شناسایی شدند. اختلاف یک‌واحدی بین تعداد کل رویدادها و ژن‌های یکتای گروه تاب‌آور ناشی از تکرار مستقل ژن *SRSF7* در دو نقطه‌ی زمانی جداگانه (روز ۳ و روز ۱۵) است. کل رویدادها شامل ۲۹ مورد SE، ۳ مورد MXE، ۱۳ مورد A5SS، ۶ مورد A3SS و ۶ مورد IR بودند.

در فهرست نهایی ژن‌های دارای DAS پس از اعمال آستانه‌های آماری (FDR و $|\Delta PSI|$)، هیچ ژن مشترکی بین دو گروه بالینی مشاهده نشد. به عبارت دیگر، پاسخ پیرایشی دو گروه از نظر هویت ژن‌های درگیر کاملاً مجزا بود. این یافته بر پایه‌ی آستانه‌های آماری اعمال شده است و لزوماً نشان‌دهنده‌ی تفاوت واقعی در پاسخ زیستی زمینه‌ای دو گروه نیست. بخشی از این عدم اشتراک ممکن است تا حدی ناشی از توان آماری محدود مطالعه (با توجه به حجم نمونه‌ی کم) باشد.

در گروه تاب‌آور، بیشترین تعداد DAS در روز سوم پس از آلودگی مشاهده شد (۲۴ رویداد). این تعداد در روز هفتم به طور کامل به صفر رسید و سپس یک موج محدود از DAS در روز پانزدهم ظاهر شد که تقریباً برابر نصف روز سوم بود (۱۰ رویداد). ترکیب نوع رویداد این روز با روز سوم متفاوت بود. روز سوم عمدتاً شامل رویدادهای SE و A3SS بود، اما روز پانزدهم بیشتر رویدادها از نوع MXE و RI بودند. با این حال، در سطح ژن، این دو موج پاسخ کاملاً مستقل نبودند؛ ژن *SRSF7* در دو نقطه‌ی زمانی (روز سوم و روز پانزدهم) به‌طور مستقل معنی‌دار شد که می‌تواند نشان‌دهنده درگیری مجدد بخشی از ماشین پیرایش فعال شده در موج اول با شدت و ترکیب متفاوت باشد. در گروه حساس تعداد رویدادهای DAS از ۱۶ مورد در روز سوم به ۳ مورد در روز هفتم و ۴ مورد در روز پانزدهم کاهش یافت، بدون آنکه در هیچ نقطه‌ی زمانی به‌طور کامل به صفر برسد.

تعداد بالاتر DAS در روز سوم پس از آلودگی در هر دو گروه حساس و تاب‌آور، با الگوی زمانی پاسخ ایمنی اولیه و تنش سلولی ناشی از عفونت هم‌خوانی دارد. مطالعات روی گاو نشان داده‌اند که عفونت‌های باکتریایی مختلف (از جمله پاراتوبرکلوزیس و ورم پستان) باعث بازآرایی گسترده ترانسکریپتوم و افزایش DAS می‌شوند و این تغییرات با مسیرهای ایمنی، التهاب و پاسخ میزبان مرتبطاند (Asselstine et al., 2022; Badia-Bringué et al., 2024; Vanzin et al., 2025). این تغییرات می‌توانند بخشی از پاسخ سریع میزبان برای تنظیم تنوع ایزوفرماها و سازگاری با شرایط استرس باشند. با پیشرفت بیماری (روزهای هفتم و پانزدهم)، تعداد DAS کاهش می‌یابد که ممکن است نشان‌دهنده تثبیت نسبی برنامه پیرایش باشد. الگوی مشابه در هر دو گروه بالینی حاکی از آن است که افزایش DAS در روز سوم احتمالاً بخشی از پاسخ عمومی به عفونت است. در سایر بیماری‌های عفونی گاو، AS به‌عنوان یک مکانیسم تنظیمی مهم در پاسخ ایمنی گزارش شده است. در مطالعه‌ای روی مایکوباکتریوم اوپوم گاوهایی هلشتاین با استفاده از داده‌های چندبافتی RNA-seq بر ۲۴ نمونه، ۱۱۹، ۱۵۰ و ۶۸ DAS بین گاوهای آلوده و سالم به ترتیب در خون محیطی، ژژنوم و غده بزاقی شناسایی شد که با ۹۲ فاکتور پیرایش متمایز بیان‌شده همبستگی معنی‌داری داشتند (Li et al., 2022). در بررسی ترانسکریپتوم گاوهایی مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، ۲۲۱۲ DAS مربوط به ۱۶۲۱ ژن شناسایی شدند که به طور قابل توجهی در مسیرهای ایمنی و التهابی غنی شده بودند (Yang et al., 2022).

نوع DAS غالب در هر دو گروه، SE به‌ویژه در روز سوم (۱۵ مورد در گروه تاب‌آور، ۷ مورد در گروه حساس) بود. غالب بودن SE نسبت به سایر انواع رویدادها، در سایر مطالعات نیز بیان شده است. SE شایع‌ترین نوع پیرایش جایگزین در ژنوم گاو محسوب می‌شود (Chacko & Ranganathan, 2009) و در پاسخ به عفونت‌های گاوی نیز به‌عنوان یکی از الگوهای غالب تغییرات AS گزارش شده است (Wang et al., 2016). غلبه‌ی SE در داده‌های حاضر می‌تواند بازتابی از معماری کلی پیرایش در ژنوم گاو باشد و نمی‌توان آن را ویژگی اختصاصی پاسخ به LSDV توسط میزبان دانست.

تحلیل غنی‌سازی عملکردی KEGG در پایگاه DAVID بر اساس نام متعارف ژن^۱ انجام شد. از میان ۵۷ DAS شناسایی شده، دو مورد متعلق به ژن‌های فاقد نام در نسخه فعلی حاشیه نویسی Ensembl (ARS-UCD2.0) انتشار (۱۱۶) بودند. از این رو این دو مورد از ورودی تحلیل DAVID مستثنی شدند. با توجه به تعداد ژن‌های معنی‌دار در هر مقایسه، تحلیل غنی‌سازی مسیر در اکثر موارد به نتیجه‌ی معنی‌دار آماری نرسید. تنها در گروه حساس (در روز سوم) مسیرهای معنی‌دار شناسایی شدند. با توجه به این محدودیت، تمرکز اصلی تفسیر زیستی بر اولویت‌بندی ژن‌های منفرد بر پایه‌ی معیارهای چهارگانه‌ی توصیف شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد.

جدول ۲- انواع رویدادهای DAS معنی‌دار به تفکیک گروه بالینی، روز نمونه‌گیری و نوع پیرایش

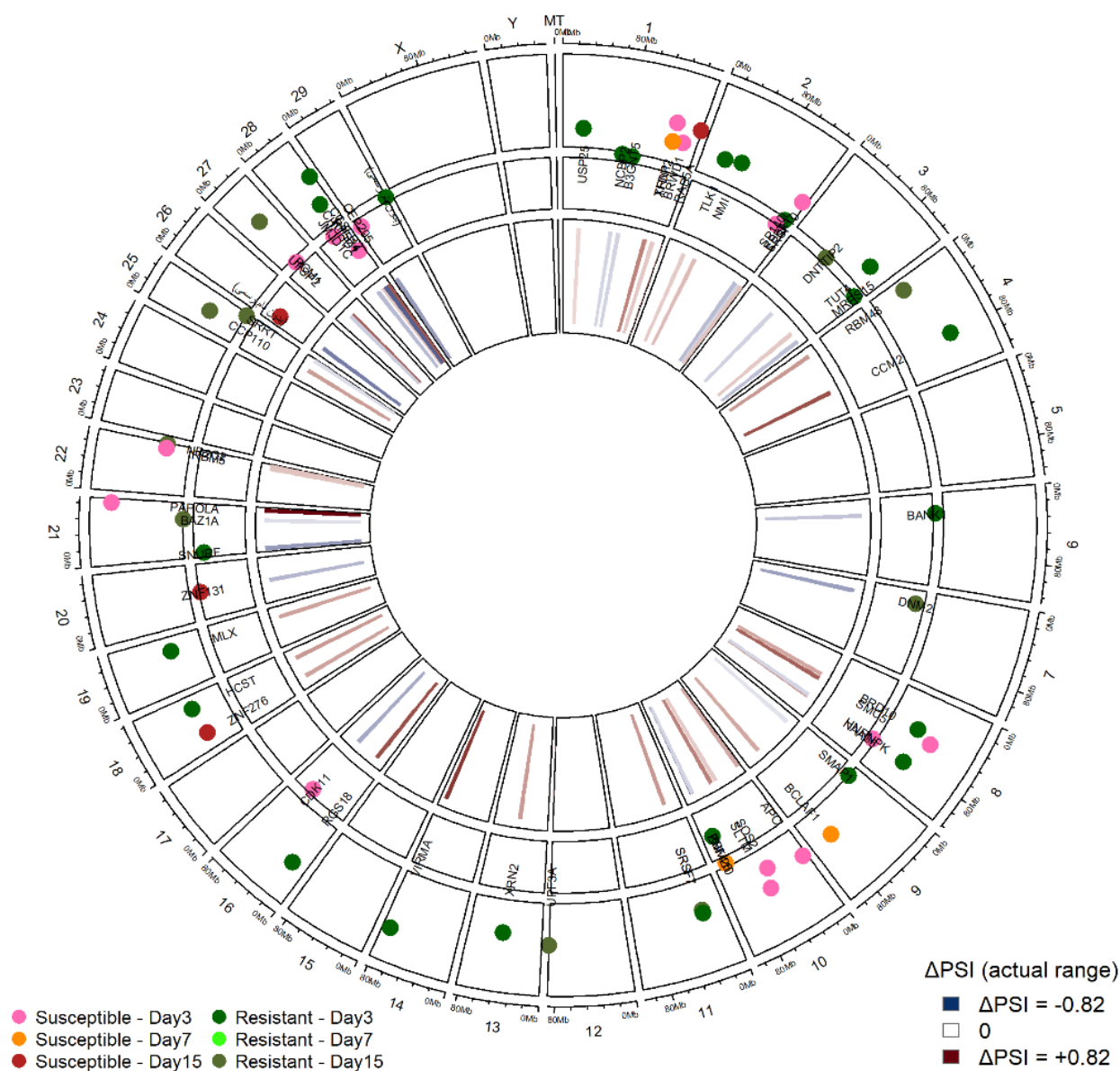
گروه	روز پس از آلودگی	A3SS	A5SS	MXE	IR	SE	کل
group	Day After infection						total
حساس	3	0	3	1	5	7	16
susceptible	7	0	1	0	0	2	3
	15	0	3	0	0	1	4
تاب‌آور	3	6	3	0	0	15	24
resilient	7	0	0	0	0	0	0
	15	0	3	2	1	4	10

مقدار صفر در این جدول به معنای عدم وجود رویداد پیرایشی معنی‌دار از آن نوع خاص (بر اساس آستانه‌ی $FDR < 0.05$ و $|\Delta PSI| \geq 0.10$) در گروه/روز مربوطه است.

A value of zero in this table indicates the absence of a significant splicing event of that specific type (based on the thresholds $FDR < 0.05$ and $|\Delta PSI| \geq 0.10$) in the corresponding group/day

چشم‌انداز ژنومی DAS‌های معنی‌دار در شکل ۱ ارائه شده است. حلقه‌ی بیرونی، ایدئوگرام ۳۲ کروموزوم گاو (اتوزوم ۱ تا ۲۹، X، Y و ژنوم میتوکندریایی) را بر پایه‌ی طول واقعی هر کروموزوم در ژنوم مرجع نشان می‌دهد. حلقه‌ی میانی، موقعیت دقیق هر یک از ۵۷ رویداد DAS را با نقطه نشان می‌دهد. برای DAS‌های شناسایی شده در دام‌های حساس به ترتیب روزهای سوم، هفتم و پانزدهم با رنگ‌های صورتی، نارنجی و قرمز و برای دام تاب‌آور به ترتیب روزهای سوم و پانزدهم با رنگ‌های سبزی و زیتونی علامت‌گذاری شدند (در روز هفتم دام تاب‌آور DAS وجود نداشت). حلقه داخلی شدت و جهت اندازه اثر ($|\Delta PSI|$) هر DAS را با طیف رنگی پیوسته از آبی تیره (برای منفی‌ترین مقادیر) تا سفید (صفر) و قرمز تیره (برای مثبت‌ترین مقدار) نشان می‌دهد. این مقیاس رنگی متناسب با بازه‌ی واقعی داده‌های این مطالعه تنظیم شده است. مقدار مثبت ΔPSI نشان‌دهنده‌ی افزایش نگه‌داشت آن قطعه پس از آلودگی نسبت به روز پیش از آلودگی است و مقدار منفی ΔPSI نشان‌دهنده‌ی حذف بیشتر آن قطعه پس از آلودگی نسبت به پیش از آلودگی است.

