



استخراج شبکه بین زیست‌نشانگرهای ترانسکریپتومی ورم پستان گاو شیری ناشی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از ژنوم انسان

مصطفی قادری زفره‌ای^{۱*}، فریبا ارجمند^۲، فرهاد صمدیان^۳، مهرداد معمار^۳

۱- استادیار زیست سامانه‌های محاسباتی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۳- استادیار فیزیولوژی دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۱۵)

چکیده

ورم پستان یکی از بیماری‌های عفونی غدد پستانی در گاوهای شیری است که در چند دهه اخیر، به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که منجر به ضرر اقتصادی در صنعت گاو شیری می‌شود، مورد توجه زیادی قرار گرفته است. وراثت‌پذیری ورم پستان پایین است و لذا مدیریت اصلاح نژادی آن کار سختی به شمار می‌رود. با توجه به اهمیت بیماری ورم پستان در مدیریت واحدهای پرورش گاو شیری و ساز و کار مولکولی پیچیده درگیر در این بیماری، استخراج شبکه بین زیست‌نشانگرهای ترانسکریپتومی ورم پستان با استفاده از داده‌های امیکس موجود در گونه‌هایی مثل انسان، که حاشیه‌نویسی ژنومی قابل اعتمادی دارند، معقول به نظر می‌رسد. در این پژوهش با استفاده از برازش یک مدل خطی مشابه روی هر ژن یک آزمایش ریزآرایه DNA انجام شده ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بر پستان گاو شیری، فهرستی از ژن‌های متفاوت بیان شده یا زیست‌نشانگرهای ترانسکریپتومی گاوی به‌دست آمدند. نتایج نشان داد ژن‌های رمز کننده سایتوکین‌ها و کایموکین‌های CXCL5، CXCL2، CXCL3، CXCL8 و SAA3 در اثر ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، بیان متفاوتی داشتند. در این پژوهش با نداشت مجموعه ژن‌های متفاوت بیان شده روی ژنوم انسان، ژن‌های ارتولوگ انسان و گاو به‌دست آمدند. شبکه زیست‌نشانگری به‌دست آمده از ژن‌های ارتولوگ انسان نشان داد که نشانگر APP (Amyloid beta precursor protein) بیش‌ترین درجه ارتباط را با سایر نشانگرهای ترانسکریپتومی دارد. به نظر می‌رسد از نتایج این پژوهش بتوان در برنامه‌های اصلاح نژادی و تهیه دارو برای درمان ورم پستان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: حاشیه‌نویسی ژنومی، ریزآرایه DNA، زیست‌نشانگر، سایتوکین‌ها

مقدمه

را فراهم می‌کند. تشریح پایه ژنتیکی بر اساس بیان ژن، نه تنها امکان برآورد دقیق‌تری از اثرات ژنومی را فراهم ساخته است، بلکه توانسته است بین انواع DNA و مجموعه پیچیده فنوتیپ‌های موجود زنده، ارتباط مولکولی قابل اعتمادی را در اختیار قرار دهد. بنابراین تشریح پایه ژنتیکی بر اساس بیان ژن هنگامی می‌تواند بسیار مفید و ارزنده باشد که سنجش بیان ژن، در بافت‌ها و یاخته‌هایی صورت گرفته باشد که با فنوتیپ مورد پژوهش ارتباط زیستی داشته باشند (Dermitzakis, 2008). از آنجایی که شمار زیست‌نشانگرهای استخراج شده از داده‌های زیست‌آرایه DNA زیاد است، استخراج شبکه تنظیمی بین این زیست‌نشانگرها منطقی به نظر می‌رسد. شبکه زیست‌تنظیمی ژنی از راه ایجاد ارتباط زیستی بین ژن‌ها، تصویر دقیق‌تری از تعاملات زیستی را فراهم می‌کند.

به تازگی رشد چشمگیری در پژوهش‌هایی وجود داشته است که سعی بر استخراج شبکه‌های ژنی یا تلفیق داده‌های زیستی در حیوانات اهلی داشته‌اند (Wilkinson *et al.*, 2012; García-Gómez *et al.*, 2011; Fortes *et al.*, 2012; Bakhtiarizadeh *et al.*, 2014; Cánovas *et al.*, 2014; Ramayo-Caldas *et al.*, 2014; Strunz, 2014). با استفاده از شبکه ژنی و تلفیق آن با داده‌های زیستی دیگر و یا ژنوم گونه‌های دیگر، تشخیص و مدیریت هر چه سریع‌تر بیماری ورم پستان در گاو شیری و ایجاد پاسخ‌های درمانی مناسب برای آن هموارتر می‌شود. بنابراین با توجه به اهمیت بیماری ورم پستان در مدیریت واحدهای پرورش گاو شیری و ساز و کار مولکولی مرتبط با این بیماری، هدف اصلی از این پژوهش استخراج شبکه بین زیست‌نشانگرهای ترانسکریپتومی ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از یافته‌های پروژه ژنوم انسان بود.

مواد و روش‌ها

مکان و استخراج داده‌های ریزآرایه DNA به طور کلی داده‌های حاصل از آزمایش ریزآرایه DNA، بعد از عبور از صافی استاندارد MIAME (Minimum information about a microarray experiment) در پایگاه‌های گوناگونی از جمله پایگاه CIBEX (Center for Information Biology Gene Expression Database) در

واکنش آماسی غدد پستان در پاسخ به بیماری‌زها را ورم پستان می‌گویند. باکتری‌های اصلی ایجاد کننده ورم پستان به دو دسته واگیردار و غیرواگیردار تقسیم می‌شوند. از باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان واگیردار می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (*Streptococcus agalactiae*)، *کورینه‌باکتریوم بویس* (*Corynebacterium bovis*) و *مایکوپلازما بویس* (*Mycoplasma bovis*) اشاره کرد. *استافیلوکوکوس اورئوس* شایع‌ترین و از نظر اقتصادی مهم‌ترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های درون‌پستانی (۳۰ تا ۴۰ درصد از موارد) است (Radostis *et al.*, 2007). وراثت‌پذیری ورم پستان بالینی ناشی از میکروب‌های گوناگون، ۰/۰۳ تا ۰/۴۲ گزارش شده است (Nash *et al.*, 2000). همچنین گزارش شده که تقریباً در تمام کروموزم‌های گاو شیری، QTL‌های (جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی) مرتبط با ورم پستان وجود دارند (Rupp and Boichard, 2003). با وجود این، مدیریت به‌نژادی این صفت از نظر ژنتیکی دشوار است. امروزه زیست‌سامانه‌های محاسباتی امکان تلفیق سطوح مختلف داده‌های امیکس را فراهم کرده است. زیست‌سامانه‌های محاسباتی، به پژوهش درون اجزایی در ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس و بیوانفورماتیک می‌پردازد (Van Ommen and Stierum, 2002) که با درک نتایج خروجی، دینامیک تعاملات مولکولی بین زیست‌ملکول‌ها، شبکه‌های ژنی، یاخته‌ها، بافت‌ها و سطوح سازواره‌ای را آشکار می‌کند. متخصصین زیست‌سامانه‌های محاسباتی بجای تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های منفرد، همچون پاسخ به یک بیماری خاص، بر اجزا و تعاملات بین ملکول‌های زیستی به عنوان بخشی از یک سامانه تمرکز دارند. یکی از زیرمجموعه‌های داده‌های امیکس، داده‌های ترانسکریپتومی یا داده‌های بیان ژن است. فن‌آوری بسیار قدرتمند ریزآرایه DNA، امکان بررسی برهم‌کنش بین هزاران ژن برای مقایسه کاهش، افزایش و یا عدم تغییر بیان ژن‌ها را فراهم نموده است. به عبارتی دیگر، فن‌آوری ریزآرایه DNA امکان بررسی چگونگی تأثیر هر ژن بر ژن‌های دیگر و چگونگی بیان ژن در یاخته‌های سالم و بیمار و یا تیمارهای مختلف

