



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۳۴، بهار ۱۳۹۹

صص: ۲۵-۳۶

فرا-تحلیل داده‌های بیان ژن ورم پستان ناشی از اش‌ریشیا کلای در گاوهای شیری

• فرزاد شبانی^۱، احمد منصوری^۱، هادی آتشی (نویسنده مسئول)^۲، اسماعیل ابراهیمی^۳، محمد دادپسند^۲

۱. دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲. دانشیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳. دانشیار بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۷۶۵۷۰۸۳۷

Email: atashi@shirazu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2019.127995.1187

چکیده:

هدف از انجام این پژوهش، فرا-تحلیل داده‌های بیان ژن بافت پستان برای درک پاسخ ایمنی به ورم پستان ناشی از اش‌ریشیا کلای در گاوهای شیری بود. داده‌های ریزآرایه ورم پستان ناشی از اش‌ریشیا کلای از پایگاه داده‌ای NCBI بارگذاری شدند. مراحل مختلف تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R و Bioconductor انجام شد. برای خواندن داده‌ها از بسته‌ی affy و برای ارزیابی کیفی داده‌ها از بسته‌ی arrayQualityMetrics استفاده شد. داده‌ها با استفاده از بسته‌ی affyPLM پیش‌پردازش شدند. برای تصحیح پس‌زمینه، نرمال‌سازی و خلاصه‌سازی داده‌ها به ترتیب از روش MAS.5، Quantile و Tukey bi-weight استفاده شد. ارزش P برای هر ژن در هر مطالعه با استفاده از آزمون t تعدیل شده در بسته‌ی MetaDE محاسبه شد. برای فرا-تحلیل داده‌ها از بسته‌ی MetaDE و روش MaxP استفاده شد. در پایان با استفاده از نرم‌افزار Pathway Studio 2015 شبکه‌های ژنی Common regulator، Common target و Sub network برای ژن‌های معنی‌دار ترسیم شد و هستی‌شناسی آن‌ها بررسی شد. بر اساس آماره FDR حاصل از این مطالعه، ۶۹ ژن موثر بر ورم پستان شناسایی شدند ($P < 0.05$)، که در بین آنها ژن‌های *TLR2*، *CXCL2*، *CXCL5*، *AKT1* و *IL1-a* به عنوان ژن‌های بسیار تاثیرگذار شناسایی شدند. این ژن‌ها در متابولیسم چربی و پاسخ ایمنی علیه بیمارگرها نقش دارند. تغییر در بیان این ژن‌ها، بر فرآیندهایی مانند تکثیر سلولی، تمایز سلولی، مهاجرت سلولی و مرگ سلولی اثر دارند و موجب بروز پاسخ ایمنی به ورم پستان می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، ورم پستان، فرا-تحلیل، هستی‌شناسی ژن

Applied Animal Science Research Journal No 34 pp: 25-36

Meta-analysis of Transcriptomic Data of Mastitis Caused by *Escherichia coli* in dairy cowsBy: Farzad Sheibani¹, Ahmad Mansouri¹, Hadi Atashi^{*2}, Esmail Ebrahimi³, Mohammad Dadpasand²

1: Graduated MSc student, Department of Animal Science, Shiraz University, Shiraz, Iran

2: Associated Professor, Department of Animal Science, Shiraz University, Shiraz, Iran

3: Associated Professor, Department of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

This study was conducted to perform a meta-analysis on the transcriptomic data of udder tissue to elucidate the bovine immune response to mastitis caused by *Escherichia coli*. Mastitis microarray data caused by *Escherichia coli* were downloaded from NCBI database. Different stages of data analysis were performed using R and Bioconductor software. The *affy* and *arrayQualityMetrics* package were used to read data and control data quality, respectively. Data preprocessing performed using *affyPLM* package. The preprocessing steps of background correction, normalization and summarization were carried out using *MAS.5*, *Quantile*, and *Tukey bi-weight* methods, respectively. The moderated t-statistic was used to estimate *P-value* for each gene and the *MaxP* method in *MetaDE* package was used for the meta-analysis. Finally, the Pathway Studio software was used to draw common regulators, common targets and sub networks and to investigate gene ontology. Based on the FDR statistics from this study, 69 affecting mastitis genes were identified ($P < 0.05$), that's among them *TLR2*, *CXCL2*, *CXCL5*, *AKT1* and *IL1- α* genes were identified as the most influential genes. These genes are involved in lipid metabolism and immune response against pathogens. Changes in the expression of the identified genes affect processes such as cell proliferation, cell differentiation, cell migration, and cell death and also induce immune response to bovine mastitis.

