

## مطالعه بیوانفورماتیکی بیماری ورم پستان گاو ایجاد شده توسط لیپوپلی ساکارید اشرشیاکلی با استفاده از داده‌های ریز آرایه

- صمد وجدی حکم آباد<sup>۱</sup> (Ph.D Student)، صادق علیجانی<sup>۱</sup> (Ph.D)، حسین دقیق کیا<sup>۱</sup> (Ph.D)، حکیمه زالی<sup>۲\*</sup> (Ph.D)، سهیلا خداکریم<sup>۳</sup> (Ph.D)، محسن بیگدلی پاشایی<sup>۴</sup> (B.A)
- ۱- دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- دفتر توسعه فناوری سلامت معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: به منظور توسعه استراتژی‌های جدید برای جلوگیری از ورم پستان از نوع اشرشیاکلی، داشتن فهم درست از جزئیات و مکانیسم‌های مولکولی درگیر در پاسخ‌های ایمنی میزبان به این باکتری ضروری می‌باشد. در این تحقیق با استفاده از اطلاعات ترانسکریپتومیکس موجود به مطالعه بیوانفورماتیکی این بیماری پرداخته شد. مواد و روش‌ها: داده‌های حاصل از مطالعه گیلبرت و همکارانش که با استفاده از تکنیک ریز آرایه انجام شده بود از سایت GEO استخراج گردید. بر اساس داده‌های استخراج شده با استفاده از پایگاه داده String برهمکنش بین پروتئین‌ها شناسایی شده و توسط نرم‌افزار Cytoscape شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین آن رسم گردید. آنالیزهای شبکه جهت یافتن هاب‌ها و دسته‌بندی بر اساس GO برای هر شبکه توسط CluGO-Clue-pedia انجام شد.

یافته‌ها: شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از ژن‌هایی با بیان متفاوت در بافت پستان گاو آلوده شده با لیپوپلی ساکارید برگرفته از باکتری E. coli بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت تعیین شد. بخش‌های مشترک دو شبکه انتخاب شد و در آنالیز شبکه حاصله، ژن‌های IL6، IL1B، PARP14، JFIH1، JSG15، GRO1، IFIT3، CCL5، ICAM1، NOS2 و IRF9 دارای بیشترین درجه بودند که به عنوان هاب‌های شبکه عمل می‌کنند. آنالیز خوشه‌بندی بر اساس GO، مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی، عمل کردهای ملکولی، جایگاه سلولی، فرآیندهای سیستم ایمنی و مسیرهای حاکم بر اساس پایگاه KEGG تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که با افزایش زمان حضور پاتوژن در میزبان تعداد برهمکنش‌ها در پروتئین‌های هاب همراه با افزایش است بنابراین این پروتئین‌ها می‌توانند کاندیدای هدف‌های دارویی باشند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکولی، التهاب پستان گاو، نقشه‌های برهمکنش پروتئین، تجزیه و تحلیل ریز آرایه، ترانسکریپتوم

### مقدمه

ورم پستان شایع‌ترین بیماری تولید و از نظر اقتصادی

بزرگ‌ترین مشکل و مهم‌ترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری به شمار می‌رود. این بیماری ضررهای اقتصادی زیادی به صنعت لبنیات می‌زند [۱]. افت تولید شیر تنها بخش