جواب اغلب پرسش‌های مربوط به تفاوت بیان ژنی را فراهم می‌کنند. به طور کلی روش‌های دیگری نیز وجود دارند، اما روش متکی به مدل‌های خطی معمول‌تر است. در عمل در زمان استخراج ژن‌های با بیان متفاوت یا زیست‌نشانگر ترانسکریپتومی، یک مدل برای یک ژن نوشته می‌شود که به آن «مدل ژن» نیز گفته می‌شود (Smyth, 2004) و این مدل برای همه ژن‌ها تکرار می‌شود. لذا برای هر ژن، مدل $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$ به کار رفت که $\hat{\alpha}_i = \bar{Y}_i - \bar{Y}$ اثر ثابت تیمار i ام فرض شد که در آن: $\bar{Y}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}$ میانگین i امین تیمار، $\bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}$ میانگین کل بیان ژن و $n = n_1 + n_2 + \dots + n_k$ بود. همچنین فرض شد $\sum \alpha_i = 0$ باشد، بنابراین میانگین و واریانس بیان ژن به ترتیب به صورت $E\{Y_{ij}\} = \mu + \alpha_i$ و $\sigma_{Y_{ij}}^2 = \sigma^2$ در نظر گرفته شد و فرض شد که Y_{ij} دارای $N(\mu + \alpha_i, \sigma^2)$ باشد. تحت فرض صفر، در نظر گرفته شد که بیان ژن مورد نظر در گروه تیمار و شاهد متفاوت نیست، یعنی: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ و تحت فرض مقابل، در نظر گرفته شد که میانگین بیان ژن حداقل در یکی از تیمارها با هم متفاوت است، یعنی: $H_1: \mu_1 \neq \mu_2 = \dots = \mu_k$. معیار رتبه‌بندی یا استخراج ژن‌های متفاوت بیان شده در این پژوهش «آماره t تصحیح شده» در نظر گرفته شد. همچنین برای کنترل «نرخ خطا در سطح خانواده» از روش تصحیح Hochberg استفاده شد، چرا که در کل اگر فرض کنیم که تعداد k تیمار داشته باشیم آن‌گاه نیاز است که به تعداد $\frac{k(k-1)}{2}$ برای تمام ژن‌های روی آرایه DNA، مقایسه چندگانه انجام داد. در این صورت مقایسه‌ها مستقل نبوده و خطای نوع اول افزایش می‌یابد. بنابراین این تصحیح انجام شد تا سطح خطای آزمایش در همان ۰/۰۵ باقی بماند. اجرای مدل و کلیه محاسبات در بسته آماری Limma (Smyth, 2004) متکی به R انجام شد.

استخراج شبکه ترانسکریپتومی بین نشانگرها: برای استخراج شبکه ترانسکریپتومی بین نشانگرها از نرم‌افزار تحت وب <http://www.esyn.org> استفاده شد. برای این کار ژن‌های ارتولوگ انسانی از BioGRID (<https://thebiogrid.org>) استخراج و سعی شد هم تعامل ژنتیکی و هم تعامل فیزیکی بین زیست‌نشانگرها محاسبه شود.

ژاپن، GEO (Gene Expression Omnibus) در مرکز اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) و Express Array در موسسه بیوانفورماتیک اروپا ذخیره می‌شوند. در این پژوهش، آزمایش‌های ریزآرایه DNA مرتبط با بیماری ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس/اورئوس، در پایگاه‌های یاد شده جستجو شد. مشخص شد که شمار اندکی از این آزمایش‌ها تا زمان انجام این پژوهش (که شامل کنترل و بیماری بودند)، به پلات‌فرم Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>) مربوط می‌شد. پس از بررسی ساختار آزمایش‌های موجود از نظر طرح مورد استفاده، تعداد تکرار آرایه‌ها و غیره، داده‌های آزمایش با شماره دسترسی GSE24560 به صورت پیکربندی CEL پیاده‌سازی و ذخیره شدند.

پیش‌پردازش داده‌های ریزآرایه DNA: به طور کلی پیش‌پردازش داده‌های ریزآرایه شامل سه مرحله نرمال‌سازی، تصحیح پس‌زمینه و خلاصه‌سازی است (Rainer et al., 2006) که در این پژوهش، همه این مراحل با استفاده از بسته affyPLM در محیط R انجام شد. برای نرمال‌سازی از روش Quantile، برای تصحیح پس‌زمینه، روش IdealMM و برای خلاصه‌سازی از روش Tukeybiweight استفاده شد. از آنجایی که کنترل کیفیت داده‌ها یک گام اساسی در آزمایش‌های متکی بر ریزآرایه DNA است، در این پژوهش از نرم‌افزار ArrayQualityMetrics برای کنترل کیفیت داده‌ها استفاده شد. کنترل کیفیت داده‌ها برای شناسایی نمونه‌های پرت انجام می‌شود که مشخص می‌کند چه داده‌هایی نیاز به حذف یا تکرار دارند. در مرحله بعد، برای کنکاش نتایج از نگاره حرارتی (Heatmap) و M-A استفاده شد. با بررسی این نگاره‌ها نمونه‌هایی که کیفیت نامطلوب داشتند، از مراحل بعدی تجزیه و تحلیل حذف شدند. در مرحله آخر برای نگاشت هر کاوش‌گر موجود بر تراشه ریزآرایه DNA به ژن‌های مربوطه، از فایل‌های حاشیه‌نویسی (Annotation) ژنوم گاو (یعنی فایل‌های org.Bt.org و bovine.db) استفاده شد.

مدل خطی و رتبه‌بندی ژن‌ها یا استخراج زیست‌نشانگرها: معمولاً در آزمایش‌های ریزآرایه DNA، وقتی ماتریس بیان ژن به دست آمد، می‌توان به پرسش‌های زیستی مختلفی جواب داد. «مدل‌های خطی» امکان رسیدن به

نتایج و بحث

پیش پردازش داده: در آزمایش پیاده‌سازی شده با شماره دسترسی GSE24560، در کل ۸۸ آرایه و ۲۴۱۲۸ کاوشگر وجود داشت که شمار ۶۴۷۸ عدد از آن‌ها، کاوشگرهای کنترل بودند. با نگاهت تعداد کاوشگر باقی‌مانده (۱۷۵۶۰) روی حاشیه‌نویسی ژن‌ها، ۱۱۸۵۲ ژن بدست آمد. شکل ۱ نگاره حرارتی آزمایش GSE24560 را نشان می‌دهد. در نگاره حرارتی کیفیت نمونه‌ها بر اساس فاصله‌ای که هر نمونه با نمونه‌های دیگر ایجاد می‌کند بررسی می‌شود و در نتیجه نمونه‌های با کیفیت بد، که باعث ایجاد بیشترین فاصله بین نمونه‌ها می‌شوند، شناسایی می‌شوند. نگاره حرارتی، فاصله بین نمونه‌ها را بر اساس شدت رنگ مشخص می‌کند.