^۱ Gene Symbol

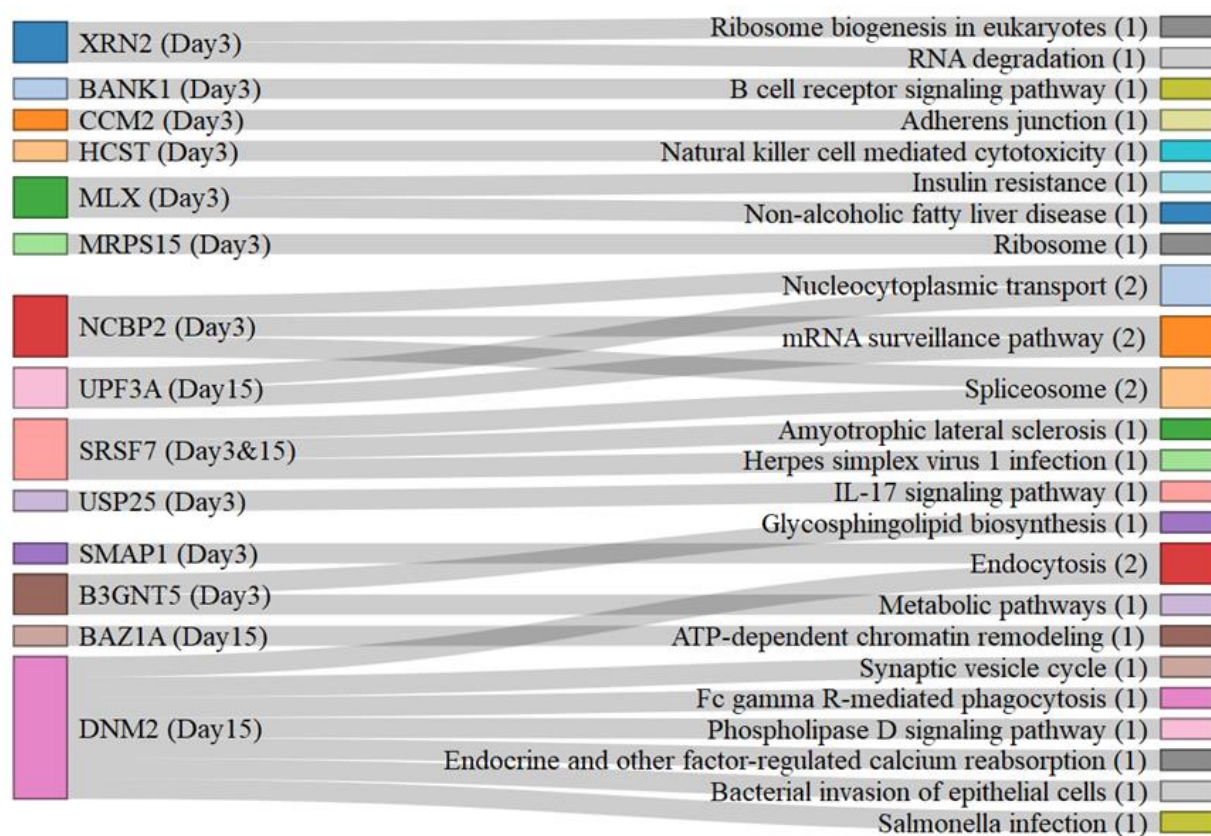


شکل ۱- نمای دایره‌ای توزیع ژنومی DAS در تحلیل طولی جفت شده به تفکیک گروه بالینی و روز پس از آلودگی. حلقه بیرونی: کروموزوم‌های گاو؛ حلقه میانی: موقعیت هر DAS. رنگ‌بندی شده بر اساس گروه و روز (حساس: صورتی=روز ۳، نارنجی=روز ۷، قرمز=روز ۱۵؛ تاب‌آور: سبزینه=روز ۳، زیتونی=روز ۱۵؛ روز ۷ در گروه تاب‌آور فاقد DAS بود)؛ حلقه داخلی: اندازه اثر (ΔPSI) با طیف آبی (منفی) تا قرمز (مثبت).

Figure 1- Circos plot of the genomic distribution of DAS events in the paired longitudinal analysis, stratified by clinical group and post-infection days. Outer ring: bovine chromosomes; middle ring: DAS positions, colored by group and day (susceptible: pink = day 3, orange = day 7, red = day 15; resilient: dark green = day 3, olive = day 15; no DAS at day 7 in resilient animals); inner ring: effect size (ΔPSI) on a blue (negative) to red (positive) scale

در روز سوم پس از آلودگی در دام‌های تاب‌آور، ۱۱ ژن دارای مسیر عملکردی شناسایی شدند. مهمترین الگو، همپوشانی ژن‌های ماشین پردازش RNA بود. *SRSF7* و *NCBP2* در مسیر اسپلایسوزوم، *XRN2* در تخریب RNA و بیوزن ریبوزوم و *MRPS15* در ریبوزوم شناسایی شدند. علاوه بر این ژن‌های *BANK1*، *HCST* و *USP25* به ترتیب در

مسیرهای سیگنال‌دهی گیرنده سلول B، در سمیت سلولی میانجی‌شده توسط سلول‌های کشنده‌ی طبیعی و مسیر سیگنال‌دهی IL-17 که مرتبط یا سیستم ایمنی است مشاهده شدند. همچنین SRSF7 در مسیر عفونت ویروسی هرپس سیمپلکس ۱ نیز حضور داشت. در روز هفتم هیچ رویداد پیرایش معنی‌داری در این گروه شناسایی نشد. در روز پانزدهم، از میان ۴ ژن شناسایی شده، همچنان SRSF7 در مسیر اسپیلیسوزوم حضور دارد که می‌تواند بیانگر پایداری تغییر در ماشین پیرایش باشد. ژن غالب این روز DNM2 بود که در چندین مسیر مرتبط با ترافیک غشایی و پاسخ ایمنی (اندوسیتوز، فاگوسیتوز و تهاجم باکتریایی) غنی شد. همچنین، UPF3A در مسیرهای نظارت بر mRNA و انتقال هسته‌ای – سیتوپلاسمی ظاهر گردید. ژن BAZ1A در مسیر باز آرای کروماتین شناسایی شد. این یافته‌ها حاکی از آن است که پاسخ پیرایش دام‌های تاب‌آور در مراحل بعدی بیماری بیشتر به سمت تنظیم اندوسیتوز، فاگوسیتوز و نظارت بر mRNA متمایل می‌شود (شکل ۲). با توجه به تعداد محدود ژن‌های ورودی، هیچ یک از این مسیرها در سطح آماری پس از تصحیح آزمون چندگانه معنی‌دار نبودند؛ از این رو حاشیه نویسی ارائه‌شده صرفاً به منظور مرور عملکردی و توصیفی ژن‌ها گزارش شدند. غالبیت مسیرهای گروه تاب‌آور حول محورهای کنترل کیفیت RNA، اندوسیتوز/ترافیک وزیکولی، ایمنی ذاتی و متابولیسم بود.

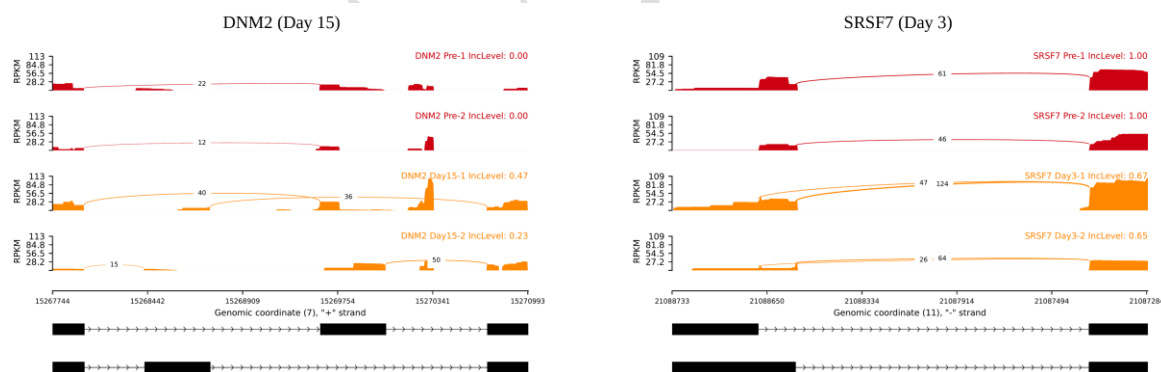


شکل ۲- نمودار سانکی ارتباط DAS با مسیرهای زیستی غنی شده در گروه تاب‌آور، به تفکیک روز پس از آلودگی. ضخامت هر پیوند متناسب با تعداد ژن‌های مشترک بین هر حاشیه‌نویسی و مسیر است.

Figure 2- Sankey diagram illustrating the relationships between genes with DAS and their enriched biological pathways in the Resilient group, stratified by post-infection day. Link thickness is proportional to the number of shared gene–pathway annotations.

از میان تمامی ژن‌های شناسایی شده در گروه تاب‌آور، *SRSF7* و *DNM2* به‌عنوان دو کاندیدای برجسته در نظر گرفته شدند. ژن *DNM2* ($\Delta\text{PSI} = -0.352$) به دلیل ارتباط اختصاصی با مسیرهای ورود/پاکسازی پاتوژن انتخاب شد. ژن *SRSF7* ($\Delta\text{PSI} = 0.301, 0.339$) به دلیل تکرار مستقل معنی‌دار در دو نقطه‌ی زمانی جداگانه (روز سوم و پانزدهم) و ارتباط مستقیم با عفونت ویروسی انتخاب شد. در شکل ۳ نمودار ساشیمی این دو ژن نشان داده شده است. رنگ قرمز پیش از آلودگی (روز ۵-) و رنگ نارنجی پس از آلودگی را نمایش می‌دهند. اعداد روی هر پیوند (arc) تعداد خوانش‌های پشتیبان جانشین پیرایش مربوطه را نشان می‌دهند. مقدار IncLevel درج‌شده برای هر نمونه، مقدار Ψ محاسبه‌شده توسط rMATS-turbo برای همان نمونه است. نمودارهای زیر هر پانل، ساختار اگزون-اینترون دو ایزوفرم اصلی هر رویداد را نشان می‌دهند (اگزون‌ها به صورت مستطیل توپر و اینترون‌ها با فلش‌های جهت‌دار نشان داده شده‌اند).

ژن *SRSF7* علاوه بر نقش کلاسیک خود در تنظیم AS، پاسخ اینترفرون نوع I را از طریق فعال‌سازی فاکتور رونویسی تنظیمی اینترفرون γ (*IRF7*) تقویت می‌کند و سبب ارتقای ایمنی ضد ویروسی می‌شود. همچنین در بیان بهینه‌ی گروهی از ژن‌های تحریک شونده با اینترفرون در ماکروفاژها نقش دارد. این ژن در همکاری با هیستون متیل ترانسفراز *KMT5a* پاسخ اینترفرون نوع I را بهبود می‌دهد (Scott et al., 2023; Scott et al., 2024). ژن *DNM2* یک GTPase است که نقش کلیدی در بازسازی غشاء، اندوسیتوز و تنظیم اسکلت سلولی ایفا می‌کند. این ژن به دلیل مشارکت در ترافیک وزیکولی و اندوسیتوز، می‌تواند در فرآیندهای مرتبط با پاسخ ایمنی و تعامل میزبان-پاتوژن نیز اهمیت داشته باشد (Durieux et al., 2010; Goret et al., 2025). به عنوان مثال ویروس تب سه روزه‌ی گاوی از مسیر اندوسیتوز وابسته با کلاترین و ودینامین ۲ (پروتئینی که توسط *DNM2* کد می‌شود) به روشی وابسته به pH وارد سلول‌های میزبان می‌شود (Cheng et al., 2012). این یافته‌ها می‌تواند بیانگر آن باشد که حیوانات تاب‌آور پس از آلودگی، محورهای کلیدی تنظیم پیرایش و ورود پاتوژن را به صورت کنترل‌شده فعال می‌کنند.



شکل ۳- نمودار ساشیمی ژن‌های: *SRSF7*، رویداد A5SS و *DNM2*، رویداد MXE بر پایه پوشش واقعی خوانش‌های خام. رنگ قرمز مربوط به پیش از آلودگی و رنگ نارنجی پس از آلودگی را نشان می‌دهند. اعداد روی هر پیوند بیانگر خوانش‌های پشتیبان جانشین پیرایش مربوطه است. مقدار IncLevel درج‌شده برای هر نمونه، مقدار Ψ محاسبه شده توسط rMATS-turbo برای همان نمونه است. نمودار زیر هر پانل، ساختار اگزون-اینترون دو ایزوفرم اصلی رویداد پیرایش را نشان می‌دهد (اگزون‌ها: مستطیل توپر؛ اینترون‌ها: فلش‌های جهت‌دار).