کوچکی از تاثیرات آن می‌باشد. هزینه‌های ناشی از افزایش نرخ حذف حیوانات، جریمه‌های ناشی از کاهش قیمت شیر، هزینه درمان، مناسب نبودن شیر برای مصرف انسان، آثار جانبی باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیک بر سلامتی انسان و هزینه‌های پیشگیری از دیگر آثار این بیماری می‌باشند [۳،۲]. پاسخ ایمنی پستان نسبت به حضور میکروارگانیزم‌ها (شایع‌ترین عامل) باعث ورم پستان می‌شود که به ۲ گروه ورم پستان بالینی و تحت بالینی تقسیم می‌شود. صفت مقاومت به ورم پستان یک صفت پیچیده می‌باشد و مطالعات بیش‌تری جهت فهم بهتر پایه ژنتیکی مقاومت به ورم پستان نیاز می‌باشد. محققان با بررسی ژنومیکی، پروتئومیکی و متابولومیکی سعی در شناخت بهتر این بیماری دارند. بیماری ورم پستان توسط میکروارگانیزم‌های مختلفی ایجاد می‌شود اما عمده‌ترین آن‌ها استافیلوکوک‌ها، استرپتوکوک‌ها و باکتری‌های کلی‌فورم می‌باشد [۴]. باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*) پاتوژن محیطی غالب است و به طور روتین در پستان گاو تشکیل کلنی داده و به‌عنوان یک عامل خطر در ایجاد ورم پستان محسوب می‌شود. ورم پستان ناشی از *E. coli* مشخصات خاصی نظیر طول مدت کوتاه بیماری و پاسخ فاز حاد دارد. کمیت و کیفیت و نحوه پاسخ ایجاد شده در بافت به فاکتورهای بیولوژیکی و محیطی نظیر جیره غذایی میزبان، سویه و دوز باکتری و زمان آلودگی بستگی دارد. در مراحل اولیه آلودگی، پاسخ‌های مربوط به ایمنی ذاتی تشدید می‌شود. بنابراین، اولین و کاراترین خط دفاعی بافت پستان در برابر آلودگی *E. coli*، سیستم ایمنی ذاتی است [۵]. پروفایل بیان ژنی بسیاری از سایتوکین‌ها و سایر میانجی‌های التهابی درگیر در پاسخ ایمنی ذاتی بستگی به نوع پاتوژن دارد [۶]. باکتری‌های گرم منفی نظیر *E. coli* موجب بیان بالای سایتوکین‌ها و سایر میانجی‌های التهابی موجود در شیر، در مراحل اولیه آلودگی می‌شوند. در حالی که باکتری‌های گرم مثبت نظیر استافیلوکوک آرتوس موجب بیان پایین و با تاخیر سایتوکین‌ها و سایر میانجی‌های التهابی می‌شوند. اخیراً پیشنهاد شده که مسیر Toll-likereceptor (TLR)-4 transduction

pathway مهم‌ترین مشارکت‌کننده در مکانیسم ایمنی غده پستان علیه بیماری ورم پستان ناشی از *E. coli* می‌باشد [۷]. توسعه فناوری ریزآرایه امکان بررسی جامع بر روی ژن‌های مشخص و شناخته شده را در بافت‌های خاصی نظیر پستان فراهم نموده است. اخیراً مطالعاتی از این دست در نمونه‌های جمع‌آوری شده از بافت پستان گاوهای شیری کشتار شده‌ای که به طور تجربی با دوزهای متوسط و بالای استافیلوکوک آرتوس [۸]، استرپتوکوک اوبریس [۹] و *E. coli* [۱۰،۱۱،۱۲] آلوده شده‌اند، انجام گرفته است. تکنولوژی‌های جدیدی مانند فناوری ریزآرایه، توالی یابی RNA و داده‌های پروتئومیکس معمولاً مجموعه بسیار بزرگی از ژن‌ها (صدها تا هزاران) که در مراحل بیولوژیکی مختلفی درگیر می‌باشند را ارائه می‌کنند. با توجه به این‌که تعداد ژن‌ها بالا بوده و آنالیز همه این ژن‌ها کار مشکلی می‌باشد. برای رفع این مشکل نیاز به کمک بیوانفورماتیک و استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی به منظور استخراج مکانیسم‌هایی که این ژن‌ها در آن درگیر می‌باشند، احساس می‌شود. با پیشرفت‌های اخیر که در زمینه فن‌آوری ریزآرایه صورت گرفته است امکان بررسی و اندازه‌گیری بیان هزاران ژن در بافت پستان حیوانات سالم و بیمار مهیا شده است [۱۳،۱۴،۱۵]. بر اساس تحقیقات انجام گرفته مشخص شده است که سلول‌های اپیتلیال پستان نقش اساسی در ایجاد پاسخ به پاتوژن‌های مهاجم ایفا می‌کنند و در چندین مطالعه از کشت سلولی این سلول‌ها برای بررسی مکانیسم پاسخ ایمنی ایجاد شده در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده است. این مطالعات به منظور فهم اعمال متفاوت بافت‌های مختلف پستان [۵]، یا انواع سلول‌ها [۱۴] در غده پستان به منظور مقایسه تفاوت‌های تغییرات ترانسکریپتومی القاشده توسط باکتری‌های پاتوژن مختلف [۱۶] انجام شده است. به منظور افزایش میزان دانش ما از مکانیسم‌های دفاعی درگیر در غده پستانی، شناسایی ژن‌های تغییر بیان یافته و مسیرهای ژنی که در زمان وجود باکتری‌های پاتوژن در پستان دچار تغییراتی می‌شوند و شبکه ژنی درگیر ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین تشخیص هر چه