خط‌کش کنار نگاره بر اساس غلظت رنگ، میزان پراکندگی نمونه‌ها را مشخص می‌کند، که رنگ زرد نشان‌دهنده بیشترین پراکندگی یا فاصله یک نمونه با دیگر نمونه‌ها است و رنگ آبی نشان‌دهنده کمترین فاصله است. همان طور که در شکل ۱ مشخص است، نمونه‌های ۴، ۶، ۱۲، ۱۷ و ۲۳ دارای کیفیت خوبی نبودند و از مراحل بعدی آزمایش حذف شدند. این نمونه‌ها با علامت ستاره‌دار کنار هر آرایه مشخص شده‌اند. روش نگاره M-A نیز نتایج مشابهی را حاصل کرد. در نتیجه شمار آرایه‌ها از ۸۸ به ۸۳ کاهش یافت و این تعداد برای تحلیل بکار رفت.

ژن‌های متفاوت بیان شده یا استخراج زیست‌نشانه‌گر ترانسکریپتومی: برای بدست آوردن فهرست ژن‌های متفاوت بیان شده یا زیست‌نشانه‌های ترانسکریپتومی، از ماتریس بیان ژنی با ابعاد ۱۱۸۵۲ در ۸۳ استفاده شد. در سطح آستانه P value تصحیح شده ۰/۰۵ یا همان q Value، ۱۵۰ ژن رفتار تغییر بیان را نشان دادند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تعداد نسبتاً بالایی از ژن‌ها در بروز ورم پستان در گاو شیری درگیر هستند که می‌توانند به عنوان زیست‌نشانه‌های ترانسکریپتومی آماسی و پاسخ ایمنی محافظت برای بیماری ورم پستان در گاو شیری در نظر گرفته شوند. جدول ۱ فهرست این زیست‌نشانه‌های ترانسکریپتومی بدست آمده را نشان می‌دهد. بیشتر این ژن‌ها در پاسخ‌های آماسی دخالت دارند. آماس، یک پاسخ ایمنی محافظت‌کننده در برابر

محرک‌های داخلی یا خارجی مانند بیمارگرها، آسیب سلولی یا درد است. یاخته‌های ایمنی موجود در رگ‌های خونی و میانجی‌گرهای مولکولی در آماس دخیل هستند که به عنوان ساز و کارهای ایمنی ذاتی عمل می‌کنند و در برابر هر نوع عامل بیماری‌زا به صورت غیر اختصاصی عمل می‌کند. هدف از ایجاد آماس، کاهش خطر جراحی سلولی با حذف عامل اولیه، پاک کردن یاخته و بافت آسیب دیده از عامل مخرب و همچنین تعمیر سریع بافت است (Abbas and Lichman, 2010). در ایجاد پاسخ آماسی ژن‌های زیادی به خصوص ژن‌های رمزکننده سایتوکین‌ها درگیر هستند که بیشترین نقش را در ایجاد پاسخ آماس بر عهده دارند. در پژوهش کنونی ژن‌های رمزکننده و کموکین‌ها و سایتوکین‌های CXCL5، CCL2، CXCL3، CXCL2 و CXCL8 در دو گروه کنترل و ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، تفاوت بیان نشان دادند که این نتایج همسو با نتایج دیگر پژوهش‌گران بود (Juliane et al., 2011). ژن CXCL5 پروتئین 5 Chemokine (C-X-C motif) ligand را رمز می‌کند. پپتید فعال‌کننده نوتروفیل‌ها از منشأ سلول‌های اپیتلیال است و کموکینی بیان شده از ژن CCL2 است که در تنظیم جابجایی و مهاجرت لوکوسیت‌ها نقش دارد (Zlatnik and Yoshie, 2000). این کموکین در فرآیندهای سلولی مانند پاسخ ایمنی ذاتی، پاسخ ایمنی همورال عمومی، تقسیم سلولی و پاسخ التهابی نقش دارد. این کموکین پس از تحریک به وسیله سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1 و TNF- α در سلول‌های اپیتلیال بیان شده و موجب تجمع نوتروفیل‌های پلی‌مورفونوکلوثر (PMN) می‌شود (Walz et al., 1991). کموکین CXCL2 به وسیله‌ی مونوسایت‌ها و ماکروفاژها ترشح می‌شود و کیموتاکتیکی برای لکوسایت‌های چند هسته‌ای و سلول‌های بنیادی خون‌ساز است (Pelus and Fukuda, 2015). در واقع CXCL2 در هنگام بروز ورم پستان نقش ترمیمی نیز ایفا می‌کند و با فراخوانی سلول‌های بنیادی خون‌ساز به بازسازی بافت پستان می‌پردازد. همچنین مشخص شده است که CXCL2 در طول ورم پستان از طریق دخالت در چسبندگی گرانولوسایت‌ها و دی‌پدزیس در ایمنی پستان نقش ایفا می‌کند (Chen et al., 2015). بیان CXCL2 در طی بیماری ورم پستان، سبب نقص در چسبندگی گرانولوسایت‌ها می‌شود و بدین ترتیب مانع از چسبیدن