Key words: Transcriptome, Mastitis, Meta-analysis, Gene ontology**مقدمه**

مقایسه‌ی کاهش، افزایش و یا عدم تغییر در فعالیت ژن‌ها در دو یا چند نمونه، فراهم کرده است. در بین آرایه‌های الیگنوکلوتیدی با تراکم بالا، تراشه‌ی ژنی افی‌متریکس^۱ برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها رایج‌تر هستند. در ریزآرایه‌های افی‌متریکس یا آرایه‌های تک‌کاناله، آرایه‌ها، داده‌های متراکمی برای هر مجموعه‌ی کاوشگر تولید می‌کنند که نشان‌دهنده‌ی میزان نسبی هیبریداسیون با هدف‌های رنگ‌آمیزی شده است. اندازه‌گیری بیان ژن در شرایط بافت‌ها یا سلول‌های مختلف، به تفسیر بهتر فرآیند زیستی و حیاتی کمک می‌کند. هستی‌شناسی ژن یک بخش مهم در بیوانفورماتیک است که کارکرد ژن‌ها و فرآورده‌های ژن‌ها را در گونه‌های مختلف نشان می‌دهد. افزون بر ویژگی‌های هر ژن، ارتباط بین ژن‌ها، پروتئین‌ها و مواد دیگر در سلول، یک شبکه‌ی پیچیده تشکیل می‌دهند و نقش مهمی در عملکرد درست سلول

واکنش التهابی غده‌های پستان در پاسخ به بیمارگرها که باعث تغییرات ظاهری در پستان، افزایش سلول‌های بدنی و تغییرات فیزیکی، شیمیایی و میکروبی در شیر می‌شود را ورم پستان می‌گویند. این بیماری سالانه خسارات زیادی به صنعت پرورش گاو شیری وارد می‌کند و با کاهش کمیّت و کیفیت شیر، کاهش میزان طول عمر و افزایش هزینه‌های دارو و درمان، آثار نامطلوبی بر اقتصاد گله دارد (Wolfova et al., 2006; Bar et al., 2008; Sadeghi-Sefidmazgi et al., 2011). این بیماری تحت تاثیر محیط و ژنتیک قرار دارد و برای مطالعه‌ی ژنتیکی آن می‌توان از روش‌های گوناگونی از جمله فنآوری ریزآرایه استفاده کرد. فنآوری ریزآرایه بسیار قدرتمند است و امکان بررسی هم‌زمان کنش ده‌ها، صدها و یا هزاران ژن را در یک سطح کوچک (یک لام در حد چند سانتی‌متر مربع)، برای

¹ Affymetrix

دارند. برای فهم شیوه‌ی عملکرد یک ارگانسم باید معلوم باشد که کدام ژن‌ها، در چه بافتی، به چه میزان و در چه زمانی بیان می‌شوند. روش فرا-تحلیل ریزآرایه‌ها، داده‌های حاصل از چند پژوهش‌های را ترکیب می‌کند و آن را به‌عنوان یک مجموعه داده، واکاوی می‌کند. گام‌های انجام یک فرا-تحلیل شامل گردآوری نتایج دو یا چند پژوهش، ترکیب نتایج پژوهش‌های گردآوری شده و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر است. نخستین بار رودز و همکاران (۲۰۰۲) و چوی و همکاران (۲۰۰۳) فرا-تحلیل را برای داده‌های ریزآرایه به کار بردند. مزیت استفاده از روش فرا-تحلیل در بررسی داده‌های ریزآرایه، افزایش اندازه‌ی نمونه از طریق ترکیب مجموعه داده‌های پژوهش‌های مستقل است که موجب افزایش توان آزمون در تشخیص تفاوت بیان ژن‌ها (ها) می‌شود (Hedges and Olkin, 1985; Rau et al., 2014; Stangl and Berry, 2000). در یک مطالعه، شریفی و همکاران (۱۳۹۶) با فرا-تحلیل داده‌های بیان ژن بافت پستان در گاو گزارش کردند که ۳۴ درصد از ژن‌هایی که در حالت فرا-تحلیل معنی‌دار بودند، در هیچ کدام از تحلیل‌های انفرادی معنی‌دار نبودند. در یک مطالعه‌ی دیگر، قادری زفره‌ای و همکاران (۱۳۹۶) با انجام فرا-تحلیل داده‌های بیان ژن بافت پستان در گاو گزارش کردند که ژن‌های رمزکننده‌ی سایتوکاین‌ها و کایموکاین‌ها در اثر ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس آرتوس بیان متفاوتی داشتند. هدف این پژوهش، فرا-تحلیل داده‌های بیان ژن بافت پستان برای شناسایی و ترسیم شبکه‌های ژن‌های موثر بر ورم پستان ناشی از اشریشیای کلای^۲ در گاو بود.

مواد و روش‌ها

جستجو و گردآوری داده‌ها

این مطالعه از تیر ماه سال ۱۳۹۴ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۵ در گروه علوم دامی دانشگاه شیراز انجام شد. مرحله‌ی نخست این پژوهش، جستجو و گردآوری داده‌های ورم پستان ناشی از اشریشیاکلای بود. در بانک اطلاعاتی GEO^۳ که در پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری^۴ قرار دارد