مطالعه جهت تصویرسازی شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین از cytoscape-3 استفاده شد.

آنالیز شبکه‌ها. پس از ساختن شبکه، داده کاوی از هزاران برهمکنش بر تکنیک‌هایی استوار است که بر پایه ایده‌های تئوری گراف هستند. آنالیز شامل سه دسته عمومی از روش‌های پیش‌بینی‌های بیولوژیک از شبکه‌های برهمکنش پروتئین است. در روش اول شناسایی پروتئین‌هایی با بیش‌ترین برهمکنش که به قطب‌های شبکه معروفند، سپس روش‌های کشف موتیف‌های شبکه که مسئول ساختارهای زیرگرافی مانند مثلث‌های برهمکنش یا لوپ‌های پس‌خور و پیش‌خور هستند. در انتها رویکردهای آشکارسازی کمپلکس‌های یک شبکه (اغلب به عنوان مدول‌های ژنی) معرفی می‌شوند [۲۶].

حاشیه‌نویسی مدول‌های ژنی. به علت طبیعت مدولار شبکه‌های سلولی، امروز استفاده از مدول‌های ژنی برای تعیین عمل‌کرد ژنی به طور وسیعی مورد توجه قرار گرفته است. برای این منظور اغلب پایگاه داده انتولوژی کنترل شده‌ای مانند GO، KEGG [۲۷] یا GenMAPP [۲۸] مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای انجام آنالیزهای مرتبط نیز نرم‌افزارهای متعددی به وجود آمده که در این جا از CluGO-Clue-pedia استفاده شده است [۲۳].

## نتایج

شکل ۱ شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین از ژن‌هایی با بیان متفاوت در بافت پستان گاو آلوده شده با لیپوپلی ساکارید برگرفته از باکتری E.coli را بعد از گذشت ۳ ساعت (LPS3h) که با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape رسم شده است را نشان می‌دهد. این شبکه حاوی ۸۴ گره (نود) و ۳۱۰ یال می‌باشد.

شکل ۲ شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین ژن‌های متفاوت بیان شده در بافت پستان گاوهای آلوده شده با لیپوپلی ساکارید برگرفته از باکتری E.coli بعد از گذشت ۶ ساعت (LPS6h) را که توسط نرم‌افزار Cytoscape رسم شده

زودتر ورم پستان و شناسایی عوامل مسبب مربوطه در انتخاب به‌موقع برنامه‌های درمانی مناسب خیلی حائز اهمیت است. بنابراین، توسعه بیومارکرهای ساده، معتبر و قابل اجرا برای سلامتی گاوها امری حیاتی است. مطالعاتی که از فناوری‌های ژنومی و ترانسکریپتومی به منظور تشخیص بیان ژن‌ها و نحوه تنظیم آن‌ها در سلول‌های تولیدکننده شیر استفاده می‌نمایند ما را به شناسایی بیومارکرهای جدید سوق می‌دهند [۶، ۱۰، ۱۷].