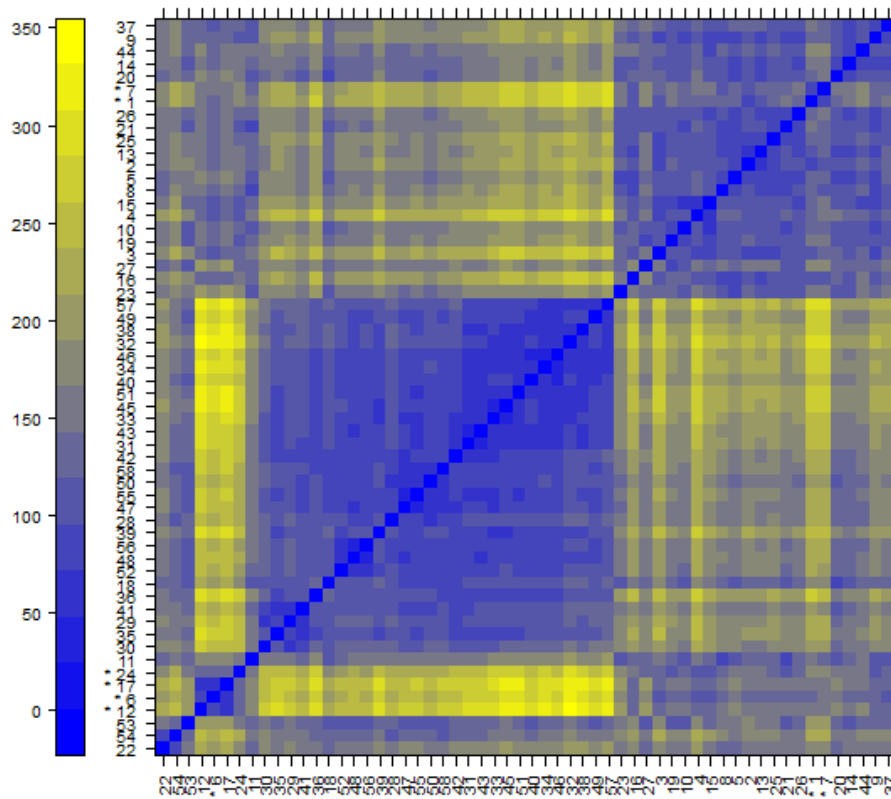


Fig. 1. Two way clustering (heatmap) of GSE24560. Arrays indicated with star sign were low quality arrays and ignored for downstream computations

شکل ۱- خوشه‌بندی دو طرفه (نقشه حرارتی) آزمایش GSE24560. آرایه‌هایی که با علامت ستاره مشخص شده‌اند نشان

دهنده آرایه‌هایی با کیفیت پایین بودند و برای محاسبات بعدی حذف شدند

جدول ۱- فهرست ژن‌های متفاوت بیان شده (زیست نشانگرها) در سطح آستانه $q\text{Value}=0.05$

Table 1. List of differentially expressed genes (Biomarkers) in threshold level $q\text{Value} = 0.05$

JADE1	CARM1	TEAD1	UNC93B1	MARK1	ANKRD42
EXOC8	TRIM8	KMT2C	UBE2F	FER	YWHAE
APP	CXCL2	CKAP4	UQCRH	SAA3	FBXO18
MARCKS	RBFOX2	DHCR7	TRAF3IP2	MAP1LC3B	RPS19BP1
KCTD11	COX7B	SAMM50	PNPO	ETHE1	SLC2A6
DCUN1D1	CLPP	SSU72	POMGNT2	PABPN1	CDC34
ATG16L1	PEBP1	UBE4A	RBM42	OGFR	MSANTD2
GAPVD	CD81	SLC25A29	IL1B	GLCE	POLR2J
TFAP2A	GNAI2	ALCAM	NNAT	PRPF8	CORO1A
PRICKLE3	MAP3K3	TES	ZMYND8	FAM133B	CCDC124
TTC19	ACOT13	MBNL2	GMIP	PTP4A1	VPRBP
KCTD6	CD164	RBMS1	TMEM8A	YWHAB	PHF20
EZR	CYB561	DET	SZRD1	CCDC93	DNMT3B
RELA	SUSD6	BAZ2A	FLYWCH1	WDTC1	CCDC112
DIP2B	USP37	C2ORFF52	JUNB1	VCL	RABL3
GPX1	USF1	MFSD5	C8H9ORF89	PDD8	TMEM5
GDI1	LAMTOR4	RPL34	SACM1L	ZNF774	HMBOX1
DENND6A	ID3	NR1H2	SLX4IP	MAPKAPK5	HMOX2
REXO4	BAG4	PDGFB	SLC25A16	SEPT9	Ccl2
CNDP	EIF2B5	KRT8	CDK12	LAPTM4A	TTF1
NDUFA1	SCYL1	FAM43A	ZCCHC3	Cxcl3	ATP1A1
CEBPD	MAN2C1	CXCL5	ZC3H12A	R3HDM2	API5
NOL9	ZNF21	GLI3	AHNAK	NDFIP1	UGT8
CXCL8	TGIF1	NDUFAF7	RPS27L	ALDH6A1	GPATCH1
CSNK1D	CX3CL1				

که به چسبندگی بیشتر نوتروفیل‌ها به سلول‌های اندوتلیال کمک می‌کند (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992) و در نهایت باعث فعال شدن NADPH اکسیداز شده و این آنزیم نیز به نوبه خود، سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در محل عفونت شده که برای مبارزه با بیمارگرهای خارجی بکار می‌رود.

در این پژوهش مشخص شد که ژن SAA3 بیشترین درجه تفاوت بیان را نشان داد که با یافته‌های پژوهشگران دیگر هماهنگ است (Weber *et al.*, 2006). این پژوهش‌گران بیان کردند ژن SAA3 در بیماری ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس آرتوس*، در سلول‌های اپیتلیال پستانی بیان بالایی دارد. ژن SAA3، پروتئین Serom amyloid A3 را رمز می‌کند که عضوی از خانواده آپولیوپروتئین است که با HDL در پلازما ارتباط دارد. ژن‌های SAA در هنگام التهاب شدید ترشح می‌شوند و وظایفی متعددی دارند از جمله انتقال دادن چربی‌ها به جگر برای ترشح آن‌ها به درون صفرا، فراخوانی سلول‌های ایمنی به محل التهاب و القای آنزیم‌هایی که باعث از بین رفتن ماتریکس خارج سلولی می‌شوند. انواع مختلفی از پروتئین‌های SAA وجود دارد که شامل: SAA1 و SAA2 که در جگر بیان و تولید می‌شوند و SAA3 که در بافت‌های دورتر از جگر بیان می‌شوند. این پروتئین باعث می‌شود در بدن قبل از پاسخ ایمنی به‌خصوص، ساز و کار اولیه دفاع در برابر عفونت، التهاب و آسیب ایجاد شود. این پروتئین در سلول‌های اپیتلیال پستانی در طول دوره شیردهی و تحریک یا عفونت باکتری تولید می‌شود. گزارش شده است که غلظت این پروتئین در شیر پستان‌های آلوده در گاوهای دارای ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس آرتوس*، بیشتر از گاوهای سالم است (Gronlund *et al.*, 2005). همچنین ژن IL1 β (Interleukin 1 beta) یکی دیگر از ژن‌های درگیر در بیماری ورم پستان است که در پژوهش حاضر تفاوت بیان نشان داد. محصول این ژن در انواع فعالیت‌های سلولی، از جمله تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز نقش دارد. اینترلوکین-1 بتا یک سایتوکین مهم در ایجاد التهاب و سامانه ایمنی است که نقش کلیدی در شروع، کنترل و تداوم پاسخ التهابی دارد (Xu *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). این اینترلوکین در آزمایشگاه قابلیت تولید دارد و