^۲ *Escherichia coli*

^۳ The gene expression omnibus

^۴ National center for biotechnology information

تحلیل انفرادی داده‌های ریزآرایه

در این پژوهش، همه مراحل تجزیه داده‌ها در نرم‌افزار R انجام شد (<http://www.r-project.org/>). برای واکاوی انفرادی، با استفاده از بسته‌ی *GEOquery* داده‌های خام هر پژوهش به صورت جداگانه از پایگاه داده‌ای GEO بارگذاری (Davis and Meltzer, 2007) و با استفاده از بسته‌ی *affy* فراخوانی شدند (Gautier et al., 2004). گام نخست در واکاوی داده‌های ریزآرایه، ارزیابی کیفی داده‌ها است که با استفاده از بسته‌ی *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al., 2009) و بر اساس نمودار ام‌ای^۵، نمودار باکس^۶ و نمودار حرارتی^۷ انجام شد و نمونه‌های نامناسب شناسایی و حذف شدند. گام بعد، پیش‌پردازش داده‌ها بود که با استفاده از بسته‌ی *affyPLM* انجام شد. پیش‌پردازش داده‌های ریزآرایه شامل نرمال‌سازی^۸، تصحیح پس‌زمینه^۹ و خلاصه‌سازی^{۱۰}، با استفاده از تابع *threestep* در بسته‌ی *affyPLM* انجام شد (Bolstad, 2004). برای نرمال‌سازی از روش *Quantile*، برای تصحیح پس‌زمینه از روش *MAS.5* و برای خلاصه‌سازی از روش *Tukey bi-weight* استفاده شد. با استفاده از بسته‌های *org.Bt.eg.db* و *bovine.db* که حاوی فایل‌های حاشیه‌نویسی^{۱۱} ژنوم گاو هستند شماره‌ی دسته‌کاوگرها به *EntrezID* تبدیل شدند. سپس، طرح آزمایشی مرتبط با داده‌های هر پژوهش تعریف شد؛ بدین صورت که به نمونه‌های کنترل (سالم) عدد صفر و نمونه‌های تیمار (ورم پستان) عدد یک داده شد و پس از این مرحله، داده‌ها تحلیل آماده شدند. تعداد تکرارها (کنترل و تیمار) برای هر کدام از مجموعه داده‌ها در جدول ۱ ارایه شده است.

^۵ MA plot

^۶ Box plot

^۷ Heatmap

^۸ Normalization

^۹ Background correction

^{۱۰} Summarization

^{۱۱} Annotation

فرا-تحلیل داده‌های ریزآرایه

برای انجام فرا-تحلیل، ابتداء داده‌ها با استفاده از تابع *MetaDE.Read* فراخوانی شدند. سپس با استفاده از تابع *MetaDE.merge* مجموعه داده‌های انتخاب شده با هم ترکیب شدند. پس از ادغام مجموعه داده‌ها، ژن‌های بدون بیان^{۱۲} و ژن‌های حاوی اطلاعات غیرمفید^{۱۳} با استفاده از تابع *MetaDE.filter* شناسایی و حذف شدند. ژن‌های بدون بیان، ژن‌هایی هستند که میانگین بیان خیلی اندکی دارند. ژن‌های حاوی اطلاعات غیرمفید، ژن‌هایی هستند که پراکنش بسیار کمی بین نمونه‌ها دارند. فرا-تحلیل داده‌ها با استفاده از بسته *Version* (*MetaDE* 1.0.5) انجام شد (Li and Tseng, 2012). برای واکاوی انفرادی و فرا-تحلیل داده‌ها به ترتیب از آزمون‌های *t* تعدیل شده^{۱۴} و بیشترین ارزش *P* استفاده شد (Wilkinson, 1951)، تصحیح آزمون‌های چندگانه با روش *FDR* انجام شد. تعداد ژن‌های معنی‌دار در حالت بیمار نسبت به شرایط کنترل در سطح معنی‌داری پنج درصد با استفاده از تابع *count.DENumber* شمارش شدند. سپس، با استفاده از بسته *clusterProfiler*، *Entrez ID* ژن‌ها به نام رسمی ژن تبدیل شد و ژن‌های معنی‌دار فهرست شدند.

¹² Unexpressed

¹³ Non informative

¹⁴ Moderated t-test

جدول ۱. شماره دسترسی، تعداد تکرار، تعداد نمونه‌های سالم (کنترل) و تعداد نمونه‌های بیمار در هفت مجموعه داده ریزآرایه ورم پستان ناشی از اشریشیا کلای

شماره دسترسی	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های سالم	تعداد نمونه‌های بیمار
GSE50685	۱۹	۵	۱۴
GSE25413	۱۵	۰	۱۵
GSE32186	۲۴	۶	۱۸
GSE24560	۵۸	۲۷	۲۱
GSE24217	۴۹	۲۴	۲۵
GSE15020	۱۰	۵	۵
GSE15025	۳۰	۱۵	۱۵

ترسیم شبکه‌های ژنی

پس از انجام فرا-تحلیل داده‌ها و شناسایی ژن‌های معنی‌دار، شبکه‌های ژنی شامل شبکه‌های Common target و Common regulator با استفاده از نرم‌افزار *Pathway Studio 2015* ترسیم شدند. شبکه‌ی Common target، فرآیندهایی که ژن‌های معنی‌دار در آن‌ها تاثیرگذار هستند را نشان می‌دهد؛ در این شبکه، ژن‌هایی که در پایین شبکه قرار می‌گیرند مهم‌تر از دیگر ژن‌ها هستند. شبکه‌ی ژنی Common regulator، عوامل کنترل‌کننده بیان یک ژن مانند فاکتورهای رونویسی و گیرنده‌ها را نشان می‌دهد و ژن‌های قرار گرفته در بالادست این شبکه، ژن‌های تاثیرگذارتر هستند. ژن‌های مهم‌تر با استفاده از واکاوی شبکه‌های حاصل شناسایی شدند، سپس زیر شبکه‌های^{۱۵} آنها ترسیم و بررسی شدند. جایگاه سلولی ژن‌ها شناسایی و برهمکنش‌های بین ژن‌ها بررسی شد.