Figure 3- Sashimi diagram of the genes: *SRSF7*, event A5SS and *DNM2*, event MXE based actual raw read coverage. Red indicates pre-infection samples, and orange indicates post-infection samples. The numbers on each arc represent the number of supporting splice junction reads for the corresponding event; the IncLevel value shown for each sample is the PSI (Percent Spliced-In) value calculated by rMATS-turbo for that sample. The diagram below each panel shows the exon-intron structure of the two main isoforms of the splicing event (exons: solid rectangles; introns: directional arrows)

بررسی دقیق‌تر رویدادهای روز سوم نشان می‌دهد که گروه حساس، علاوه بر تعداد بیشتر رویدادهای DAS، از نظر تنوع مسیرهای زیستی نیز گسترده‌تر از گروه تاب‌آور عمل کرده است. در این روز از ۱۶ رویداد DAS، ۸ ژن دارای حاشیه نویسی عملکردی شناسایی شدند (شکل ۴). ژن‌های مرتبط با ماشین پیرایش و پردازش RNA شامل *SRSF10*، *HNRNPK*، در مسیر اسپلایسوزوم، *PAPOLA* در مسیر نظارت mRNA و *XRN1* در مسیرهای بیورژن ریپوزوم و تخریب RNA قرار داشتند. *RPS24* در مسیرهای ریپوزوم و بیماری کروناویروس-کووید ۱۹ شناسایی شد. ژن *JMJDIC* در مسیر تنظیم نادرست رونویسی در سرطان قرار گرفت و دو ژن *APC* و *SOS2* نیز به ترتیب در ۱۷ و ۴۷ مسیر زیستی حضور یافتند که عمدتاً به دسته‌های سیگنال‌دهی سلولی مربوط بود. این الگو می‌تواند نشان‌دهنده‌ی بازآرایی گسترده‌تر برنامه پیرایش در مراحل اولیه عفونت در دام‌های حساس باشد که هم‌زمان تنظیم ماشین پیرایش، ترجمه و برخی مسیرهای سیگنال‌دهی را در بر می‌گیرد.

در روز هفتم این گروه، تعداد ژن‌های دارای تغییر پیرایش معنی‌دار کاهش یافت و تنها سه ژن باقی ماند که از میان آن‌ها، ژن *RBM25* در مسیر اسپلایسوزوم حضور داشت که احتمالاً بیانگر تداوم تغییر در ماشین پیرایش تا این نقطه زمانی است.

در روز پانزدهم از بین ۴ ژن دارای DAS (یک مورد فاقد نام متعارف) تنها یک ژن *RAB5A* حاشیه نویسی شد. این ژن در مسیرهای سیگنال‌دهی *Ras*، میتوفاژی، اندوسیتوز، فاگوزوم، افروسیتوز، بازجذب آب تنظیم‌شده توسط وازوپرسین، اسکروز جانبی آمیوتروفیک، مسیرهای تحلیل عصبی (بیماری‌های متعدد)، عفونت سالمونلا، آمیبیاز و سل غنی بود. این یافته نشان می‌دهد که پس از کاهش تعداد DAS در روز هفتم (۳مورد)، در روز پانزدهم، محور ترافیک غشایی و پاسخ ایمنی حول ژن *RAB5A* مجدداً برجسته شده است.

بر اساس معیارهای اولویت‌بندی ژن‌های منفرد در گروه حساس، پنج ژن شامل *PAPOLA*، *RPS24*، *XRN1*، *HNRNPK* و *RAB5A* به‌عنوان برجسته‌ترین کاندیداها برای تفسیر زیستی انتخاب شدند. در شکل ۵ نمودار ساشیمی ژن‌های فوق نشان داده شده است. مطابق نمودار ساشیمی قبل، رنگ قرمز پیش از آلودگی (روز ۵-) و رنگ نارنجی پس از آلودگی را نمایش می‌دهند. اعداد روی هر پیوند (arc) تعداد خوانش‌های پشتیبان جانکشن پیرایش مربوطه را نشان می‌دهند. مقدار IncLevel درج‌شده برای هر نمونه، مقدار Ψ محاسبه‌شده توسط rMATS-turbo برای همان نمونه است. نمودارهای زیر هر پانل، ساختار اگزون-اینترون دو ایزوفرم اصلی هر رویداد را نشان می‌دهند (اگزون‌ها به‌صورت مستطیل توپر و اینترون‌ها با فلش‌های جهت‌دار نشان داده شده‌اند).

XRN1 ($\Delta\text{PSI}=0.409$) در مسیر تخریب RNA غنی شد. این ژن با تخریب mRNA میزبان و جلوگیری از فعال‌سازی اینترفرون بتا نقش مثبتی در تکثیر ویروس آنفلوآنزای A ایفا می‌کند (Liu et al., 2021). *HNRNPK* با وجود اندازه اثر کوچک‌تر ($\Delta\text{PSI}=-0.149$) نسبت به سایر کاندیداها، به‌دلیل حضور در مسیر اسپلایسوزوم و شواهد عملکردی مستقل انتخاب شد. این ژن نقش شناخته شده‌ای در تنظیم پیرایش میزبان دارد؛ زیرا به‌طور گسترده توسط ویروس‌های مختلف هدف دستکاری قرار می‌گیرد (Begg et al., 2025). به‌طور اختصاصی‌تر مطالعات پیشین نشان داده‌اند *HNRNPK* به‌طور مستقیم و همراه با پروتئین *NS1-BP*، الگوی پیرایش رونوشت‌های ویروس آنفلوآنزای A را تنظیم می‌کند و برای تکثیر این ویروس ضروری است (Thompson et al., 2018). همچنین این ژن بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ التهابی را از طریق میانجی‌گری الگوی پیرایش فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌کند (Liu et al., 2023). *RAB5A* ($\Delta\text{PSI}=0.401$) در مسیرهای متعدد ورود/پاکسازی پاتوژن (اندوسیتوز، فاگوزوم، عفونت سالمونلا) حاشیه‌نویسی شد. این

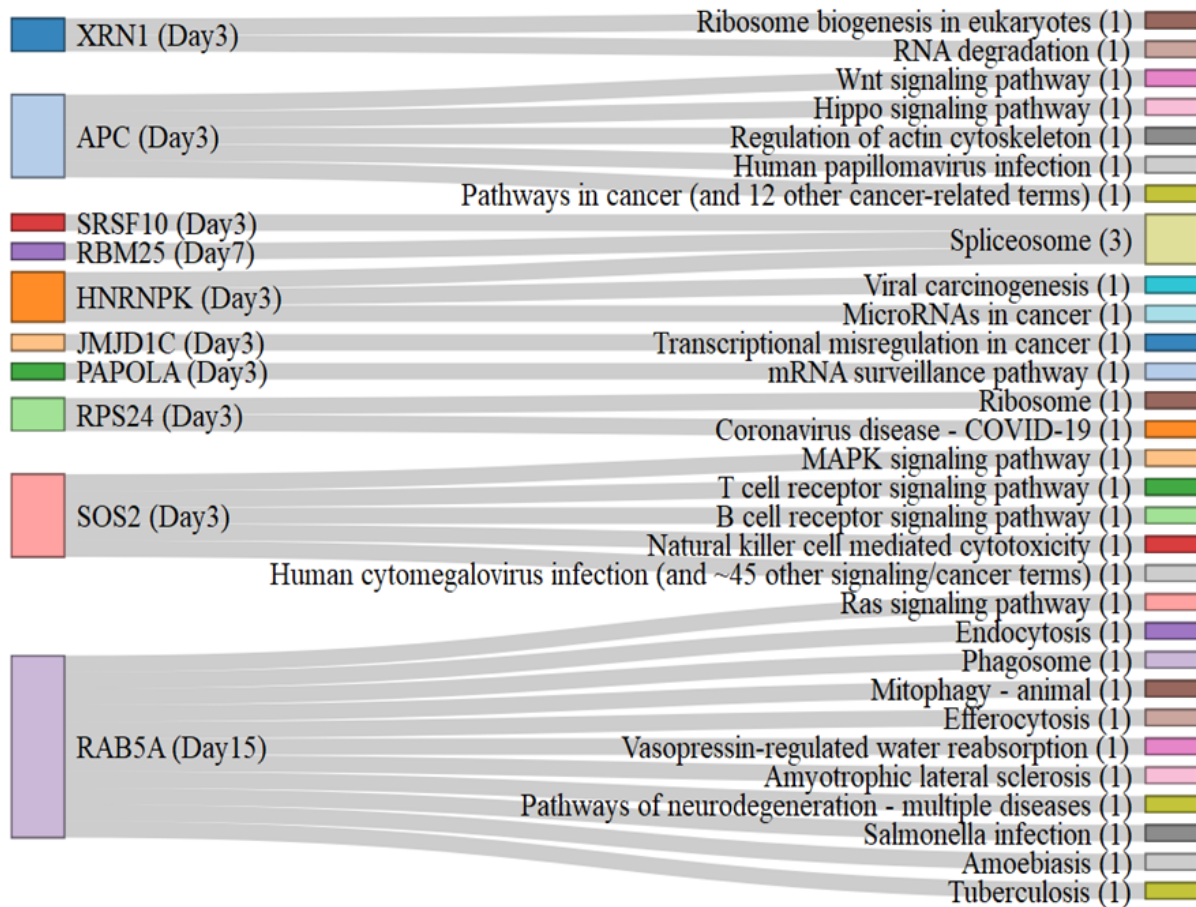
ژن یک GTPase است که در تنظیم ترافیک غشایی داخل سلولی نقش دارد. مطالعات نشان داده‌اند که ویروس تب سه روزه گاوی از مسیر اندوسیتوز وابسته به کلاترین و دینامین ۲ استفاده می‌کند. این مسیر به *Rab5*، *Rab7* و میکروتوبول‌ها نیاز دارد (Cheng et al., 2012). همچنین در عفونت پاراتوبرکلوزیس گاوی، بیان کلی *Rab5* در ماکروفاژها کاهش می‌یابد، درحالی‌که هم‌مکان‌یابی آن با باکتری پاراتوبرکلوزیس به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. این مشاهدات نشان دهنده اختلال در ترافیک درون سلولی پاتوژن از طریق مسیر *Rab5/Rab7* در پاسخ ایمنی گاو به عفونت باکتریایی است (Wherry et al., 2023).

نگته قابل توجه در مورد ژن‌های ذکر شده (*RAB5A* و *HNRNPK*، *XRN1*) این است که در مطالعات قبلی به‌عنوان اهداف میزبانی که ویروس‌ها از آن‌ها برای پیشبرد چرخه تکثیر خود استفاده می‌کنند، معرفی شده‌اند. *XRN1* توسط ویروس آنفلوآنزا A برای سرکوب پاسخ اینترفرونی (Liu et al., 2021)، *HNRNPK* به‌عنوان فاکتور تنظیم کننده‌ی IRES ویروس تب برفکی گاوی (Liu et al., 2020) و *RAB5A* در تثبیت و سازماندهی کمپلکس‌های همانندسازی چندین ویروس دارای ژنوم RNA از طریق مسیر ترافیک ویزیکولی (Cao et al., 2025) مورد سوءاستفاده قرار می‌گیرند. این یافته می‌تواند نقش بالقوه‌ی مشابهی را در تنظیم پیرایش میزبان طی LSDV مطرح سازد.

ژن *PAPOLA* ($\Delta\text{PSI}=0.822$) با بزرگترین اندازه اثر این تحلیل، در مسیر نظارت mRNA قرار داشت. این ژن علاوه بر نقش کلاسیک پلی‌آدنیلایسون و پایداری mRNA، با بیان نامنظم می‌تواند برنامه‌های تنظیمی سلولی را در بافت‌های مختلف به طور قابل توجهی تغییر دهد (Guo et al., 2026). *RPS24* ($\Delta\text{PSI}=-0.602$) تنها ژنی بود که ارتباط مستقیم با یک بیماری ویروسی (کروناویروس-کوید ۱۹) داشت و به عنوان یکی از پروتئین‌های ریبوزومی شناخته می‌شود. این ژن یکی از اهداف رایج ویروس‌ها برای تسهیل ترجمه پروتئین‌های ویروسی و بازسازی ماشین ترجمه میزبان است (Li, 2019).