گرانولوسایت‌ها به سلول‌های اندوتلیال و در نتیجه دیپدسیز می‌شود، ولی در طی درمان ورم پستان، این ژن فروتنظیم (Down regulated) می‌شود (Sipka *et al.*, 2015). فروتنظیمی معنی‌داری در بیان ژن CXCL2 در غده‌های پستانی درمان شده با ترکیب سفاپرین و پردنیزولون مشاهده شده است (Jaeger *et al.*, 2015) که با نتایج پژوهش حاضر هماهنگ است. اینترلوکین 8 (IL-8) یا CXCL8 یک کموکین وابسته به ایمنی است که در پاسخ به عوامل تنش‌زای مختلف مانند عوامل باکتریایی و سایتوکین‌های پیش‌التهابی آزاد می‌شود (Bautista and Spitzer, 1992). رادیکال‌های آزاد یک عامل فعال‌کننده برای IL-8 هستند. رادیکال‌های آزاد به عنوان میانجی یا محصول تولیدی در طی عملکردهای سلولی مانند فرآیند فاگوسیتوز اولیه باکتری‌ها به وسیله گلبول‌های سفید تولید می‌شوند (Bautista and Spitzer, 1992). اینون‌های سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل، هر کدام می‌توانند به بافت پوششی گویچه‌های پستانی صدمه زیادی وارد کنند. غلظت رادیکال‌های آزاد می‌تواند به طور مستقیم با کنترل بیان ژن، تولید و آزادسازی IL-8 را تحت تاثیر قرار دهد (Deforge *et al.*, 1992). وقتی که بیمارگر وارد بدن می‌شود، در پی آن گلبول‌های سفید به محل ورود بیمارگر حرکت می‌کنند و شروع به فاگوسیتوز کردن بیمارگر می‌کنند و در نتیجه میزان رادیکال‌های آزاد در سلول افزایش می‌یابد و این می‌تواند عاملی برای افزایش بیان ژن IL-8 باشد. عوامل باکتریایی با اتصال به TLR4 و همچنین سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1 و TNF- α باعث فعال‌سازی و آزاد شدن IL-8 می‌شوند (Grob *et al.*, 1990; Seitz *et al.*, 1991). تمام این عوامل تنش‌زا (اکسیژن واکنش‌پذیر، عوامل باکتریایی و سایتوکین‌های پیش‌التهابی) که مشخص‌کننده مرحله التهاب هستند، بین مرحله التهاب و IL-8 ارتباط برقرار می‌کنند. بعد از آزادسازی، IL-8 مسئول کلیدی پاسخ ایمنی است. IL-8 باعث ایجاد سه تغییر بزرگ در نوتروفیل‌ها می‌شود؛ ابتدا باعث ایجاد تغییر ترکیبی می‌شود که این تغییر موجب چسبیدن نوتروفیل‌ها به سلول‌های اندوتلیال شده که این اتصال برای مهاجرت و خروج نوتروفیل‌ها از رگ‌های خونی و ورود به محل عفونت ضروری است. در مرحله دوم، اینترلوکین-8 به اگزوسیتوز پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در وزیکول‌های نگهدارنده و گرانول‌های سلولی می‌انجامد

۱۸ مولفه پیوسته و قطر سه بود. علت این امر ممکن است کمتر بودن تعداد ژن هومولوگ انسانی استخراج شده باشد. همچنین اسم ژن‌ها مختلف است که احتمالاً به دلیل استفاده از اسم‌های مختلف ژن باشد که در پایگاه یاد شده وجود دارد. در پیوند با ژن‌های متفاوت بیان شده توصیف شده در بخش قبل، فقط ژن‌های CXCL8، IL1B و ZC3H12A در شبکه ژنی استخراج شده نمایان شدند. با توجه به این که معیارهای شبکه‌ای این ژن‌ها کم بود، در ارتباط با اهمیت ژن‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که نتایج حاصل از شبکه ژنی چیزی متفاوت از نتایج مدل خطی را نشان داده است. بنابراین ژنی که تفاوت بیان زیادی را نشان می‌دهد همان ژنی نمی‌تواند باشد که در شبکه ژنی مهم‌تر است. تعامل فیزیکی و ژنتیکی بین زیست‌نشانگرها (ژن‌ها) با یکدیگر متفاوت است و پدیده ماژول یا گروه‌بندی شدن ژن‌ها در دسته‌های مختلف مشاهده می‌شود. وجود ساختار ماژول حکایت از وجود ژن‌های هاب در بین مجموعه ژن‌هاست. شکل ۲ شبکه غیرتنظیمی ژنی استخراج شده را نشان می‌دهد. آن چه که مسلم است، در این رویه استخراج ارتباط بین ژن‌ها، از اطلاعات پسین زیستی برای ارجحیت بخشیدن به ژن‌ها از نظر نوع عملکرد (تنظیم‌کننده بودن و یا تنظیم‌شونده شدن) استفاده نشده است، اما شکل ۱ نشان می‌دهد که ژن APP ارتباط زیادی با ژن‌های دیگر دارد. بنابراین در مجموعه ژن‌های متفاوت بیان شده، این ژن از اهمیت خاصی برخوردار است و باید کنکاش بیشتری روی آن صورت گیرد. نگاهی به کارت ژن (<http://www.genecards.org>)، نشان می‌دهد که این ژن یک پیش‌پروتئین بتا آمیلوئید است. درجه ژن APP از بالاترین مقدار در شبکه برخوردار است (جدول ۲) و بنابراین می‌تواند در بررسی ترانسکریپتومی ورم پستان، به عنوان یک ژن مهم در نظر گرفته شود. با در دست داشتن شبکه بین ژن‌ها، آماره‌های شبکه نیز استخراج شدند که در جدول ۲ ارائه شده است (به خاطر محدودیت فضا، فقط نتایج تعداد اندکی از ژن‌ها نشان داده شده است). در جدول ۲ هر یک از فراسنجه‌های داده شده معنایی خاصی دارند، مثلاً «مرکزیت ژن» معیاری است که موقعیت ژن را در شبکه تعیین می‌کند. موقعیت یک ژن در شبکه می‌تواند به وسیله مرکزیت آن تعیین شود. کنکاش هر یک از این فراسنجه‌ها پژوهش دیگری را طلب می‌کند.

از آن به عنوان تعدیل‌کننده پاسخ زیست‌شناختی برای تقویت سامانه ایمنی استفاده می‌شود. ژن دیگری که تفاوت بیان معنی‌داری نشان داد ژن ZC3H12A بود. نام دیگر این ژن، MCP-1 است. بیان این ژن در ماکروفاژها در پاسخ به TLR و IL-1 بالا می‌رود و این ژن از راه ساز و کارهای مختلف، بازخورد منفی بر پاسخ التهابی دارد (Matsushita *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2008). پروتئین MCP-1 پایداری mRNA را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با توجه به این نقش، اثر منفی بر التهاب دارد. عوامل کنترل‌کننده بعد از رونویسی ژن‌ها به عنوان مهم برای کنترل التهاب شناخته شده‌اند که پروتئین MCP-1 نیز شامل آن‌ها است (Anderson, 2012). گزارش شده است که این پروتئین می‌تواند به کنترل mRNAها بعد از رونویسی بپردازد (Zhou *et al.*, 2006). بین عوامل کنترل‌کننده پس از رونویسی، کنترل mRNA از راه ناحیه 3'UTR (3'Untranslated region) بسیار شناخته شده است. miRNAها نقش مهمی در بیماری‌زایی برخی از عوامل التهاب‌زا دارند. در همکاری miRNAها، پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA نیز نقش مهمی در کنترل شبکه‌های بیان ژنی پس از رونویسی ایفا می‌کنند. TTP (Tristetraproline) یکی از مولکول‌های شناخته شده است که عناصر غنی از AU در 3'UTR را شناسایی کرده و از این راه چندین مولکول مانند سایتوکین‌ها و سیکلوآکسیژنازها را شناسایی می‌کند (Sanduja *et al.*, 2012; Carballo *et al.*, 1998). کاهش TTP باعث ناپایداری التهابی و سبب ایجاد بیماری التهابی می‌شود.