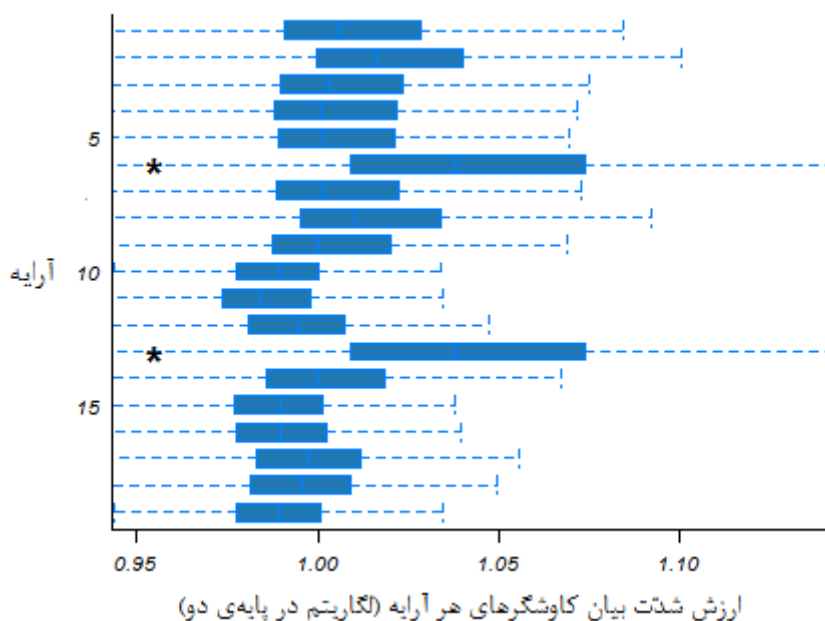
نتایج و بحث

ارزیابی کیفی داده‌ها

عوامل گوناگونی مانند کیفیت RNA یا کیفیت هیبریداسیون بر کیفیت داده‌های ریزآرایه اثر دارند (Fare et al., 2003). ارزیابی کیفی، یک گام اساسی در تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش‌های ریزآرایه است که برای شناسایی و حذف نمونه‌های پرت استفاده می‌شود. ارزیابی کیفی داده‌های ریزآرایه با سه روش

نمودار ام‌ای، نمودار باکس و نمودار حرارتی انجام می‌شود. با استفاده از نمودارهای ارزیابی کیفی، پراکندگی شدت بیان در آرایه‌ها بررسی می‌شود و چنانچه شدت بیان در یک یا چند آرایه (نمونه) پراکندگی بیشتری نسبت به آرایه‌های دیگر نشان دهد، به عنوان نمونه(های) پرت شناسایی می‌شوند. پس از فراخوانی داده‌ها به محیط نرم‌افزار R، از بسته‌ی *arrayQualityMetrics* برای ارزیابی کیفی داده‌ها استفاده شد (Kauffmann et al., 2009). برای همه‌ی مجموعه داده‌های استفاده شده از هر سه روش برای ارزیابی کیفی داده‌های استفاده شد و نمونه‌های نامناسب شناسایی و حذف شدند. تعداد نمونه‌های نامناسب برای مجموعه داده‌های GSE25413، GSE32186، GSE24560، GSE24217، GSE15020 و GSE15025 به ترتیب از ۵، ۱۵، ۷، ۲۴، ۱۷، ۵۸، ۱۵، ۴۹، ۵ از ۱۰، و ۲۱ از ۳۰ نمونه بود که همگی حذف شدند. به عنوان مثال، نمودار مربوط به مجموعه داده‌ی GSE50685 (نمودار ۱) نشان داد که دو نمونه از ۱۹ نمونه نامناسب هستند.

¹⁵ Sub network



نمودار ۱. ارزیابی کیفی مجموعه داده‌ی GSE50685. در این نمودار، هر ردیف نشان‌دهنده یک آرایه است. آرایه‌های ۶ و ۱۳ که با ستاره نشاندار شده‌اند، به عنوان آرایه‌ی نامناسب شناسایی شدند. محور افقی این نمودار، لگاریتم در پایه‌ی دو ارزش شدت کاوشگرهای هر آرایه است.

شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت

پژوهش‌ها، میانگین، میانه و یا بزرگترین عدد بیان کاوشگرهای هر ژن به عنوان داده بیان آن ژن استفاده می‌شود. در این پژوهش نیز پس از حذف کاوشگرهای کنترل، میانگین شدت بیان کاوشگرهای هر ژن در هر نمونه به عنوان داده بیان آن ژن در آن نمونه استفاده شد. از بسته‌ی *plyr* برای محاسبه‌ی میانگین شدت بیان کاوشگرهای یکسان استفاده شد. تعداد کاوشگرها در جدول ۲ آرایه شده است.