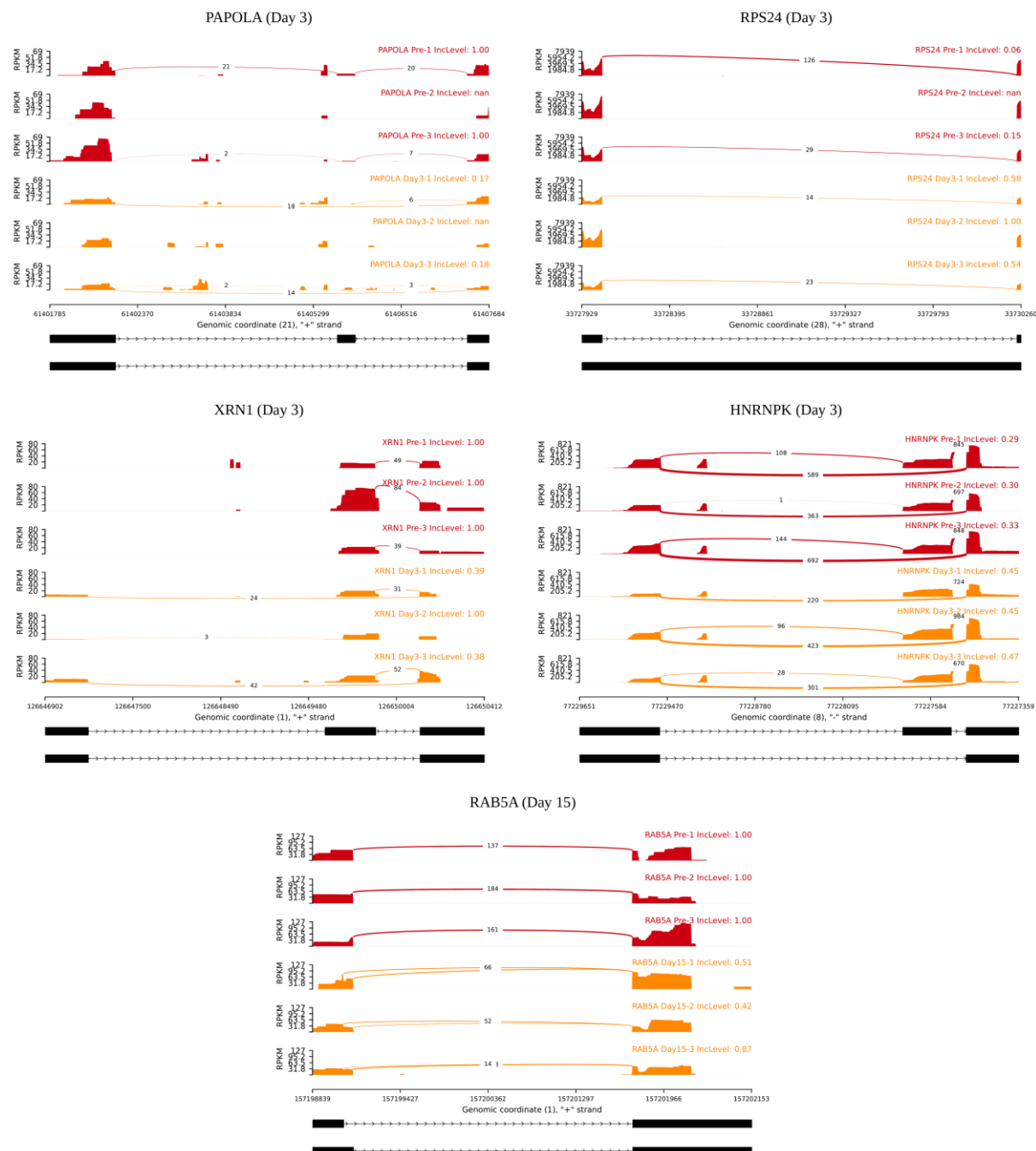
دو ژن *APC* ($\Delta\text{PSI}=0.283$, FDR = 0.022) و *SOS2* ($\Delta\text{PSI}=0.166$, FDR = 0.0003) با وجود معنی‌داری آماری بسیار قوی، از فهرست کاندیدها کنار گذاشته شدند. این دو ژن اندازه اثر کوچکی داشتند و در ده‌ها مسیر غیراختصاصی (عمدتاً سرطان‌های عمومی) حاشیه‌نویسی شدند. این الگو ویژگی کلاسیک ژن‌های هسته‌ای شبکه (hub genes) است. ژن‌های هسته‌ای به دلیل درجه اتصال بالا در شبکه‌های پروتئین-پروتئین و سیگنال‌دهی، در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی و مسیرهای بیماری‌زا (به‌ویژه مسیرهای عمومی سرطان) ظاهر می‌شوند و معمولاً تغییرات آن‌ها به‌تنهایی نمی‌تواند مدرک اختصاصی برای یک پاسخ ویروسی یا فنوتیپ خاص تلقی شود (Alam et al., 2024; Cheng et al., 2025; Ferrari et al., 2014). بنابراین، با وجود اهمیت بالقوه بیولوژیکی، این دو ژن به‌عنوان نشانگرهای اختصاصی پاسخ به LSDV در نظر گرفته نشدند.

به طور کل غالبیت مسیرهای زیستی گروه حساس شامل ماشین پیرایش RNA، ورود/پردازش پاتوژن و ارتباط مستقیم با مسیرهای عفونت ویروسی بود. این نتایج می‌توانند فرضیه‌ی دست‌کاری مستقیم یا غیرمستقیم ماشین‌آلات پردازش RNA و ترافیک ویزیکولی میزبان توسط ویروس را مطرح کنند. با این حال، این فرضیه‌ای تفسیری است که برای بیماری LSD به‌طور مستقیم بررسی نشده و با توجه به تعداد محدود ژن‌های کلیدی در هر گروه بالینی (۲ ژن در گروه تاب‌آور در برابر ۵ ژن در گروه حساس)، نیازمند اعتبارسنجی تجربی در مطالعات آینده است.



شکل ۴- نمودار ارتباط DAS با مسیرهای زیستی غنی شده در گروه حساس، به تفکیک روز پس از آلودگی. ضخامت هر پیوند متناسب با تعداد ژن‌های مشترک بین هر annotation و مسیر است.

Figure 4- diagram illustrating the relationships between genes with DAS and their enriched biological pathways in the suscept group, stratified by day post-infection. Link thickness is proportional to the number of shared gene-pathway annotations



شکل ۵- نمودار ساشیمی ژن‌های *RPS24*، *XRN1*، *PAPOLA* و *HNRNPK* رویداد SE، *RAB5A* رویداد A5SS، بر پایه پوشش واقعی خوانش‌های خام. رنگ قرمز مربوط به پیش از آلودگی و رنگ نارنجی پس از آلودگی را نشان می‌دهند. اعداد روی هر پیوند بیانگر خوانش‌های پشتیبان جانشین پیرایش مربوطه است؛ مقدار IncLevel درج شده برای هر نمونه، مقدار PSI محاسبه شده توسط rMATS-turbo برای همان نمونه است. نمودار زیر هر پائل، ساختار اگزون-اینترون دو ایزوفرم اصلی رویداد پیرایشی را نشان می‌دهد (اگزون‌ها: مستطیل توپر؛ اینترون‌ها: فلش‌های جهت‌دار).

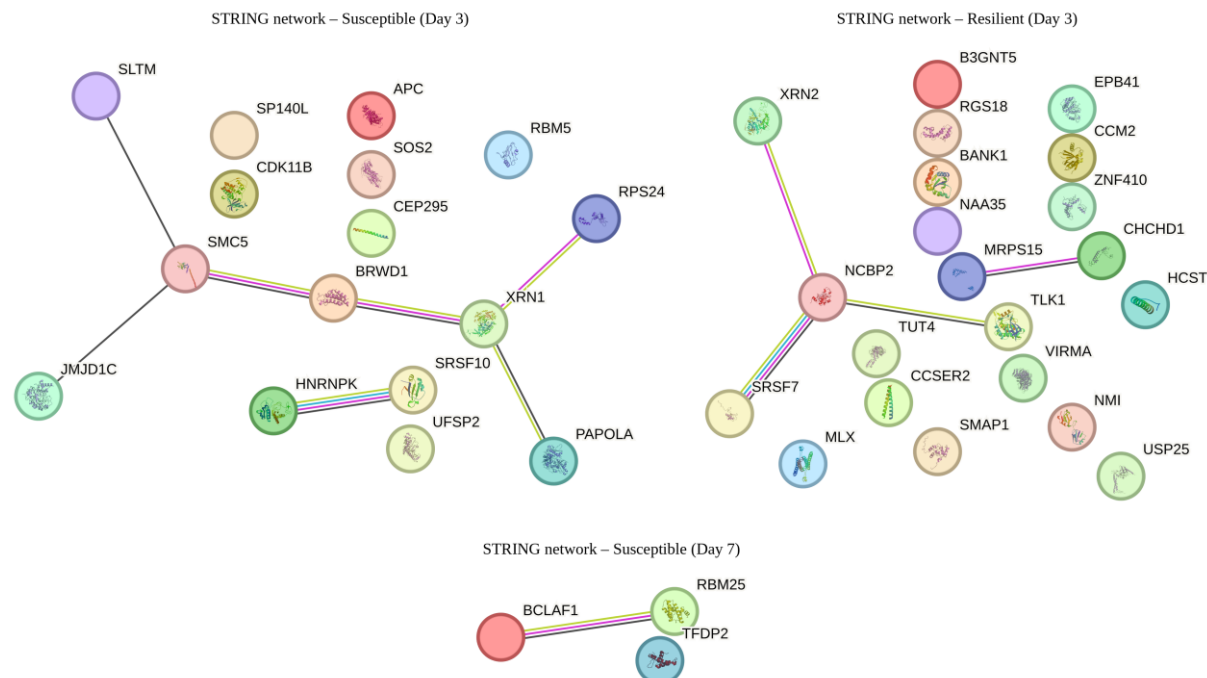
Figure 5 - Sashimi diagram of the genes: *RPS24* event RI, *XRN1*, *PAPOLA* and *HNRNPK* event SE, *RAB5A* event A5SS, based on the actual coverage of raw reads. Red indicates pre-infection samples, and orange indicates post-infection samples. The numbers on each arc represent the number of supporting splice junction reads for the corresponding event; the IncLevel value shown for each sample is the PSI (Percent Spliced-In) value calculated by rMATS-turbo for that sample. The

diagram below each panel shows the exon-intron structure of the two main isoforms of the splicing event (exons: solid rectangles; introns: directional arrows)

نتایج تحلیل شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING در شکل ۶ نمایش داده شده است. برای گروه حساس در روز سوم، شبکه‌ای با ۱۶ گره و ۷ یال ($P\text{-value}=0.001$) و در روز هفتم شبکه‌ای محدودتر با ۳ گره و ۱ یال ($P\text{-value}=0.03$) شناسایی شد که از لحاظ آماری معنی‌دار بودند. شبکه‌ی روز سوم گروه تاب‌آور دارای ۲۱ گره و ۴ یال، معنی‌دار نبود ($P\text{-value}=0.07$). در سایر مقایسه‌ها (روز ۱۵ هر دو گروه) هیچ یالی شناسایی نشد. در گروه حساس، سه کاندید *XRN1*، *RPS24* و *PAPOLA* در شبکه‌ی معنی‌دار روز سوم حضور داشتند. *XRN1* با بالاترین درجه‌ی اتصال این شبکه ($\text{Degree}=3$) به‌عنوان گره‌ی مرکزی شناسایی شد و مستقیماً به هر دو کاندیدای دیگر (*PAPOLA* و *RPS24*) متصل بود. این سه کاندیدا نه تنها به طور مستقل، بلکه در کنار هم به عنوان یک زیرشبکه‌ی متصل شناسایی شدند. این یافته ارتباط این سه ژن را در سطح شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئینی، مستقل از مسیرهای غنی سازی تأیید کرد. *HNRNPK* در همین شبکه تنها با *SRSF10* برهم‌کنش نشان داد و ارتباط مستقیمی با سایر کاندیداها نشان نداد.

برای سایر ژن‌های کاندیدا چنین پشتوانه‌ی شبکه‌ای معنی‌داری مشاهده نشد. با این حال، باید توجه داشت که معنی‌داری شبکه‌ی PPI، به تنهایی نمی‌تواند مکانیسم علیّ رویدادهای پیرایشی را اثبات کند. زیرا این شبکه‌ها بر پایه‌ی برهم‌کنش‌های شناخته‌شده در سطح پروتئین کامل ساخته می‌شوند و اطلاعات مربوط به ایزوفرم‌های اختصاصی حاصل از AS را در بر نمی‌گیرند.

از منظر زیستی، تمرکز معنی‌داری شبکه در روز سوم و تداوم محدود آن در روز هفتم حساس، با الگوی زمانی پاسخ پیرایش گسترده‌تر این گروه هم‌راستا است. این مشاهده می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که بخشی از تغییرات پیرایشی مشاهده‌شده در گروه حساس، به‌جای تغییرات کاملاً پراکنده، در قالب یک مجموعه‌ی مرتبط در سطح برهم‌کنش پروتئینی رخ داده است. با این حال، تأیید قطعی وجود یک برنامه‌ی تنظیمی هماهنگ نیازمند مطالعات عملکردی بیشتر است.



شکل ۶- شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (STRING v12.0) ژن‌های DAS در دو گروه بالینی حساس (روز ۳ و ۷) و تاب‌آور (روز ۳). هر گره یک ژن/پروتئین و هر خط یک برهم‌کنش پیش‌بینی‌شده یا شناخته‌شده بین دو پروتئین را نشان می‌دهد؛ رنگ خطوط بیانگر نوع شواهد پشتیبان (پایگاه‌داده، متن علمی، هم‌بیانی و غیره) طبق طبقه‌بندی استاندارد STRING است.

Figure 6- Protein-protein interaction network (STRING v12.0) of DAS genes in the susceptible (days 3 and 7) and resilient (day 3) clinical groups. Each node represents a gene/protein, and each edge represents a predicted or known interaction between two proteins; edge colors indicate the type of supporting evidence (database, text-mining, co-expression, etc.) according to STRING's standard classification

حاشیه‌نویسی ۵۷ ژن دارای DAS با پایگاه داده AnimalTFDB (نسخه ۴,۰) نشان داد هفت ژن *NR2C2*، *ZNF410*، *BCLAF1*، *TFDP2*، *ZNF131* و *ZNF276* دارای هویت فاکتور رونویسی (TF) بودند. تحلیل در رده‌ی فرآیندهای بیولوژیکی روی این هفت ژن (۱۲ درصد از کل ژن‌ها) پس از تصحیح بنجامینی در دو فرآیند معنی‌دار شد. پنج ژن در تنظیم رونویسی توسط RNA پلیمراز II و چهار ژن تنظیم مثبت رونویسی توسط RNA پلیمراز II قرار داشتند. جدول ۳ نشان می‌دهد که تمامی ۷ ژن TF در این دو فرآیند حضور داشتند. در مقابل، تحلیل KEGG برای همین ژن‌ها به نتیجه‌ی معنی‌داری نرسید و تنها *MLX* دارای حاشیه‌نویسی در مسیر مقاومت انسولینی بود.