## مواد و روش‌ها

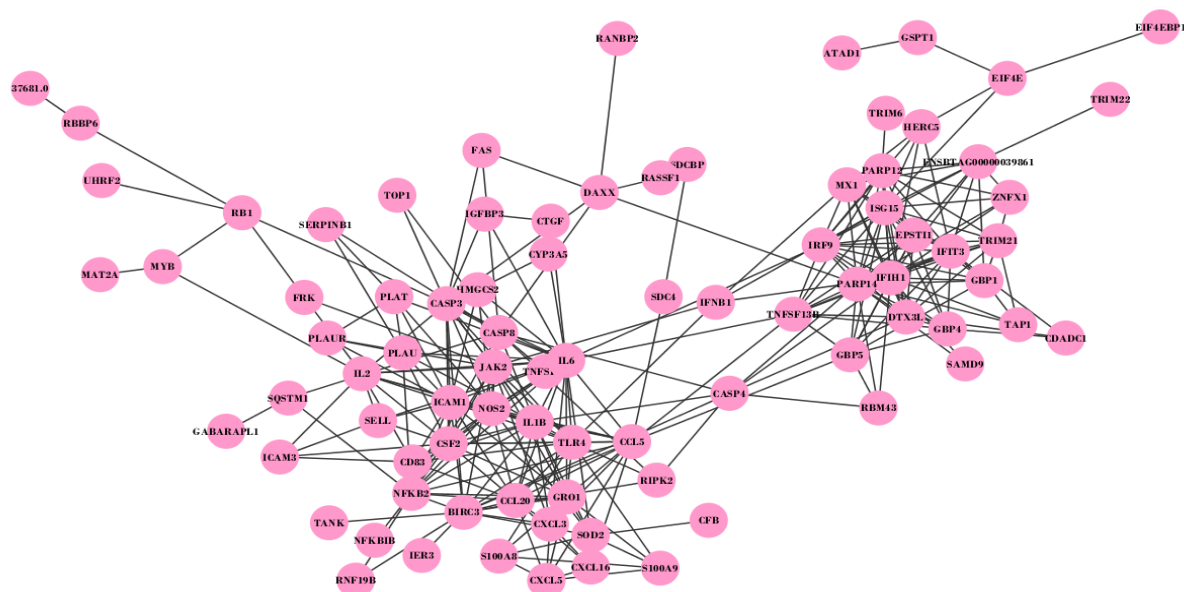
گرفتن داده. داده‌ها از مطالعه گیلبرت و همکارانش [۱۸] که اثر لیپوپلی ساکارید برگرفته از باکتری اشرشیاکلی را بر روی بافت پستان گاو شیری توسط ریزآرایه مورد ارزیابی قرار داده بودند از سایت GEO [۱۹] گرفته شد.

روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها. داده‌های حاصل از تکنیک ریزآرایه بعد از نرمال‌سازی با الگوریتم RMA مورد آنالیز قرار گرفت و در نهایت ژن‌هایی با بیان متفاوت در بافت پستان گاوها پس از آلوده‌سازی ۳ و ۶ ساعت با لیپوپلی ساکارید باکتری اشرشیاکلی تعیین شدند [۱۸]. بر اساس داده‌های استخراج شده با استفاده از پایگاه داده string [۲۰] برهمکنش بین پروتئین‌ها شناسایی شد و توسط نرم‌افزار cytoscape [۲۱] شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین آن رسم گردید. آنالیزهای شبکه جهت یافتن هاب‌ها و دسته‌بندی بر اساس GO [۲۲] برای هر شبکه توسط CluGO-Clue-pedia [۲۳] انجام شد.