پس از انجام پیش‌پردازش، شماره کاوشگرها به *EntrezID* تبدیل شد. در هر آرایه تعدادی کاوشگر کنترل وجود دارد که *EntrezID* ندارند و حذف می‌شوند. چون همه‌ی مجموعه داده‌های این پژوهش از نوع *Affymetrix Bovine Genome Array* و *GPL2112* بودند؛ شمار کل کاوشگرها و کاوشگر-های کنترل برای همه‌ی مجموعه داده‌ها یکسان بود. در فناوری ریزآرایه، به ازای هر ژن چندین کاوشگر وجود دارد. در بیشتر

جدول ۲. تعداد انواع کاوشگرها در مجموعه داده‌های استفاده شده

شماره دسترسی	کل کاوشگرها	کاوشگرهای کنترل	کاوشگرهای تکراری	کاوشگرهای پایانی
GSE50685	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲
GSE25413	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲
GSE32186	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲
GSE24560	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲
GSE24217	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲
GSE15020	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲
GSE15025	۲۴۱۲۸	۶۴۷۸	۵۷۹۸	۱۱۸۵۲

فراآورده *TLR2* گیرنده‌ای است که در دیواره سلولی قرار دارد و بر فعالیت ژن‌هایی مانند *SOD2* در میتوکندری، *BIRC3*، *CEBPB* و *NEF2L2* در هسته، ژن‌های *MAP3K8*، *TRAF1* در محیط درونی سلول و نیز ژن‌هایی مانند *CD14* در دیواره‌ی سلولی اثرات تنظیمی دارد. همچنین با ژن‌هایی مانند *VEGFC*، *CFB*، *CXCL5*، *CXCL2* سلولی برهمکنش دارد. گزارش شده است که جهش در ژن *TLR* می‌تواند توانایی فراآورده آن را برای شناسایی PAMPها کاهش دهد و سبب اختلال در فعالیت سیستم ایمنی ذاتی و بروز ورم پستان شود (Prebavathy et al., 2015). ژن *TLR* بیشتر در ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود و توسط PAMPها فعال می‌شود. در یک پژوهش نشان داده شد که بیان ژن *TLR2* در طول عفونت سبب افزایش مهاجرت نوتروفیل‌ها می‌شود (Alves-Filho et al., 2009). در واقع بیان این ژن سبب ایجاد واکنش ایمنی به عفونت می‌شوند و نوتروفیل‌ها از جریان خون خارج شده و به محل آسیب دیده می‌رسند. این ژن در زمان وقوع ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس آرتوس نیز بیان قابل توجهی دارد (Goldammer et al., 2004) و به طور منحصر به فردی قادر به شناسایی پپتیدوگلیکان اسید و لیپوتیکوئیک اسید^{۱۶} از استافیلوکوکوس آرتوس و دیگر باکتری‌های گرم مثبت است (Bannerman et al., 2004). پروتئین *TLR2* درون فاگوزوم توسط پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم

در این پژوهش، هفت مجموعه داده برای فرا-تحلیل داده‌های ریزآرایه مرتبط با ورم پستان ناشی از اشیریشیا کلای استفاده شد؛ که در مجموع شامل ۱۱۸۵۲ ژن در ۱۳۳ نمونه بود. از ۱۱۸۵۲ ژن، ۶۰۴۵ ژن به عنوان ژن‌های بدون بیان یا ژن‌های حاوی اطلاعات غیرمفید حذف شدند و ۵۸۰۷ ژن به منظور تجزیه و تحلیل نهایی باقی ماند. نتایج فرا-تحلیل داده‌ها با استفاده از روش بیشترین ارزش *P*، نشان داد که در سطح معنی‌داری پنج درصد، بیان ۶۹ ژن در دو حالت بیماری و عدم بیماری تفاوت معنی‌دار دارد. پس از این مرحله، با استفاده از بسته‌ی *clusterProfiler* نام ژن‌های معنی‌دار جایگزین *EntrezID* آنها شد. نتایج واکاوی شبکه ژن-های با بیان متفاوت نشان داد این ژن‌ها در فرایندهای سلولی مانند تکثیر سلولی، تمایز سلولی، مهاجرت سلولی و مرگ سلولی نقش دارند. نتایج نشان داد که از بین ژن‌های شناسایی شده، ژن‌هایی مانند *TLR2*، *AKT1*، *CXCL2*، *CXCL5*، *PDK4*، *SOD2* تاثیر بیشتری در بروز فرآیندهای فیزیولوژیک دارند و از ژن‌های بسیار تاثیرگذار در بروز ورم پستان ناشی از اشیریشیا کلای هستند. قادری زفره‌ای و همکاران (۱۳۹۶) ژن‌های *CXCL2*، *CXCL3*، *CXCL5*، *CXCL8*، *SAA3* و *CCL2* را به عنوان ژن‌های مهم در بروز ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس آرتوس گزارش کردند. پس از شناسایی ژن‌های مهم موثر بر ورم پستان، زیر شبکه‌های مرتبط با این ژن‌ها ترسیم شد. در زیر شبکه‌ی ترسیم شده برای *TLR2*، مشخص شد که