شبکه ژنی بین زیست‌نشانگرهای ترانسکریپتومی: برای پیدا کردن شبکه بین زیست‌نشانگرهای ترانسکریپتومی برآورد شده در این پژوهش، رویه غیرمستقیمی در پیش گرفته شد. از آنجایی که تفسیر ژنوم گاو به اندازه ژنوم گونه‌های مدل و حتی ژنوم انسان غنی نیست، از این رو در این پژوهش ابتدا سعی شد که فهرستی از ژن‌های ارتولوگ ژنوم انسان، موجود در پایگاه H.Sapiens BioGRID، که متناظر با مجموعه ژن‌های متفاوت بیان شده در این پژوهش هستند، استخراج شود. تعداد ژن‌های هومولوگ استخراج شده از پایگاه اشاره شده از تعداد ژن‌های متفاوت بیان شده بدست آمده در این پژوهش کمتر بود، به طوری که شبکه استخراج شده دارای ۳۹ ژن، ۴۱ یال،

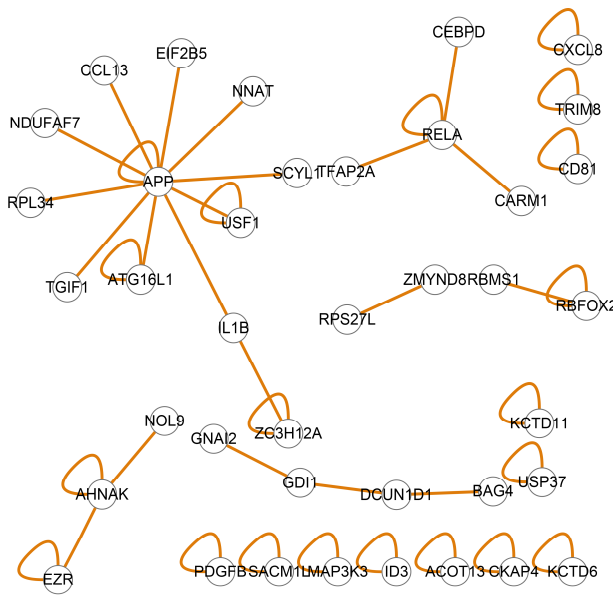


Fig. 2. Predicted network among transcriptomic biomarkers based upon human genome Orthologous genes

شکل ۲- شبکه بین زیست‌نشانه‌های ترانسکریپتومی پیش‌بینی شده بر اساس ژن‌های ارتولوگ در ژنوم انسان

جدول ۲- فهرستی از فراسنجه‌های گراف در شبکه ژنی ترانسکریپتومی استخراج شده

Table 2. List of graph parameters in the excreted transcriptomic gene network

Gene	Betweenness	Degree	Closeness	Eccentricity	Radiality	Stress	Centroid Value	Collective Influence, Radius
EZR	0.0	2.0	1.0	1.0	0.1	0.0	0.0	0.0
AHNAK	0.0	2.0	1.0	1.0	0.1	0.0	0.0	0.0
CARM1	0.1	2.0	0.0	0.1	3.5	0.1	-39.0	2.0
PABPN1	0.0	1.0	0.0	0.1	2.8	0.0	-41.0	0.0
USF1	0.0	2.0	0.0	0.2	4.3	0.0	-41.0	0.0
FER	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
CCL2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
APP	0.3	13.0	0.0	0.2	4.1	0.3	-27.0	95.0
ETHE1	0.3	2.0	0.0	0.2	4.6	0.3	-27.0	10.0
TRIM8	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
MAP3K3	0.0	2.0	0.0	0.1	3.6	0.0	-41.0	0.0
YWHAE	0.2	5.0	0.0	0.2	4.3	0.2	-29.0	76.0
NKX2-1	0.0	1.0	0.0	0.1	3.4	0.0	-41.0	0.0
CD81	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-
MAP1LC3B	0.0	2.0	0.0	0.2	3.9	0.1	-37.0	-

امیکس در کنکاش صفات مهمی همچون بازده غذایی، رشد، افزایش وزن، باروری و مقاومت به بیماری‌ها در گاو، گوسفند و خوک موجود است.

در این راستا، استخراج فاکتورهای رونویسی جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. پژوهشگران با تلفیق داده‌های GWAS و داده‌های بیان ژن روی الگوی

به طور کلی استفاده مستقیم از اطلاعات توالی‌های تنظیمی، مانند حضور یا عدم حضور فاکتورهای رونویسی یا محل‌های اتصال micro-RNA (micro-RNA binding site) می‌تواند استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی را در اصلاح نژاد توجیه کند (Piro and Cunto, 2012). هم اکنون گزارش‌هایی مبتنی بر کاربرد روش‌های بر پایه

HOXA5 و CDC5L به عنوان هاب گزارش شد. پژوهشگران با بررسی شبکه تنظیمی رونویسی برای ژن-هایی با بیان بالا در بافت چربی، تعدادی فاکتور رونویسی جدید (AP-2ALPHA, CKROX, ZF5, ETF, AP-2,) در این بافت گزارش نمودند (Bakhtiarizadeh *et al.*, 2014). همچنین سه فاکتور رونویسی مهم و تنظیمکننده برای بافت چربی بین بافتی در گاوهای گوشتی (PARAGC1A, FOXF3) و (HNF4G) استخراج شده است (Ramayo-Caldas *et al.*, 2014). در پژوهشی دیگر پژوهشگران به منظور بررسی مسیر و شبکه ژنی درگیر در بافت بلوغ در گاوهای گوشتی، از داده‌های ترانسکریپتوم مربوط به پنج بافت مهم هیپوفیز، هیپوتالاموس، تخمدان، دیواره داخلی رحم و رحم استفاده نمودند (Cánovas *et al.*, 2014) و توانستند فاکتورهای رونویسی تنظیمکننده PITX2, FOXA1, DACH2, PROP1 و SIX6 را استخراج کنند. در پژوهشی دیگر پژوهشگران با استفاده از شبکه ژنی توانستند برای بافت چاقی در خوک، سه ژن تنظیمکننده مرتبط با تمایز سلول‌های استئوکلاستی (تحت عناوین MSR1, CCR1 و SI1) را به دست آورند (Kogelman *et al.*, 2014). در پژوهشی دیگر با استفاده از داده‌های بیان ژن و تحلیل مسیر آلفا توکوفرول در سلول‌های گاوی، فاکتورهای رونویسی HNF4a (فاکتور شماره چهار هسته‌ای هیپاتوسیت) c-Myc, SP1 و ESR1 (گیرنده یک استروژن هسته‌ای) به عنوان هاب‌های شبکه تنظیمی رونویسی گزارش شدند (Li *et al.*, 2010). به نظر می‌رسد در آینده استفاده از ژن‌های هاب با نقش تنظیمی، نقش مهمی در اصلاح نژاد ایفا کنند.