جدول ۳- تحلیل هستی‌شناسی ژن از مسیرهای پردازش بیولوژیکی برای ژن‌های TF

Table 3 - Gene ontology analysis of biological processing pathways for TF genes

فرآیند Term	تعداد Count	معیار بنجامینی Benjamini	ژن‌های مربوط Related genes
Regulation of transcription by RNA polymerase II تنظیم رونویسی توسط RNA پلیمراز II	5	0.0115	MLX, TFDP2, ZNF131, ZNF276, ZNF410,
Positive regulation of transcription by RNA polymerase II تنظیم مثبت رونویسی توسط RNA پلیمراز II	4	0.0198	ZNF410, NR2C2, MLX, BCLAF1,

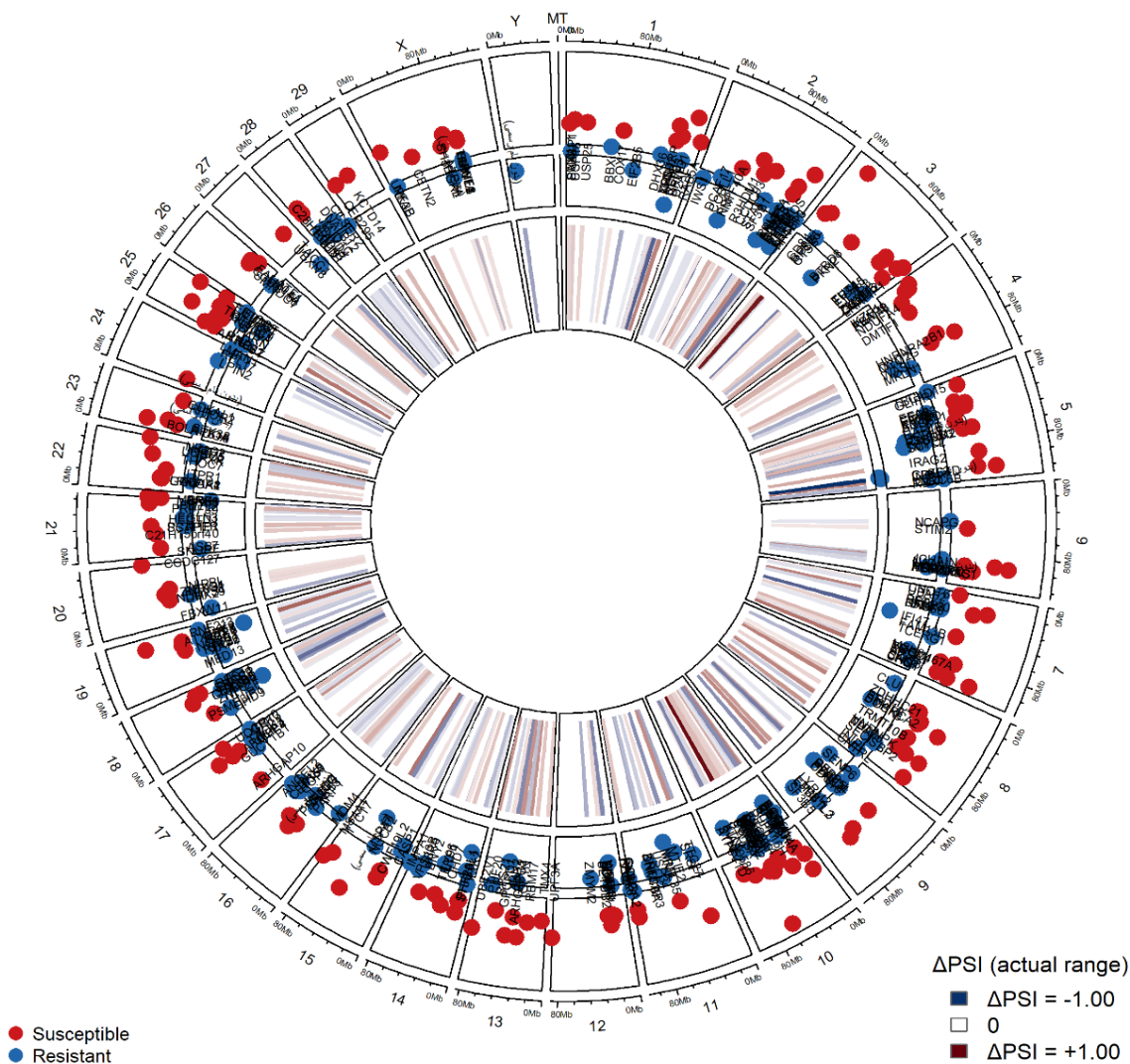
نتایج تحلیل فاکتورهای رونویسی، لایه‌ی مکملی در کنار نتایج اصلی این مطالعه را آشکار کرد. هیچ‌یک از هفت ژن کاندید اصلی (*RAB5A*، *HNRNPK*، *XRN1*، *RPS24*، *PAPOLA*، *DNM2*، *SRSF7*) هویت فاکتور رونویسی نداشتند و عمدتاً به ماشین‌آلات پردازش RNA و مسیرهای مرتبط با ورود یا پاکسازی پاتوژن متعلق بودند. در مقابل، هفت ژن TF شناسایی شده در این تحلیل بخشی از لایه‌ی تنظیم‌کننده‌ی رونویسی هستند که به‌طور مستقل دچار پیرایش جایگزین شده‌اند. عدم همپوشانی بین این دو مجموعه می‌تواند نشان‌دهنده اثر ویروس LSD به‌طور هم‌زمان هم در لایه‌ی اجرایی و هم در لایه‌ی تنظیم‌کننده‌ی بالادستی دستگاه بیان ژن میزبان باشد.

تحلیل مقطعی غیر جفت شده پایه: علاوه بر تحلیل پاسخ درون فردی هر گروه به عفونت، مقایسه‌ی مستقل بین دام‌های حساس و تاب‌آور در روز ۵- (پیش از هرگونه آلودگی) از اهمیت روش‌شناختی و زیستی ویژه‌ای برخوردار است. این مقایسه می‌تواند تأثیر تفاوت‌های مولکولی از پیش موجود بر سرنوشت بالینی متفاوت دو گروه را مشخص سازد. شناسایی DAS ۳۵۳ معنی‌دار در ۳۱۸ ژن یکتا در مقایسه‌ی پایه (پیش از هرگونه مواجهه با ویروس) نشان می‌دهد که بخش قابل‌توجهی از تمایز در پاسخ به ویروس بین دو گروه ممکن است ریشه در زمینه‌ی ژنتیکی/مولکولی فردی داشته باشد و صرفاً پاسخ اکتسابی به بیماری نباشد. این یافته با مطالعات اخیر که نشان می‌دهند تفاوت‌های پیرایش جایگزین و بیان ژن، حتی در وضعیت پایه (پیش از هرگونه تحریک ایمنی) می‌توانند زمینه‌ساز حساسیت یا مقاومت/تاب‌آوری به عفونت‌های ویروسی باشند، هم‌خوانی دارد (Nassiri et al., 2025; Rotival et al., 2019). توزیع ژنومی DAS‌های این مقایسه در شکل ۷ نشان داده شده است. حلقه‌ی بیرونی (مشابه شکل ۱) ایدئوگرام ۳۲ کروموزوم بر پایه‌ی ژنوم مرجع ARS-UCD2.0 است. حلقه‌ی میانی، موقعیت ۳۵۳ رویداد معنی‌دار این مقایسه‌ی مکمل را نشان می‌دهد؛ رنگ قرمز بیانگر رویدادهایی است که پیش از آلودگی، نگه‌داشت بالاتری (PSI بالاتر) در گروه حساس داشته‌اند، و رنگ آبی بیانگر نگه‌داشت بالاتر در گروه تاب‌آور است. حلقه‌ی داخلی، مانند شکل ۱، شدت Δ PSI را با طیف رنگی آبی-سفید-قرمز نمایش می‌دهد. این رویدادها که پیش از هرگونه آلودگی نیز بین دو گروه متفاوت بوده‌اند، به‌عنوان تفاوت‌های زمینه‌ای احتمالی مرتبط با حساسیت/تاب‌آوری به بیماری مطرح می‌شوند. مقدار مثبت Δ PSI نشان‌دهنده‌ی نگه‌داشت بیشتر آن قطعه در گروه حساس نسبت به گروه تاب‌آور و مقدار منفی Δ PSI نشان‌دهنده‌ی نگه‌داشت بیشتر آن قطعه در گروه تاب‌آور نسبت به گروه حساس است.

بررسی مستقیم فهرست کامل ژن‌های دارای DAS در مقایسه‌ی پایه نشان داد که این تفاوت‌ها صرفاً به ژن‌های دارای کارکرد پایه سلولی محدود نمی‌شوند، بلکه به طور خاص اجزای کلیدی مسیرهای ایمنی ذاتی به‌ویژه تشخیص پاتوژن و سیگنال‌دهی اینترفرونی را نیز در بر می‌گیرند.

در گروه تاب‌آور بزرگترین اندازه اثر متعلق به ژن ENSBTAG00000006851 (Δ PSI=-1) بدست آمد که فاقد نام رسمی بود. در این گروه چندین ژن مرتبط با ایمنی ذاتی سطح پیرایش بالاتری نشان دادند. ژن *CLEC4D* (Δ PSI=-0.977) که با نام‌های *CD303* یا *BDCA-2* نیز شناخته می‌شود، عضوی از زیرخانواده Dectin-2 در گیرنده‌های لکتین نوع C است و در سلول‌های میلوئیدی از جمله نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود (Ma et al., 2025). این ژن یکی از بزرگترین اندازه اثرهای مشاهده شده را به خود اختصاص داد. ژن *IFI47* (Δ PSI=-0.734) یک GTPase القاء شونده با اینترفرون گاما است (Meunier & Broz, 2016). در بیماری مایکوباکتریوم آویوم گونه پاراتوبرکلوزیس گاوی این ژن عنوان کاندید موقعیتی در نواحی QTL مرتبط با مقاومت گزارش شده است (Mallikarjunappa et al., 2018). ژن *NMI* (Δ PSI=-0.667) یک ISG القایی است که در انتقال پیام، تنظیم

رونویسی و پاسخ‌های ضد ویروسی نقش دارد. جالب توجه است که ویروس سیتومگالوویروس انسانی با هدف قرار دادن این ژن پاسخ $\text{IFN-}\gamma$ را کاهش می‌دهد (Feng et al., 2023; Xu et al., 2018). برای ژن *CASP1* دو *DAS* معنی‌دار ($\Delta\text{PSI}=-0.316, -0.238$) از نوع SE شناسایی شد. این ژن هسته اصلی اینفلمازوم متعارف و مسئول پردازش *IL-1\beta* و القای پیروپتوز است (Fu et al., 2024). ژن‌های مذکور نگاهداشت پیش از آلودگی بالاتری در گروه تاب‌آور داشتند، اما در گروه حساس، ژن‌های *STAT1* ($\Delta\text{PSI}=0.271$)، *IFI27L2* ($\Delta\text{PSI}=0.308$)، *CD163* ($\Delta\text{PSI}=0.286$) سطح نگاهداشت بالاتری نشان دادند. ژن *STAT1* نقش محوری در مسیر *JAK-STAT* پاسخ اینترفرونی ایفا می‌کند و هدف راهبردی فرار ایمنی در ویروس‌های گاوی از جمله اسهال و هرپس قرار می‌گیرد (Liu et al., 2026; Ma et al., 2019). ژن *IFI27L2* ($\Delta\text{PSI}=0.308$) یک *ISG* است که در پاسخ ایمنی ذاتی نقش دوگانه دارد. از یک سو این ژن با محدود کردن تکثیر ویروس در سلول‌های خاص (مانند نورون‌ها و ماکروفاژها)، به دفاع ضد ویروسی میزبان کمک می‌کند (Lucas et al., 2016) و از سوی دیگر در شرایط التهابی با افزایش تولید *ROS* میتوکندریایی به گسترش التهاب عصبی کمک می‌کند (Kim et al., 2025). ژن *CD163* ($\Delta\text{PSI}=0.286$) گیرنده‌ی جمع‌کننده‌ی هموگلوبین (*Hb*) و یک پروتئین اختصاصی ماکروفاژ است که به طور غیرمستقیم در پاسخ ضد التهابی نقش دارد (Etzerodt & Moestrup, 2013). نتایج مقایسه پایه که قبل از مواجهه با ویروس *LSD* بدست آمد، می‌تواند بیانگر تفاوت‌های پیرایشی زمینه‌ای در اجزای مسیرهای تشخیص پاتوژن و سیگنال‌دهی اینترفرونی باشد.



شکل ۷= نمای دایره‌ای توزیع ژنومی رویدادهای پیرایش جایگزین متفاوت بین دو گروه بالینی در روز ۵- (پیش از آلودگی). حلقه‌ی بیرونی: کروموزوم‌های گاو؛ حلقه‌ی میانی: موقعیت رویدادها، رنگ‌بندی بر اساس گروه (قرمز = حساس، آبی = تاب‌آور)؛ حلقه‌ی داخلی: اندازه‌اثر (ΔPSI) با طیف آبی تا قرمز. این تفاوت‌های پیش از آلودگی، به‌عنوان تفاوت‌های زمینه‌ای احتمالی مرتبط با حساسیت/تاب‌آوری مطرح می‌شوند.