¹⁶ Lipoteichoic acid

ژن قرار داشت و این ۲۶ ژن اثرات تنظیمی مثبت بر بیان *AKT1* داشتند. زیرشبکه‌ی ترسیم شده برای ژن *AKT1* نشان داد که بیان آن تحت تاثیر فرآورده‌های ژن‌هایی مانند *CKAP4* و *TRAM1* در دستگاه گلزی، ژن *SOD2* در میتوکندری، ژن‌های *BIRC3*، *XAF1* و *CEBPB* در هسته، *RND1*، *TRAF1* و *MAP3K8* در محیط درون سلول، ژن‌های *TLR2* و *CD14* در دیواره سلولی و ژن‌های *CXCL5* و *CXCL2* در محیط بیرونی سلول قرار دارد. ژن *AKT1* در زنده‌مانی، تکثیر و تمایز سلولی و نیز مهار مرگ برنامه ریزی شده سلولی^{۱۹} نقش دارد؛ مهار مرگ برنامه ریزی شده سلولی توسط ژن *AKT1* از طریق فسفریلاسیون و غیر فعال‌سازی پروتئین‌های ایجاد کننده‌ی مرگ برنامه ریزی شده سلولی انجام می‌شود (Etro et al., 2010). می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با کاهش بیان ژن *AKT1* در هنگام ورم پستان، مرگ برنامه ریزی شده سلولی افزایش می‌یابد و بیماری تشدید می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن *CEBPB* در ورم پستان نقش دارد. این ژن پروتئین‌هایی را رمز می‌کند که در تنظیم ژن‌های درگیر در واکنش‌های ایمنی و التهابی نقش دارند و همچنین پروتئین‌هایی را رمز می‌کند که می‌تواند به راه‌انداز و عناصر بالادست متصل شود و بیان ژن کلان‌نوع یک را تحریک کند (Szpirer et al., 1992). واکاوی شبکه نشان داد که جایگاه اثر پروتئین *CASP4* شبکه‌ی اندوپلاسمی است و در طول بیماری ورم پستان بر بیان ژن‌هایی مانند *CASP3* و *AKT1* اثر دارد. گاندر و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که *CASP4* در فرآیند مرگ سلولی در طول ورم پستان ناشی از اشیریشیا کلای نقش دارد. بیان ژن *PKD4* در دو گروه سالم و بیمار تفاوت داشت و واکاوی شبکه‌های ژنی نشان داد که این ژن پروتئینی را رمز می‌کند که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد و بر ژن *VEGFA* تاثیر مستقیم دارد. محصول ژن *PKD4* عضوی از خانواده‌ی پیرووات دهیدروژناز کیناز است (Korotchikina and Patel, 2001). بیان این ژن در زمان بیماری افزایش می‌یابد و متابولیسم بدن را کاهش می‌دهد. این ژن با کاهش تبدیل گلوکز به استیل کوآنزیم A، استیل کوآنزیم A

مثبت فعال می‌شود (Womack and Moll, 1986; Campos et al., 2001). نتایج نشان داد که گیرنده‌ی پروتئینی *TLR2* در دیواره‌ی سلولی قرار دارد و یک سیستم آبخاری شامل محیط برون سلولی، دیواره‌ی سلولی، میتوکندری و هسته را فعال می‌کند و بر پروتئین‌هایی مانند *CXCL5*، *CXCL2*، *VEGFC*، *CFB* که در محیط برون سلولی قرار دارند اثر مثبت دارد. این ژن به عوامل برون سلولی پاسخ می‌دهد و *NFE2L2*، *BIRC3* و *CEBPB* را در هسته‌ی سلول فعال می‌کند و اثرات تنظیمی بر این ژن‌ها دارد و نیز بر پروتئین *SOD2* در میتوکندری اثر مستقیم دارد. فرآورده‌ی ژن *SOD2* عضوی از خانواده‌ی سوپراکسید دسموتاز است که از مرگ سلولی ناشی از تنش‌های اکسیداتیو و سایتوکین‌های جلوگیری می‌کند و نیز در هنگام التهاب رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد (Beuwe et al., 2014). بنابراین، ژن *TLR2* به صورت مستقیم و غیرمستقیم در بروز واکنش ایمنی در برابر التهاب ناشی از ورم پستان تاثیر دارد. ژن *TLR2* از طریق *CXCL2* باعث پلیمریزاسیون اکتین می‌شود (Alves-Filho et al., 2009). فرانتظیمی در ژن‌های *TLR2*، *CXCL2* و *IL1α* پس از آلوده‌سازی پستان به اشیریشیا کلای گزارش شده است (Jaeger et al., 2015). دیگر ژن موثر بر ورم پستان، *CXCL2* بود. *CXCL2* کیموکاینی^{۱۷} است که به وسیله‌ی مونوسایت‌ها و ماکروفاژها ترشح می‌شود و کیموتاکتیکی برای لکوسایت‌های چند هسته‌ای و سلول‌های بنیادی خون‌ساز است (Pelus and Fukuda, 2006). در هنگام بروز ورم پستان نقش ترمیمی دارد و با فراخوانی سلول‌های بنیادی خون‌ساز به بازسازی بافت پستان می‌پردازد. در یک پژوهش مشخص شد که *CXCL2* در طول ورم پستان، از طریق چسبندگی گرانولوسایت و تراگذاری^{۱۸} (عبور گلبول‌های سفید خون از دیواره مویرگ به محیط پیرامون) نقش ایفا می‌کند (Chen et al., 2015). سیپکا و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که بیان ژن *CXCL2* در غده‌های پستانی درمان شده با ترکیب سفاپرین و پردنیزولون به طور معنی‌داری کاهش یافت. ژن دیگر موثر بر ورم پستان، *AKT1* بود که بیان آن تحت تاثیر ۲۶