نتیجه‌گیری کلی

انتخاب ژنتیکی معمول در اصلاح نژاد دام، بسیاری از جنبه‌های زیستی را در نظر نمی‌گیرد. زیست‌سامانه‌های محاسباتی با دیدی جامع‌نگر و با ترکیب سطوح ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکس، فنومیکس و اینتراکتومیکس، سعی در شناخت هر چه بهتر ساز و کارهای ناپیدای یک سامانه زیستی دارند. در این پژوهش با استفاده از داده‌های ژنوم انسانی، سعی شد ارتباط بین زیست‌نشانه‌های مؤثر در ورم پستان گاو شیری استخراج شود. در شبکه استخراج

تولید رنگیزه در گوسفندان نژاد مرینو توانستند شبکه اپیستاتیک و شبکه تنظیمی را برای این صفت به دست آوردند و در هسته تلاقی این دو شبکه، فاکتور رشد آلفا بشقابی و فعال کننده بشقابی CD9 را نیز شناسایی نمایند (García-Gómez *et al.*, 2011). نکته جالب این بود که تعداد ۱۴ فاکتور رونویسی تشخیص داده شد که هیچ‌کدام از آن‌ها تغییر بیان از خود نشان نداد، ولی روی بیان ۱۰۸ ژن دیگر نقش تنظیمی داشتند. در این میان سه مورد از این فاکتورهای رونویسی در ۲۰ ژن مرتبط با تولید رنگیزه، از بیست جایگاه اتصالی برخوردار بودند. در آزمایشی با تلفیق داده‌های ترانسکریپتومی و داده‌های ژنومی، شبکه ژنی مربوط به بافت هیپوتالاموس برای صفت آبستنی در اولین تلقیح در گاو برانگوس استخراج شد (Fortes *et al.*, 2012). شبکه حاصله دارای ۱۵۵۵ SNP بود که با تلفیق داده‌های بیان ژن از بافت هیپوتالاموس در قبل و بعد از بلوغ، ۹۷۸ ژن با ۲۵۶۰ مسیر زیستی استخراج شد. این پژوهشگران پنج فاکتور رونویسی مهم (ZMAT3, STAT6, RFX4, PLAGL1) را گزارش کردند که تعداد مسیرهایشان از ۲۱ بیشتر بود. همچنین در پژوهشی با استفاده از استخراج شبکه ژنی ترانسکریپتومی، تعدادی ژن کاندیدای مرتبط با سامانه ایمنی کشف شد (Wilkinson *et al.*, 2012). نشان داده شد که ژن سیتوکین IL-15 نقش تنظیمی روی بیان ۱۶ ژن دیگر دارد. تعدادی از این ژن‌ها (IL7R, JUN, IL7R, JUN, TNFRSF90 و ZAP70) در فعال‌سازی سلول‌های T نقش داشتند. در پژوهشی روی ژن‌های کاندیدای درگیر در صفات تولیدمثلی در ژنوم گاوی، «شبکه بیان همزمان ژنی» استخراج شد (Lim *et al.*, 2013). آن‌ها توانستند با استفاده از داده‌های بیان ژنی، سه ماژول بیان همزمان ژن‌ها را برای صفات تولیدمثلی تشخیص دهند و برای هر ماژول یک ژن هاب شناسایی نمایند (ZH4, FHL2) و (EGR4). در این راستا، پژوهشگران دیگر (Strunz, 2014) با استخراج هسته شبکه تنظیمی در سه بافت مختلف (بافت پستان، کبد و آدرنال کورتکس) از گاوهای آمیخته هلشتاین آلمانی و شاروله، به ۶۵ فاکتور رونویسی، ۱۸۶۶ ژن هدف و ۲۵۰۰ مسیر زیستی دست یافتند. در این میان، ۷۰ درصد از فاکتورهای رونویسی، کمتر از ۳۰ ژن هدف را کنترل می‌کردند و ۷ ژن تنظیمکننده SP2, CREBL2, CREBL2 XBP1, THAP11, ATF1

فراسنجه‌ای و چه به صورت غیر فراسنجه‌ای، غنی‌تر شود. به هر حال نتایج نشان داد در صورتی که داده‌های قابل اعتماد ژنومی در اختیار نباشد، با پویش ژنومی سازواره‌هایی که از حاشیه‌نویسی قابل اطمینانی برخوردارند، می‌توان به کنکاش بهتر صفت تحت بررسی پرداخت.

شده ساختارهای ماژولی مشاهده شد که نشان‌دهنده وجود ژن‌های هاب در شبکه بود. همچنین فراسنجه‌های شبکه استخراج شدند. کاربرد منطقی فراسنجه‌های گراف در برنامه‌های اصلاح نژادی می‌تواند در بهبود صفات اقتصادی موثر واقع شود. این پژوهش می‌توانست با انجام یک فراتحلیل روی ریزآرایه‌های DNA، چه به صورت

فهرست منابع

- Abbas A. K. and Lichtman A. H. 2010. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system (3rd ed). Saunders, Elsevier Health Science. Pp. 100-312.
- Anderson L. 2012. Candidate based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *Journal of Physiology*, 563: 23-60.
- Baggiolini M. and Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307: 97-101.
- Bakhtiarzadeh M. R., Moradi-Shahrabak M. and Ebrahimie E. 2014. Transcriptional regulatory network analysis of the over-expressed genes in adipose tissue. *Genes and Genomics*, 36(1): 105-117.
- Bautista A. P. and Spitzer J. J. 1992. Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by *in situ* perfused rat liver. *Hepatology*, 15(5): 892-898.
- Cánovas A., Reverter A., DeAtley K. L., Ashley R. L., Colgrave M. L., Fortes M. R. and Silver G. A. 2014. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. *PloS One*, 9(7): e1022551.
- Carballo E., Lai W. S. and Blackshear P. J. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science*, 281: 1001-1005.
- Chen X., Cheng Z., Zhang S., Werling D. and Wathes D. C. 2015. Combining genome wide association studies and differential gene expression data analyses identifies candidate genes affecting mastitis caused by two different pathogens in the dairy cow. *Open Journal of Animal Sciences*, 5: 358-393.
- Deforge L. E., Fantone J. C., Kenney J. S. and Remick D. G. 1992. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin-8 production in human whole blood. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 2123-2129.
- Dermitzakis E. T. 2008. From gene expression to disease risk. *Nature Genetics*, 40(10): 492-493.
- Fortes M. R. S., Snelling W. M., Reverter A., Nagaraj S. H., Lehnert S. A., Hawken R. J. and Medrano J. F. 2012. Gene network analyses of first service conception in Brangus heifers: use of genome and trait associations, hypothalamic-transcriptome information, and transcription factors. *Journal of Animal Science*, 90(9): 2894-2906.
- García-Gómez E., Reverter A., Whan V., McWilliam S. M. and Arranz J. J. 2011. Using regulatory and epistatic networks to extend the findings of a genome scan: Identifying the gene drivers of pigmentation in Merino sheep. *PloS One*, 6(6): e21158.
- Gronlund U., Sandgren C. H. and Waller K. P. 2005. Haptoglobin and serum amyloid in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Veterinary Research*, 36(2): 191-198.
- Grob C., Bravo G. and Walsh R. 1990. Second thoughts on 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity. *Archives of General Psychiatry*, 47: 288-298.
- Jaeger A., Bardehle D., Oster M., Günther J., Muráni E., Ponsuksili S., Wimmers K. and Kemper N. 2015. Gene expression profiling of porcine mammary epithelial cells after challenge with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus in vitro*. *Veterinary Research*, 46(1): 50-58.
- Juliane G., Kathrin E., Norbert P., Wolfram P., Holm Z., Simone M., Helmut B. and Hans-Martin S. 2011. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S.aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *American Society for Microbiology*, 79: 695-707.
- Kogelman L. J., Cirera S., Zhernakova D. V., Fredholm M., Franke L. and Kadarmideen H. N. 2014. Identification of co-expression gene networks, regulatory genes and pathways for obesity based on adipose tissue RNA Sequencing in a porcine model. *BMC Medical Genomics*, 7(1): 57-69.
- Lee J., Hartman M. and Kornfeld H. 2009. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Medical Journal*, 50(1): 1-11.
- Li C. J., Li R. W. and Elsasser T. H. 2010. Alpha-tocopherol modulates transcriptional activities that affect essential biological processes in bovine cells. *Gene Regulation and Systems Biology*, 4: 109-124.