Figure 7- Genomic distribution circles of different splicing events between the two clinical groups at -5 days (pre-infection). Outer ring: bovine chromosome; middle ring: event positions, colored by the group (red = susceptible, blue = resilient); inner ring: effect size (ΔPSI) on a blue-to-red scale. These pre-infection differences are proposed as potential baseline differences associated with susceptibility/resilience

برای درک مسیرهای زیستی درگیر در تفاوت‌های پایه، ۳۱۸ ژن شناسایی شده (۹ مورد فاقد نام) در این تحلیل بر اساس گروه بالینی به دو زیرمجموعه تفکیک و به طور مستقل در DAVID با پس زمینه اختصاصی بررسی شدند. نتایج غنی‌سازی در جدول ۴ گزارش شده است. در زیر مجموعه‌ی تاب‌آور، دو مسیر ریبوزوم (۱۱ ژن) و مسیر ویروس کرونا-کووید ۱۹ (۱۰ ژن) در سطح FDR بنجامینی و سه مسیر دیگر تنها در سطح P -value اسمی معنی‌دار بودند. در زیرمجموعه‌ی حساس هیچ مسیری در سطح FDR بنجامینی معنی‌دار نبود و تنها سه مسیر در سطح P -value مشاهده شد. غنی‌سازی معنی‌دار مسیر ریبوزوم در دام‌های تاب‌آور یافته‌ای قابل توجه است. پروتئین‌های ریبوزومی نه‌تنها در بیوژنز ریبوزوم و ترجمه نقش دارند، بلکه کارکردهای خارج ریبوزومی مهمی در تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی و مقاومت ضد ویروسی

ایفا می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که برخی پروتئین‌های ریبوزومی در مسیرهای سیگنال‌دهی NF- κ B، تولید اینترفرون و کنترل ترجمه انتخابی mRNAهای ضد ویروسی مشارکت دارند و اختلال در آن‌ها می‌تواند حساسیت به عفونت‌های ویروسی را افزایش دهد (Bianco & Mohr, 2019; Zhao et al., 2024).

مشاهده‌ی این غنی‌سازی در وضعیت پایه (پیش از آلودگی) نشان می‌دهد که دام‌های تاب‌آور ممکن است از تنظیم دقیق‌تر ماشین ترجمه و ظرفیت بالاتر پاسخ سریع به محرک‌های ایمنی برخوردار باشند. ژن‌های مسیر ویروس کرونا-کووید ۱۹ همپوشانی بسیار بالایی با ژن‌های مسیر ریبوزومی داشتند که می‌تواند دلیل معنی‌دار شدن این مسیر باشد. از میان ژن‌های منفرد دارای پیرایش مرتبط با ایمنی تنها ژن *CASP1* که با نگهداشت بالاتر در گروه تاب‌آور معرفی شد در مسیر ویروس کرونا مشاهده شد.

نبود غنی‌سازی معنی‌دار در گروه حساس، با الگوی کلی تفاوت‌های زمینه‌ای در سطح پیرایش سازگار است. در دام‌های حساس، مسیرهای دارای *P-value* اسمی عمدتاً مرتبط با سیگنال‌دهی ایمنی، ترافیک وزیکولی و انتقال هسته‌ای-سیتوپلاسمی بودند. این نتیجه نشان می‌دهد که دام‌های حساس حتی پیش از بیماری AS متفاوتی دارند که بیشتر به سمت آمادگی ایمنی و تنظیم پس از رونویسی متمایل است. چنین تفاوت‌های پایه‌ای می‌تواند بخشی از تفاوت‌های مشاهده‌شده در پاسخ پیرایش پس از آلودگی را توضیح دهد. مطالعات روی بیماری‌های ویروسی گاو نیز از این مفهوم حمایت می‌کنند. در بررسی بیان ژن همین دیتاست، گزارش شده است که تفاوت‌های بیان ژن (از جمله *IL1RAP*) در وضعیت پیش از آلودگی می‌تواند پیش‌بینی‌کننده حساسیت یا تاب‌آوری پس از چالش ویروسی باشد (Banabazi et al., 2025). همچنین در بیماری تنفسی گاوها^۱، پروفایل ترانسکریپتومی پایه در بدو ورود دام‌ها توانست حیوانات مقاوم را از حیواناتی که بعداً بیمار می‌شوند متمایز کند (Scott et al., 2020). این شواهد در کنار یافته‌های حاضر، از فرضیه‌ی آمادگی ایمنی متفاوت^۲ در سطح پردازش RNA حمایت می‌کند (Boudreault et al., 2016; Sehrawat & Garcia-Blanco, 2023) و نشان می‌دهد که تفاوت‌های پیش‌موجود در چشم‌انداز AS می‌توانند به‌عنوان یکی از عوامل مولکولی زمینه‌ساز حساسیت یا تاب‌آوری به LSDV عمل کنند.

جدول ۴- نتایج غنی‌سازی KEGG برای مقایسه پایه دام‌های حساس و تاب‌آور

Table 3- KEGG enrichment results for comparing the bases of susceptible and Resilient animals

Benjamini (FDR)	P-value	ژن‌های مربوطه Included genes	تعداد count	مسیر KEGG KEGG pathway	گروه group
0.001	1.15E-05	RPS28, RPS29, RPLP1, RPL37A, RPS27L, RPL26, RPS11, UBA52, RPL17, MRPL35, MRPS18C	11	ریبوزوم Ribosome	تاب‌آور resilient
0.034	0.000425	RPS28, RPS29, RPLP1, RPL37A, CASP1, RPS27L, RPL26, RPS11, UBA52, RPL17	10	بیماری کروناویروس کوید ۱۹ Coronavirus disease - COVID-19	
0.321	0.00587	COP1, FBXW11, UBR5, HUWE1, UBA52, RBX1	6	پروتئولیز با واسطه یوبی کوئیتین Ubiquitin mediated proteolysis	
0.75	0.0183	LSM7, XRN1, SKIC3, DHX36	4	تجزیه RNA	

^۱ Bovine respiratory disease

^۲ differential immune readiness

1.00	0.0442	USP15, HUWE1, UBA52, TBC1D15	4	RNA degradation میتوفازی حیوانات Mitophagy - animal	
1.00	0.0443	VASP, RAP1B, AKT3, ITPR1	4	فعالسازی پلاکت Platelet activation	حساس susceptible
1.00	0.0457	EEA1, STAT1, AKT3, BOLA-DOA, RAB5A	5	سل Tuberculosis	
1.00	0.0461	UPF3B, UPF3A, RNPS1, THOC7	4	انتقال نوکلئوسیتوپلاسمی Nucleocytoplasmic transport	

اعداد بولدشده در ستون Benjamini نشان دهنده‌ی مسیرهایی هستند که پس از تصحیح آزمون چندگانه نیز معنی‌دار باقی مانده‌اند. سایر مسیرها فقط در سطح نامی ($P < 0.05$) معنی‌دار بودند و از تصحیح آزمون چندگانه عبور نکردند.

The bolded values in the Benjamini column indicate pathways that remained significant even after multiple testing correction. The other pathways were significant only at the nominal level ($P < 0.05$) and did not pass the multiple testing correction.

از میان هفت ژن کاندیدای اصلی شناسایی شده در تحلیل جفت شده طولی، چهار ژن (*XRN1*، *HNRNPK*، *SRSF7*) و *RAB5A* به‌طور مستقل در تحلیل غیر جفت شده پایه نیز دارای پیرایش متفاوت بین دو گروه بودند. در سه مورد (*XRN1* و *HNRNPK*، *SRSF7*) نوع رویداد پیرایشی نیز یکسان بود (به‌ترتیب *A5SS*، *SE* و *SE*). بررسی جهت‌دار این چهار ژن مشترک بین دو تحلیل، الگوی قابل توجهی را آشکار کرد. در سه ژن (*XRN1* و *HNRNPK*، *SRSF7*)، گروهی که در حالت پایه (پیش از آلودگی) سطح نگه‌داشت متفاوت‌تری نشان داده بود، پس از عفونت در جهتی تغییر کرد که به سطح ذاتی گروه مقابل نزدیک‌تر شود. گروه تاب‌آور در *SRSF7* و گروه حساس در *XRN1* هرکدام از سطح پایین‌تر پایه به‌سمت سطح بالاتر گروه مقابل حرکت کردند. در *HNRNPK* نیز گروه حساس از سطح بالاتر پایه به‌سمت سطح پایین‌تر گروه تاب‌آور تغییر یافت. این نتیجه نشان می‌دهد بخشی از پاسخ پیرایشی به عفونت، ممکن است نقش تنظیمی-جبرانی داشته باشد. در مقابل، ژن *RAB5A* الگویی از تشدید انحراف به‌جای همگرایی نشان داد. این ژن در تحلیل پایه گروه حساس نگه‌داشت بالایی داشت (رویداد *RI*) و پس از عفونت نگه‌داشت را بیشتر افزایش داد (رویداد *A5SS*، روز پانزدهم). این یافته ممکن است نشان دهنده‌ی یک اختلال پیش‌رونده و غیرجبران‌پذیر در مسیر ورود/پاکسازی پاتوژن وابسته به *RAB5A* در دام‌های حساس باشد. حضور ژن *XRN1* در مسیر تخریب RNA در تحلیل پایه گروه تاب‌آور نیز جالب توجه است؛ زیرا همین ژن در تحلیل طولی دام‌های حساس پس از آلودگی به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی معرفی شده است. این هم‌پوشانی نشان می‌دهد که احتمالاً شبکه‌ی پردازش RNA حتی در سطح پایه بین دو گروه متفاوت است و با نقش شناخته‌شده *XRN1* در تنظیم پاسخ‌های ضدویروسی هم‌خوانی دارد (Liu et al., 2021). این نتایج نشان می‌دهد که بخشی از تفاوت‌های مشاهده‌شده در پاسخ به عفونت، ریشه در تفاوت‌های زمینه‌ای سطح پیرایش دارد و صرفاً پاسخ اکتسابی نیست. چنین ژن‌هایی که هم در وضعیت پایه و هم در پاسخ دینامیک به عفونت تغییر می‌کنند، کاندیداهای قوی تری برای نقش در تعیین سرنوشت بالینی محسوب می‌شوند. این هم‌پوشانی بین ژن‌های دارای تفاوت پیرایش در تحلیل پایه و تحلیل طولی، با یافته‌های قبلی در مونوسیت‌های انسان هم‌خوانی دارد که نشان داده‌اند بخش قابل توجهی از تنظیم‌کننده‌های پیرایشی هم در حالت پیش از تحریک ایمنی و هم پس از آن فعال هستند (Rotival et al., 2019).

یافته‌های حاصل از ترکیب دو رویکرد تحلیلی (مقایسه جفت شده درون فردی و مقایسه غیر جفت شده پایه) نشان می‌دهد که تفاوت‌های پیرایش جایگزین نه تنها در پاسخ به عفونت، بلکه از پیش از مواجهه با ویروس نیز می‌توانند سرنوشت بالینی دام را تحت تأثیر قرار دهند. ژن‌های شناسایی شده (به‌ویژه چهار ژن مشترک *SRSF7*، *HNRNPK*، *XRN1* و *RAB5A* که در هر دو مقایسه معنی‌دار بودند) به عنوان کاندیدهای اولیه برای نقش در تعیین تاب‌آوری یا حساسیت به بیماری مطرح می‌شوند.

این ژن‌ها دو مسیر کاربردی مکمل پیش روی مطالعات آتی قرار می‌دهند. نخست، از آنجا که الگوی پیرایش آن‌ها پیش از آلودگی نیز قابل اندازه‌گیری است، می‌تواند مبنای توسعه نشانگرهای مولکولی پیش‌گویانه مبتنی بر RT-qPCR اختصاصی جانکشن قرار گیرند و امکان غربالگری دام‌ها را بدون نیاز به مواجهه با ویروس فراهم کنند. رویکردهای مشابه مبتنی بر استفاده از نشانگرهای رونوشتی پیش از بیماری، پیش‌تر در پیش‌بینی مقاومت به بیماری تنفسی گاو با موفقیت به کار گرفته شده‌اند (Scott *et al.*, 2020). دوم، این ژن‌ها اهداف مناسبی برای مطالعات هدفمند SQTL و بررسی عملکرد ایزوفرم‌های خاص در مسیرهای ایمنی ذاتی هستند و در صورت اعتبارسنجی در جمعیت‌های بزرگ‌تر، می‌توانند در برنامه‌های انتخاب ژنومی برای بهبود مقاومت به LSD گنجانده شوند (Bishop & Woolliams, 2014; Xiang *et al.*, 2023).