¹⁹ Programmed cell death (Apoptosis)

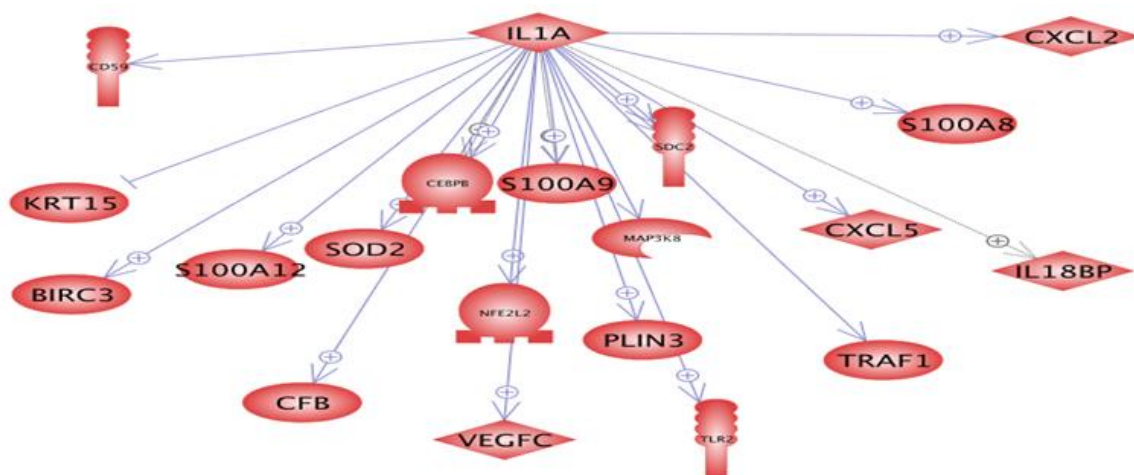
¹⁷ Chemokine

¹⁸ Diapedesis

کمتری در اختیار چرخه‌ی کربس قرار می‌دهد، و باعث کاهش تولید ATP و نیز کاهش تولید شیر در زمان ورم پستان می‌شود و حالت عدم فعالیت متابولیکی^{۲۰} ایجاد می‌کند (Andrews *et al.*, 1998). ژن *IL1α* عضوی از خانواده‌ی اینترلوکین-۱ و نیز مسئول ایجاد التهاب هست (Nicklin *et al.*, 1994). در این پژوهش، این ژن به عنوان یک ژن بسیار تاثیرگذار بر ورم پستان شناخته شد که بیان تعداد زیادی ژن را تحت تاثیر قرار داد (نمودار ۲). جیگیر و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که در ورم پستان ناشی از اشرفیسا کلای افزایشی سریع در بیان *IL1α* با افزایش نوتروفیل‌های خون به سیستم ایمنی کمک می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تغییر در بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم چربی و سیستم ایمنی بر بیماری ورم پستان تاثیر دارند که از مهمترین این ژن‌ها، می‌توان به *TLR2*، *CXCL2*، *PDK4* و *CXCL5* اشاره کرد. ژن‌های شناسایی شده موثر بر ورم پستان در این پژوهش، می‌توانند در پژوهش‌های آینده بیشتر مورد توجه قرار بگیرند.



نمودار ۲. اثر ژن *IL1a* بر ژن‌های دیگر. بیان ژن‌هایی که با علامت + نشان داده شده‌اند، به صورت مستقیم تحت تاثیر بیان ژن *IL1a* قرار دارند.