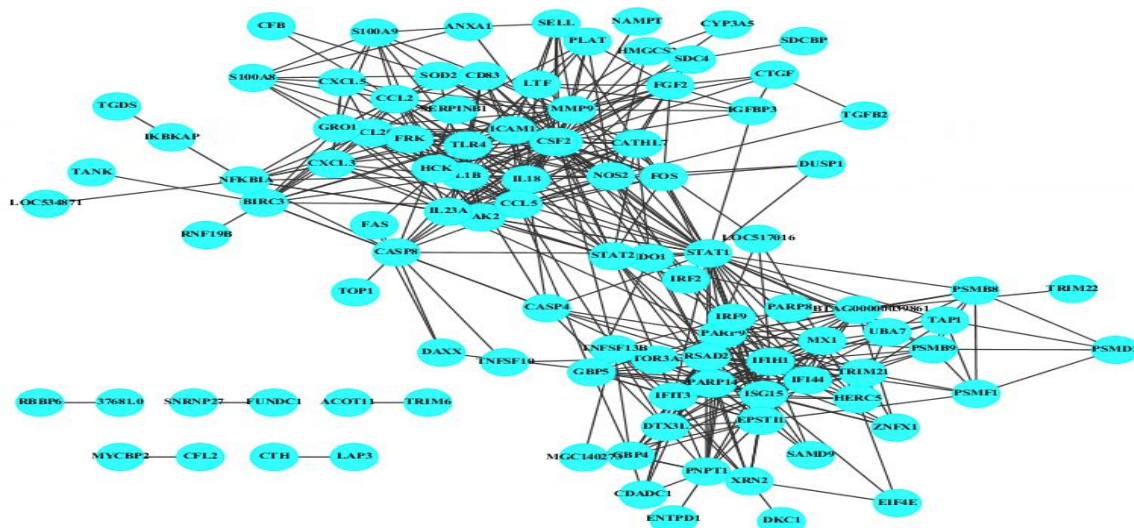
ساخت شبکه بیولوژیک. ترانسکریپتومیکس ایجاد حجم عظیمی از داده می‌کند که نیاز به روش‌های پیچیده‌ای برای داده کاوی و تفسیر است. یک ساختار داده عمومی که برای این کار به وجود آمد شبکه است. مزیت روش‌های بر پایه شبکه، قدرت‌شان در سازماندهی حجم عظیم داده است که با دسترسی به روش‌های تئوری گراف، داده کاوی و تفسیر تصویری به آسانی میسر می‌گردد. چندین ابزار برای تصویرسازی و آنالیز شبکه‌های بیولوژی مانند VisAnt، cytoscape و tYNA به وجود آمده است [۲۴، ۲۵]. در این

ClueGo-Cluepedia رسم شده نمایش می‌دهد و بیانگر فرآیندهای بیولوژیکی است که در این شبکه و به علت حضور تغییر یافته این ژن‌ها فعال شده است. شکل ۵ نیز عمل‌کردهای اصلی ملکولی حاصل از حضور این ژن‌ها را نشان می‌دهد و شکل ۶ نیز جایگاه سلولی که این ژن‌ها در آن‌جا بیان شده‌اند را نشان می‌دهد. نرم‌افزار ClueGo-Cluepedia علاوه بر آنالیزهای مبتنی بر دسته‌بندی‌های GO به بررسی و آنالیز ژن‌ها بر اساس فرآیندهای سیستم ایمنی نیز می‌پردازد که نتایج آن در شکل ۷ به نمایش گذاشته شده است. این نرم‌افزار همچنین به کشف مسیرهای حاکم بر ژن‌های تغییر بیان یافته بر اساس پایگاه KEGG نیز می‌پردازد که نتایج آن در شکل ۸ به نمایش در آمده است.