با این حال، یافته‌های حاضر با توجه به حجم نمونه‌ی محدود، باید به‌عنوان کاندیدهای اولیه در نظر گرفته شوند و اعتبارسنجی مستقل در جمعیت‌های بزرگ‌تر و شرایط مختلف ضروری است. در مجموع، نتایج این مطالعه بر اهمیت در نظر گرفتن لایه تنظیم پیرایش جایگزین در کنار بیان ژن تأکید دارد و چارچوبی برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز تفاوت‌های فردی در پاسخ به عفونت‌های ویروسی در گاو ارائه می‌دهد. اگرچه LSD در ایران در حال حاضر شیوع گسترده ندارد، با توجه به گزارش‌های قبلی وقوع بیماری در کشور از سال ۲۰۱۴ (Ardestani, 2017; Samea Yousefi *et al.*, 2020) ، ماهیت فرامرزی آن و خطر بالقوه گسترش مجدد، یافته‌های این مطالعه از ارزش عملی و راهبردی برخوردارند. این نتایج می‌توانند مبنایی برای توسعه نشانگرهای مولکولی پیش‌گویانه و برنامه‌های انتخاب ژنومیک جهت افزایش تاب‌آوری/مقاومت فراهم کنند.

نتیجه‌گیری کلی

رویدادهای پیرایشی در تحلیل طولی جفت شده درون فردی پس از آلودگی، الگوی متمایزی بین دو گروه بالینی نشان دادند. در دام‌های تاب‌آور ژن‌های *SRSF7* و *DNM2* و در دام‌های حساس ژن‌های *PAPOLA*، *RPS24*، *XRN1*، *HNRNPK* و *RAB5A* به عنوان ژن‌های کلیدی شناسایی شدند. دام‌های تاب‌آور پاسخ پیرایشی کنترل‌شده‌ای شامل فعال‌سازی ماشین پیرایش در روز سوم، سکون در روز هفتم و تمرکز بر اندوسیتوز و فاگوسیتوز در روز پانزدهم داشتند، در حالی که دام‌های حساس پیرایش اولیه گسترده‌تری در سطح اسپلایسوزوم، ریبوزوم و تخریب RNA نشان دادند که در نهایت به محور پایدار *RAB5A* در روز پانزدهم متمرکز شد. چهار ژن *XRN1*، *HNRNPK*، *RPS24* و *PAPOLA* توسط شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئینی نیز حمایت شدند. همگرایی چهار ژن *SRSF7*، *HNRNPK*، *XRN1* و *RAB5A* میان تحلیل جفت شده‌ی طولی و تحلیل مقطعی غیرجفت شده‌ی پایه، شاهد مستقلی فراهم می‌آورد که تفاوت‌های پیرایش جایگزین نه تنها در پاسخ به عفونت با ویروس LSD، بلکه حتی پیش از مواجهه با ویروس نیز می‌توانند سرنوشت بالینی دام را تحت تأثیر قرار دهند.

درگیری مسیر آندوسیتوز در هر دو گروه از طریق دو ژن متفاوت (*DNM2* در تاب‌آور و *RAB5A* در حساس) و هم‌پوشانی چهار ژن در هردو تحلیل نشان می‌دهد که تفاوت‌های پیش‌زمینه در تنظیم ترجمه، تخریب RNA و ترافیک وزیکولی می‌تواند کیفیت پاسخ به عفونت را شکل دهد. این یافته‌ها فرضیه‌ای قابل بررسی مطرح می‌کند که الگوی پیرایش پیش از آلودگی می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای پیش‌بینی حساسیت یا تاب‌آوری دام به LSD پیش از بروز بیماری به‌کار رود. چنین رویکردی، در صورت تأیید در مطالعات با حجم نمونه‌ی بزرگ‌تر، می‌تواند کاربرد عملی مستقیمی در برنامه‌های انتخاب و مدیریت گله داشته باشد.

در مجموع، ترکیب دو رویکرد تحلیلی (طولی جفت شده و پایه) از فرضیه‌ی آمادگی ایمنی متفاوت در سطح پردازش RNA پیش از مواجهه با پاتوژن حمایت می‌کند و نشان می‌دهد که لایه‌ی تنظیم پیرایش جایگزین، مستقل از بیان ژن، می‌تواند بخشی از تفاوت‌های فردی در حساسیت/تاب‌آوری به LSDV را توضیح دهد. با این حال، با توجه به حجم محدود نمونه ($n=2$ در برابر $n=3$) و ماهیت اکتشافی تحلیل، این یافته‌ها باید به‌عنوان کاندیدهای مولکولی اولیه در نظر گرفته شوند که نیازمند اعتبارسنجی مستقل در جمعیت‌های بزرگ‌تر هستند. در صورت تأیید، این ژن‌ها می‌توانند مبنایی برای توسعه‌ی نشانگرهای پیش‌گویانه‌ی مبتنی بر RT-qPCR و برنامه‌های انتخاب ژنومیک مقاومت به بیماری LSD فراهم آورند، موضوعی که با توجه به سابقه‌ی بیماری در ایران و ریسک فرامرزی بازگشت آن، اهمیت عملی روشنی دارد.

References

- Afzal, H., Umar, M., Hussain, W., & Cheng, L.-T. (2024). Lumpy skin disease: an encroaching risk in cattle farming. *Taiwan Veterinary Journal*, 49(01), 1-11. <https://doi.org/10.1142/S1682648524300016>
- Akther, M., Akter, S. H., Sarker, S., Aleri, J. W., Annandale, H., Abraham, S., & Uddin, J. M. (2023). Global burden of lumpy skin disease, outbreaks, and future challenges. *Viruses*, 15(9), 1861. <https://doi.org/10.3390/v15091861>
- Alam, M. S., Sultana, A., Kibria, M. K., Khanam, A., Wang, G., & Mollah, M. N. H. (2024). Identification of Hub of the Hub-Genes From Different Individual Studies for Early Diagnosis, Prognosis, and Therapies of Breast Cancer. *Bioinformatics and Biology Insights*, 18, 11779322241272386. <https://doi.org/10.1177/11779322241272386>
- Allaire, J., Gandrud, C., Russell, K., & Yetman, C. (2017). networkD3: D3 JavaScript Network Graphs from R. (Version 0.4). <https://cran.r-project.org/package=networkD3>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data [Software]. Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Ardestani, E. G., & Mokhtari, A. (2020). Modeling the lumpy skin disease risk probability in central Zagros Mountains of Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 176, 104887. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104887>
- Asselstine, V., Medrano, J. F., & Cánovas, A. (2022). Identification of novel alternative splicing associated with mastitis disease in Holstein dairy cows using large gap read mapping. *BMC genomics*, 23(1), 222. <https://doi.org/10.1186/s128-۰۸۴۳۰-۰۲۲-۶۴x>
- Badia-Bringué, G., Lavín, J. L., Casais, R., & Alonso-Hearn, M. (2024). Alternative splicing of pre-mRNA modulates the immune response in Holstein cattle naturally infected with

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, Volume 15 - 2024. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1354500>

Bakar, L., Hussein, A. S., Tamam, S. M., & Madbouly, H. M. (2021). Isolation of lumpy skin disease virus isolated from SPPV vaccinated cattle. *Journal of veterinary medical Research*, 28(1), 38-44. <https://doi.org/10.21608/JVMR.2021.73921.1037>

Bakhtiarzadeh, M. R. (2024). Deciphering the role of alternative splicing as a potential regulator in fat-tail development of sheep: a comprehensive RNA-seq based study. *Scientific Reports*, 14(1), 2361. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52855-1>

Banabazi, M. H., Van Borm, S., Klingström, T., Niazi, A., De Clercq, K., Mostin, L., Haegeman, A., & de Koning, D. J. (2025). Host transcriptome profiling for resistance against lumpy skin disease (LSD). *BMC Research Notes*, 18(1), 299. <https://doi.org/10.1186/s13104-025-07388-9>

Begg, B. E., Ferretti, M. B., Tracey, M. A., & Lynch, K. W. (2025). Viral Modulation of Host Splicing. *Annu Rev Virol*, 12(1), 203-222. <https://doi.org/10.1147/annurev-virology-092623-102539>

Bianco, C., & Mohr, I. (2019). Ribosome biogenesis restricts innate immune responses to virus infection and DNA. *Elife*, 8, e49551. <https://doi.org/10.7554/eLife.49551>

Bishop, S. C., & Woolliams, J. A. (2014). Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Science*, 166, 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.034>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Boudreault, S., Martenon-Brodeur, C., Caron, M., Garant, J.-M., Tremblay, M.-P., Armero, V. E., Durand, M., Lapointe, E., Thibault, P., & Tremblay-Létourneau, M. (2016). Global profiling of the cellular alternative RNA splicing landscape during virus-host interactions. *PloS one*, 11(9), e0161914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161914>

Cao, G.-X., Liu, F.-X., Meng, C.-C., Ding, C., Dai, J., & Qiu, X.-S. (2025). Virus infection and vesicle trafficking [Review]. *Frontiers in Immunology*, Volume 16 - 2025. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1682139>

Chacko, E., & Ranganathan, S. (2009). Genome-wide analysis of alternative splicing in cow: implications in bovine as a model for human diseases. *BMC genomics*, 10(3), S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-S3-S11>

Cheng, C. Y., Shih, W. L., Huang, W. R., Chi, P. I., Wu, M. H., & Liu, H. J. (2012). Bovine ephemeral fever virus uses a clathrin-mediated and dynamin 2-dependent endocytosis pathway that requires Rab5 and Rab7 as well as microtubules. *Journal of Virology*, 86(24), 13653-13661. <https://doi.org/10.1128/jvi.01073-12>

Cheng, F., Jia, P., Wang, Q., Lin, C.-C., Li, W.-H., & Zhao, Z. (2014). Studying Tumorigenesis through Network Evolution and Somatic Mutational Perturbations in the Cancer Interactome. *Molecular Biology and Evolution*, 31(8), 2156-2169. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu167>

Chouhan, C. S., Parvin, M. S., Ali, M. Y., Sadekuzzaman, M., Chowdhury, M. G. A., Ehsan, M. A & Islam, M. T. (2022). Epidemiology and economic impact of lumpy skin disease of cattle in Mymensingh and Gaibandha districts of Bangladesh. *Transbound Emerg Dis*, 69(6), 3405-3418. <https://doi.org/10.1111/tbed.14697>

Chung, L. M., Ferguson, J. P., Zheng, W., Qian, F., Bruno, V., Montgomery, R. R., & Zhao, H. (2013). Differential expression analysis for paired RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 110. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-110>

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., & Davies, R. M. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>

Das, M., Chowdhury, M. S. R., Akter, S., Mondal, A. K., Uddin, M. J., Rahman, M. M., & Rahman, M. M. (2021). An updated review on lumpy skin disease: perspective of Southeast Asian countries. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 4(3), 322-333. <https://doi.org/10.5455/jabet.2021.d133>

Demirdjian, L., Xu, Y., Bahrami-Samani, E., Pan, Y., Stein, S., Xie, Z., Park, E., Wu, Y. N., & Xing, Y. (2020). Detecting Allele-Specific Alternative Splicing from Population-Scale RNA-Seq Data. *The American Journal of Human Genetics*, 107(3), 461-4. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.07.005>

Durieux, A.-C., Prudhon, B., Guicheney, P., & Bitoun, M. (2010). Dynamin 2 and human diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 88(4), 339-350. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0587-4>

El-Nady, H. H., Mansour, A., Eissa, M. I., Abou-Zeid, N. Z., Fawzi, E. M., El-Raof, A. M. A., Sobeih, A. A., Bakrash, M. M., & Shazly, Y. A. E. (2026). Epidemiological Study and Molecular Characterization of Lumpy Skin Disease in Cattle in Egypt. *Veterinary Medicine International*, 2026(1), 2835566. <https://doi.org/10.1155/vmi/2835566>

Eltom, K. H., Althoff, A. C., Hansen, S., Böhlken-Fascher, S., Yousif, A., El-Sheikh, H. A., ElWakeel, A. A., Elgamel, M. A., Mossa, H. M., Aboul-Soud, E. A., Wolff, J., Korthase, C., Hoffmann, B., Adam, N. M., Abdelaziz, S. A., Shalaby, M. A., & Abd El Wahed, A. (2021). Differentiation of Capripox Viruses by Nanopore Sequencing. *Vaccines*, 9(4), 351. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/4/351>

Etzerodt, A., & Moestrup, S. K. (2013). CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(17), 2352-2363. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>

Feng, L., Li, W., Li, X., Li, X., Ran, Y., Yang, X., Deng, Z., & Li, H. (2023). N-MYC-interacting protein enhances type II interferon signaling by inhibiting STAT1 sumoylation. *The FASEB Journal*, 37(12), e23281. <https://doi.org/10.1096/fj.202301450RR>

Ferrari, I., De Grossi, F., Lai, G., Oliveto, S., Deroma, G., Biffo, S., & Manfrini, N. (2025). CancerHubs: a systematic data mining and elaboration approach for identifying novel cancer-related protein interaction hubs. *Briefings in bioinformatics*, 26(1). <https://doi.org/10.1093/bib/bbae635>

Fu, J., Schroder, K., & Wu, H. (2024). Mechanistic insights from inflammasome structures. *Nature Reviews Immunology*, 24(7), 518-535. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-00995-w>

Gogoi, A., Das, B., Chabukdhara, P., Phookan, A., & Phangchopi, D. (2022). Livestock Breeding for Disease Resistance: A Perspective Review. *Agric Rev*, 43(1), 116-121. <https://doi.org/10.18805/ag.R-2169>