منابع

- and Grandemange, S. (2014). Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. *Free Radical Biology and Medicine*. 77, 139-151.
- Bolstad, B.M. (2004). Low Level Analysis of High-density Oligonucleotide Array Data: Background, Normalization and Summarization. PhD thesis, University of California, Berkeley.
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Lee, J.W., Zhao, X., Hope, J.C. and Rainard, P. (2004). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11, 463-472.
- Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T. and Gazzinelli, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of Immunology*. 167, 416-423.
- شرفی، س. پاکدل، ع و ابراهیمی، ا. (۱۳۹۶). فراتحلیل (متا-آنالیز) داده های بیان ژن بافت پستان آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی در گاوهای شیری. *علوم دامی ایران*. جلد ۴۸، شماره ۳، صفحات ۳۴۳-۳۵۲.
- قادری-زفره‌ای، م. ارجمند، ف. صمدیان، ف و معمار، م. (۱۳۹۶). استخراج شبکه بین زیست نشانگرهای ترانسکریپتومی ورم پستان گاو شیری ناشی از باکتری استفیلوکوکوس اورئوس با استفاده از ژنوم انسان. جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۱-۱۲.
- Alves-Filho, J.C., Freitas, A., Souto, F.O., Spiller, F., Paula-Netob, H., Silvac, J.S., Gazzinelli, R.T., Teixeirad, M.M., Ferreira, S.H. and Cunha, F.Q. (2009). Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Biological Sciences*. 106, 4018-4023.
- Andrews, M.T., Squire, T.L., Bowen, C.M. and Rollins, M.B. (1998). Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 8392-8397.
- Beuwe, P., Ennen, M., Klotz, R., Barbieux, C.

- 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.
- Choi, J.K., Yu, U., Kim, S. and Yoo, O.J. (2003). Combining multiple microarray studies and modeling interstudy variation. *Bioinformatics*. 19, 84-90.
- Davis, S. and Meltzer, P. (2007). GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*. 14, 1846-1847.
- Etro, D., Missiroli, S., Buontempo, F., Neri, L.M. and Capitani, S. (2010). AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1). *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*. 14, 336-352.
- Fare, T.L., Coffey, E.M., Dai, H., He, Y.D., Kessler, D.A., Kilian, K.A., Koch, J.E., LeProust, E., Marton, M.J., Meyer, M.R. and Stoughton, R.B. (2003). Effects of atmospheric ozone on microarray data quality. *Analytical Chemistry*. 75, 672-675.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M. and Irizarry, R.A. (2004). Affy analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. 20, 307-315.
- Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H.J., Brunner, R.M., Kata, S.R., and Seyfert, H.M. (2004). Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2) and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11, 174-185.
- Hedges, L.V. and Olkin, I. (1985). *Statistical Methods for Meta-analysis*. Academic Press, Orlando, Florida, USA. pp: 369.
- 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, 50-58.
- Kauffmann, A., Gentleman, R. and Huber, W. (2009). arrayQualityMetrics a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*. 25, 415-416.
- Korotchkina, L.G. and Patel, M.S. (2001). Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 37223-37229.
- Li, J. and Tseng, G.C. (2012). An adaptively weighted statistic for detecting differential gene expression when combining multiple transcriptomic studies. *Annals of Applied Statistics*. 5, 994-1019.
- Nicklin, M.J., Weith, A. and Duff, G.W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*. 19, 382-384.
- Prebavathy, T., Thanislass, J., Dhanammal, L., Ganesan, R. and Mukhopadhyay, H.K. (2015). Association between SNPs in TLR2 gene segment corresponding to LRR functional domain of TLR2 receptor and bovine mastitis. *Asian Journal of Animal Sciences*. 9, 45-56.
- Pelus, L.M. and Fukuda, S. (2006). Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRO beta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Experimental Hematology*. 34, 1010-1020.
- Rau, A., Marot, G. and Jaffrézic, F. (2014). Differential meta-analysis of RNA-seq data from multiple studies. *BMC Bioinformatics*. 15, 91-101.
- Rhodes, D.R., Barrette, T.R., Rubin, M.A., Ghosh, D. and Chinnaiyan, A.M. (2002). Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Research*. 62, 4427-4433.
- Sipka, A., Klaessig, S., Duhamel, G. E., Swinkels, J., Rainard, P. and Schukken, Y., (2014). Impact of intramammary treatment on gene expression profiles in bovine *Escherichia coli* mastitis. *PLoS One*. 9, 1-11.

- Stangl, D.K. and Berry, D.A. (2000). Meta-analysis in medicine and health policy. CRC press, New York.
- Sadeghi-Sefidmazgi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Nejati-Javaremi, A., Miraei-Ashtiani, S.R. and Amer, P.R. (2011). Estimation of economic values and financial losses associated with clinical mastitis and somatic cell score in Holstein dairy cattle. *Animal*. 5, 33-42.
- Szpirer, C., Riviere, M., Cortese, R., Nakamura, T., Islam, M.Q., Levan, G. and Szpirer, J. (1992). Chromosomal localization in man and rat of the genes encoding the liver-enriched transcription factors C/EBP, DBP, and HNF1/LFB-1 (CEBP, DBP, and transcription factor 1, TCF1, respectively) and of the hepatocyte growth factor/scatter factor gene (HGF). *Genomics*. 13, 293-300.
- Wilkinson, B. (1951). A statistical consideration in psychological research. *Psychological Bulletin*. 48, 156-158.
- Womack, J.E. and Moll, Y.D. (1986). Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. *Journal of Heredity*. 77, 2-7.
- Wolfova, M., Přibyl, J., Wolf, J. and Zahradkova, R. (2006). Effect of subsidies regimes on economic values of functional traits in beef cattle breeding. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123, 97-104.
- Yoeli-Lerner, M., Yiu, G.K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S. and Toker, A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Molecular Cell*. 20, 539-550.