- Liang J., Wang J., Azfer A., Song W., Tromp G., Kolattukudy P. E. and Fu M. 2008. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates pro-inflammatory activation of macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 6337-6346.
- Lim D., Cho Y. M., Lee S. H., Chai H. H. and Kim T. H. 2013. Gene co-expression network analysis of reproductive traits in bovine genome. *Reproductive and Developmental Biology*, 37(4): 185-192.
- Matsushita K., Takeuchi O., Standley D. M., Kumagai Y., Kawagoe T., Miyake T., Satoh T., Kato H., Tsujimura T., Nakamura H. and Akira S. 2009. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature*, 458: 1185-1190.
- Nash D. L., Rogers G. W., Cooper J. B., Hargrove G. L., Keown J. F. and Hansen L. B. 2000. Heritability of clinical mastitis incidence and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 83(10): 2350-2360.
- Pelus L. M. and Fukuda S. 2006. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Experimental Hematology*, 34: 1010-1020.
- Piro R. M. and Cunto F. D. 2012. Computational approaches to disease-gene prediction: rationale, classification and successes. *FEBS Journal*, 279: 678-696 .
- Radostis O. M., Gay C. C., Hincncliff K. M. and Constable P. D. 2006. *Veterinary Medicine* (3rd Ed). Washington, Saunders Ltd. Pp. 673-674.
- Rainer J., Sanchez-Cabo F., Stocker G., Sturn A. and Trajanoski Z. 2006. CARMAweb: comprehensive R-and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Research*, 34 (Web Server issue): W498-W503.
- Ramayo-Caldas Y., Fortes M. R. S., Hudson N. J., Porto-Neto L. R., Bolormaa S., Barendse W. and Reverter A. 2014. A marker-derived gene network reveals the regulatory role of, and in intramuscular fat deposition of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 92(7): 2832-2845.
- Rupp R. and Boichard D. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 34(5): 671-688.
- Sanduja S., Blanco F. F., Young L. E., Kaza V. and Dixon D. A. 2012. The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Frontiers in Bioscience*, 17: 174-188.
- Seitz R., Roland P., Bohm C., Greitz T. and Stone-Elander S. 1991. Somatosensory discrimination of shape: Tactile exploration and cerebral activation. *European Journal of Neuroscience*, 3: 481-492.
- Smyth G. K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1): 3.
- Strunz S. 2014. Inferring a core transcriptional regulatory network in cows. In *Proceeding of 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Leipzig, German (German Society for Animal Science), pp. 1-4.
- Van Ommen B. and Stierum R. 2002. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5): 517-521.
- Walz A., Burgener R., Car B., Baggiolini M., Kunkel S. L. and Strieter R. M. 1991. Nucleotide structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. *Journal of Experimental Medicine*, 174: 1355-1362.
- Weber A., Weber A. T., McDonald T. L., Marilyn A. and Larson M. A. 2006. *Staphylococcus aureus* lipotechoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: Implications for early diagnosis of mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109: 79-83.
- Wilkinson J. M., Dyck M. K., Dixon W. T., Foxcroft G. R., Dhakal S. and Harding, J. C. 2012. Transcriptomic analysis identifies candidate genes and functional networks controlling the response of porcine peripheral blood mononuclear cells to mitogenic stimulation. *Journal of Animal Science*, 90(10): 3337-3352.
- Xu G., Li Y., Yang J., Zhou X., Yin X., Liu M. and Zhao D. 2007. Effect of recombinant Mce4A protein of *Mycobacterium bovis* on expression of TNF-alpha, iNOS IL-6, and IL-12 in bovine alveolar macrophages. *Molecular Cell Biochemistry*, 302: 1-7.
- Zhou L., Azfer A., Niu J., Graham S., Choudhury M., Adamski F. M., Youn C., Binkley P. F. and Kolattukudy P. E. 2006. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circulation Research*, 98(9): 1177-1185.
- Zlatnik A. and Yoshie O. 2000. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12: 121-127.



Extracting transcriptomic biomarker network in *Staphylococcus aureus* driven dairy cow's mastitis using human genome

M. Ghaderi-Zefrehei^{1*}, F. Arjmand², F. Samadian³, M. Memar³

1. Assistant Professor in Systems Biology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

2. MSc. Student in Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

3. Assistant Professor in Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

(Received: 18-03-2017 – Accepted: 06-08-2017)

Abstract

Mastitis, as one of the most economically important cost-driven diseases in dairy cow industry, is an inflammation-driven disease of the bovine mammary gland that in recent decades has casted lots of attention. Mastitis has low heritability; therefore, it is a cumbersome job to manage it from animal breeding point of view. Considering the management of mastitis in dairy farms production and the nature of complex molecular mechanisms involving in this disease, extracting mastitis's transcriptomic biomarkers network using OMICS data due to some well-annotated genomes like human genome, sounds to be entirely compelling. In this research, by fitting a linear model on each gene of a *Staphylococcus aureus* governed DNA microarray experiment performed in dairy cow udder, a list of differentially expressed genes or biomarkers were obtained. It was dissected that genes encoding cytokines and chemokine's e.g. CXCL5, CCL2, CXCL2, CXCL3, CXCL8 shown differentially expressed pattern in *staphylococcus aureus* driven dairy's cow mastitis. Biomarker network due to human genome orthologous genes indicated that APP (amyloid beta precursor protein) gene or biomarker shown the maximum degree of connection with other biological transcriptomic biomarkers. The results of this study can be used in breeding programs and drug-targeting studies to cure mastitis.

Keywords: Genome annotation, DNA microarray, Biomarkers, Cytokines