Goret, M., Edelweiss, E., Jehl, J., Reiss, D., Aguirre-Pineda, P., Friant, S., & Laporte, J. (2025). Combining dynamin 2 myopathy and neuropathy mutations rescues both phenotypes. *Nature Communications*, 16(1), 666. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59925-6>

Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., & Brors, B. (2014). circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics*, 30(19), 2811-2812. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu397>

Guo, S., Zou, Y., Zhang, C., Han, H., Li, Y., Sun, Y., Wang, Z., Zhang, W., Zhang, J., Gan, Y., Zhang, Q., Ma, J., Zheng, S., Qiu, H., Zhu, Y., Lu, W., Bao, Y., Zhao, M., & Lin, S. (2026). PAPOLA-mediated hyperactive polyadenylation promotes leukemogenesis and leukemia stem cell self-renewal through metabolic reprogramming. *Nature Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s43018-026-01190-7>

Hardy, A., Bakshi, S., Furnon, W., MacLean, O., Gu, Q., Varjak, M., Varela, M., Aziz, M. A., Shaw, A. E., & Pinto, R. M. (2015). The timing and magnitude of the type I interferon response are correlated with disease tolerance in arbovirus infection. *mBio*, 14(3), e00101-00123. <https://doi.org/10.1128/mbio.00101-23>

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>

Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907-915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

Kim, G. S., Harmon, E., Gutierrez, M. C., Kim, S., Vance, L., Burrous, H., Stephenson, J. M., Chauhan, A., Banerjee, A., Wise, Z., Doan, A., Ahn, J., Wu, T., Bautista-Garrido, J., Lee, J., Tan, C., Jung, J. E., McCullough, L. D., Wythe, J. D., & Marrelli, S. P. (2025). Single-cell analysis identifies Ifi2712a as a gene regulator of microglial inflammation in the context of aging and stroke in mice. *Nature Communications*, 16(1), 1639. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56847-1>

Kumar, N., Sharma, S., & Tripathi, B. N. (2025). Pathogenicity and virulence of lumpy skin disease virus: A comprehensive update. *Virulence*, 16, 2490108. <https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2495108>

Li, H., Huang, J., Zhang, J., Gao, Y., Han, B., & Sun, D. (2022). Identification of Alternative Splicing Events Associated with Paratuberculosis in Dairy Cattle Using Multi-Tissue RNA Sequencing Data. *Genes (Basel)*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/genes13030497>

Li, S. (2019). Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells*, 8(5), 508. <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/508>

Liu, S., Duan, Y., You, R., Chen, D., & Tan, J. (2023). HnRNP K regulates inflammatory gene expression by mediating splicing pattern of transcriptional factors. *Experimental Biology and Medicine*, 248(17), 1479-1491. <https://doi.org/10.1177/15353702221110649>

Liu, T.-y., Liu, S.-s., Zhou, Y., Song, Y.-x., Zhang, Z.-c., Zhao, C., Li, J., Tian, L.-b., Li, N., & Liu, Y. (2026). BVDV hijacks the IDO1-dependent tryptophan–kynurenine axis to promote viral replication by limiting interferon–STAT1 antiviral signaling. *Veterinary Microbiology*, 320, 111096. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2026.111096>

Liu, W., Yang, D., Sun, C., Wang, H., Zhao, B., Zhou, G., & Yu, L. (2020). hnRNP K Is a Novel Internal Ribosomal Entry Site-Transacting Factor That Negatively Regulates Foot-and-Mouth Disease Virus Translation and Replication and Is Antagonized by Viral 3C Protease. *Journal of Virology*, 94(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.00803-20>

Liu, Y.-C., Mok, B. W.-Y., Wang, P., Kuo, R.-L., Chen, H., & Shih, S.-R. (2021). Cellular 5'-3' mRNA Exoribonuclease XRN1 Inhibits Interferon Beta Activation and Facilitates Influenza

A Virus Replication. *mBio*, 12(4), 10.1128/mbio.00945-00921. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.00945-21>

Lucas, T. M., Richner, J. M., & Diamond, M. S. (2016). The Interferon-Stimulated Gene *IFI2712a* Restricts West Nile Virus Infection and Pathogenesis in a Cell-Type- and Region-Specific Manner. *Journal of Virology*, 90(5), 2600-2615. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.02463-15>

Ma, K., Feng, M., Qiao, A., Li, L., & Wang, X. (2025). Knockdown of CLEC4D alleviates myoblast dysfunction and inflammation in sarcopenia by inhibiting the JAK/STAT pathway. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 26(1), 981. <https://doi.org/10.1186/s12891-025-09085-x>

Ma, W., Wang, H., & He, H. (2019). Bovine herpesvirus 1 tegument protein UL41 suppresses antiviral innate immune response via directly targeting STAT1. *Veterinary Microbiology*, 239, 108494. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108494>

Mallikarjunappa, S., Sargolzaei, M., Brito, L. F., Meade, K. G., Karrow, N., & Pant, S. (2018). Uncovering quantitative trait loci associated with resistance to *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection in Holstein cattle using a high-density single nucleotide polymorphism panel. *Journal of dairy science*, 101(8), 7280-7286. <https://doi.org/10.3168/jds.2018.12546>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Meunier, E., & Broz, P. (2016). Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cellular Microbiology*, 18(2), 168-180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cmi.12546>

Molla, W., de Jong, M. C. M., Gari, G., & Frankena, K. (2017). Economic impact of lumpy skin disease and cost effectiveness of vaccination for the control of outbreaks in Ethiopia. *Prev Vet Med*, 147, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.09.003>

Nassiri, I., Gilchrist, J. J., Tong, O., Lau, E., Danielli, S., Mossawi, H. A., Neville, M. J., Knight, J. C., & Fairfax, B. P. (2025). Genetic determinants of monocyte splicing are enriched for disease susceptibility loci. *Nature Communications*, 16(1), 8616. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63624-7>

Rajendran, V. O., Govindaraj, G., Arivazhagan, A., Premkumar, D., Jayakumar, V., Saravanan, B. C., Nandi, S., Panday, S., & Singh, B. R. (2025). Estimation of the economic impact of lumpy skin disease (LSD) outbreaks (2022–23) in dairy cattle farmers of Uttar Pradesh, India. *The Microbe*, 8, 100513. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100513>

Richardson, L. A. (2016). Understanding Disease Tolerance and Resilience. *PLoS Biol*, 14(7), e1002513. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002513>

Rotival, M., Quach, H., & Quintana-Murci, L. (2019). Defining the genetic and evolutionary architecture of alternative splicing in response to infection. *Nature Communications*, 10(1), 1671. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09689-7>

Sameea Yousefi, P., Mardani, K., Dalir-Naghadeh, B., & Jalilzadeh-Amin, G. (2017). Epidemiological study of lumpy skin disease outbreaks in North-western Iran. *Transboundary and emerging diseases*, 64(6), 1782-1789. <https://doi.org/10.1111/tbed.12565>

Scott, H. M., Smith, M. H., Coleman, A. K., Apostalo, S. L., Wagner, A. R., Watson, R. O., & Patrick, K. L. (2023). Serine arginine-rich splicing factor (SRSF7) cooperates with the histone methyltransferase KMT5a to promote the type I interferon response via transcriptional activation of IRF7. *bioRxiv*, 2023.2005.2009.540055. <https://doi.org/10.1101/2023.05.09.540055>

Scott, H. M., Smith, M. H., Coleman, A. K., Armijo, K. S., Chapman, M. J., Apostalo, S. L., Wagner, A. R., Watson, R. O., & Patrick, K. L. (2024). Serine/arginine-rich splicing factor 7 promotes the type I interferon response by activating Irf7 transcription. *Cell reports* .(3)43 , <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113816>

Scott, M. A., Woolums, A. R., Swiderski, C. E., Perkins, A. D., Nanduri, B., Smith, D. R., Karisch, B. B., Epperson, W. B., & Blanton, J. R., Jr. (2020). Whole blood transcriptomic analysis of beef cattle at arrival identifies potential predictive molecules and mechanisms that indicate animals that naturally resist bovine respiratory disease. *PloS one*, 15(1), e0227507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227507>

Sehrawat, S., & Garcia-Blanco, M. A .(2022) .RNA virus infections and their effect on host alternative splicing. *Antiviral Research*, 210, 105503. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105503>

Shen, S., Park, J. W., Lu, Z.-x., Lin, L., Henry, M. D., Wu, Y. N., Zhou, Q., & Xing, Y. (2014). rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), E5593-E5601. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1419161111>

Shen, W.-K., Chen, S.-Y., Gan, Z.-Q ,Zhang, Y.-Z., Yue, T., Chen, M.-M., Xue, Y., Hu, H., & Guo, A.-Y. (2023). AnimalTFDB 4.0: a comprehensive animal transcription factor database updated with variation and expression annotations. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D39-D45. <https://doi.org/10/10.1093/nar/gkac907>

Sherman, B., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M., Lane, H., Imamichi, T., & DAVID, W. C. (2022). A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)., 2022, 50, pp. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D638-d646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

Thompson, M. G., Muñoz-Moreno, R., Bhat, P., Roytenberg, R., Lindberg, J., Gazzara, M. R., Mallory, M. J., Zhang, K., García-Sastre, A., Fontoura, B. M. A., & Lynch, K. W. (2018). Co-regulatory activity of hnRNP K and NS1-BP in influenza and human mRNA splicing. *Nature Communications*, 9(1), 2407. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04779-4>

Tran, H., Banskota, N., Gorospe, M., & De, S. (2025). Comprehensive Overview of Computational Tools for Alternative Splicing Analysis. *WIREs RNA*, 16(6), e70030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wrna.70030>

Truong, A. D., Tran, H. T. T., Phan, L., Phan, T. H., Chu, N. T., Vu, T. H., Nguyen, H. M., Nguyen, L. P., Kim, C., & Dang, H. V. (2025a). Differentially expressed miRNA profiles in serum-derived Exosomes from cattle infected with lumpy skin disease virus .*Pathogens*, 14(2), 176. <https://doi.org/10.3390/pathogens14020176>

Truong, A. D., Tran, H. T. T., Phan, T. H., Vu, T. H., Chu, N. T., Nguyen, H. M., Nguyen, L. P., Phan, L., Kim, C., & Dang, H. V. (2025b). Exosomal small non-coding RNA profiling and the role of PIWI-interacting RNA pathway genes in Lumpy skin disease virus-infected bovines. *Animal Bioscience*, 38(11), 2364. <https://doi.org/10.5713/ab.25.0217>

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*, 108(10), 11606-11623. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2025-265>•^

Wang, L., Zheng, G., Yuan, Y., Wang, Z., Liu, C., Zhang, H., & Lian, L. (2021). Exploration of Alternative Splicing (AS) Events in MDV-Infected Chicken Spleens. *Genes*, 12(12), 1857. <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/12/1857>

Wang, X. G., Ju, Z. H., Hou, M. H., Jiang, Q., Yang, C. H., Zhang, Y., Sun, Y., Li, R. L., Wang, C. F., Zhong, J. F., & Huang, J. M. (2016). Deciphering Transcriptome and Complex Alternative Splicing Transcripts in Mammary Gland Tissues from Cows Naturally Infected with *Staphylococcus aureus* Mastitis. *PloS one*, 11(7), e0159719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159719>

Wang, Y., Xie, Z., Kutschera, E., Adams, J. I., Kadash-Edmondson, K. E., & Xing, Y. (2024). rMATS-turbo: an efficient and flexible computational tool for alternative splicing analysis of large-scale RNA-seq data. *Nature Protocols*, 19(4), 1083-1104. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00944-2>

Wherry, T. L. T., Heggen, M., Shircliff, A. L., Mooyottu, S., & Stabel, J. R. (2023). Stage of infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis impacts expression of Rab5, Rab7, and CYP27B1 in macrophages within the ileum of naturally infected cows [Original Research]. *Frontiers in Veterinary Science*, Volume 10 - 2023. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1117591>

Xiang, R., Fang, L., Liu, S., Macleod, I. M., Liu, Z., Breen, E. J., Gao, Y., Liu, G. E., Tenesa, A., Mason, B. A., Chamberlain, A. J., Wray, N. R., & Goddard, M. E. (2023). Gene expression and RNA splicing explain large proportions of the heritability for complex traits in cattle. *Cell Genomics*, 3(10). <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100385>

Xu, X., Chai, K., Chen, Y., Lin, Y., Zhang, S., Li, X., Qiao, W., & Tan, J. (2018). Interferon activates promoter of Nmi gene via interferon regulator factor-1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441(1), 165-171. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3182-y>

Yang, J., Tang, Y., Liu, X., Zhang, J., Zahoor Khan, M., Mi, S., Wang, C., & Yu, Y. (2022). Characterization of peripheral white blood cells transcriptome to unravel the regulatory signatures of bovine subclinical mastitis resistance. *Front Genet*, 13, 949850. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.949850>

Zhao, Z., Ruan, S., Li, Y., Qi, T., Qi, Y., Huang, Y., Liu, Z., Ruan, Q., & Ma, Y. (2024). The Influence of Extra-Ribosomal Functions of Eukaryotic Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Biomolecules*, 14(12), 1565. <https://doi.org/10.3390/biom14121565>

نسخه
پیش
انتشار