و حاوی ۱۰۴ گره و ۵۰۹ یال است نمایش می‌دهد. به منظور پی بردن به شباهت‌های بین دو شبکه ایجاد شده از ژن‌های بیان شده در بافت پستان گاوهای آلوده شده بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت، بخش‌های مشترک دو شبکه انتخاب شده و در شکل ۳ به نمایش گذاشته شده است. شبکه ایجاد شده دارای ۶۰ گره و ۲۱۲ یال بود. آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین حاصل از اشتراکات دو شبکه ۳ و ۶ ساعت در جدول ۱ نشان داده شده است. ژن‌های IL6, IFIH1, ICAM1, CCL5, IFIT3, GRO1, ISG15, IL1B, PARP14, NOS2 و IRF9 دارای بیش‌ترین درجه بودند و به عنوان هاب‌های شبکه عمل می‌کنند. شکل ۴ آنالیز خوشه‌بندی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین بر اساس GO بر روی شبکه حاصل از ژن‌های مشترک در ۳ و ۶ ساعت که با نرم‌افزار



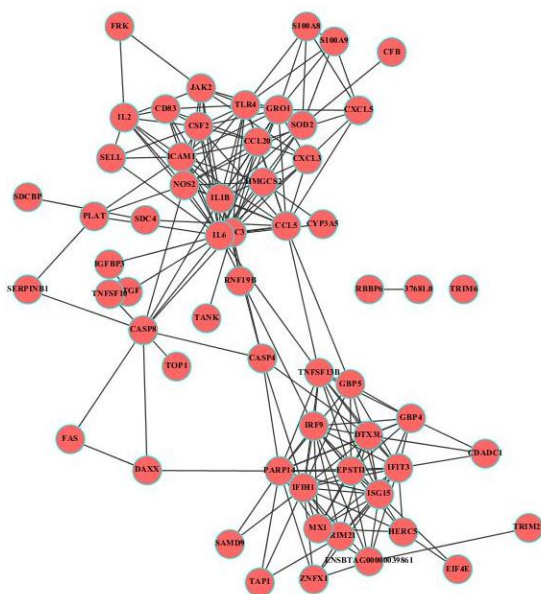
شکل ۱. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین از ژن‌های متفاوت بیان شده در بافت پستان گاوهای آلوده شده با لیوبلی ساکارید برگرفته از باکتری *E. coli* بعد از گذشت ۳ ساعت (LPS3h) رسم شده توسط نرم‌افزار Cytoscape.



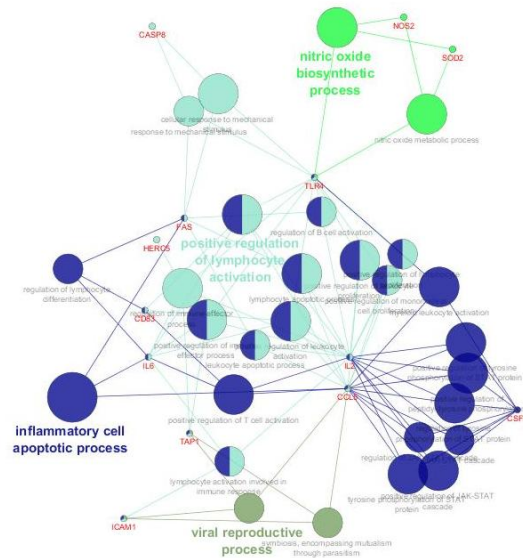
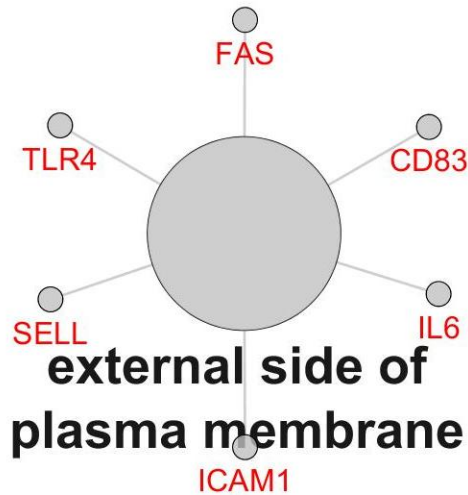
شکل ۲ شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از ژن‌های متفاوت بیان شده در بافت پستان گاوهای آلوده شده با لیوپیلی ساکارید برگرفته از باکتری *E. coli* بعد از گذشت ۶ ساعت (LPS6h) رسم شده توسط نرم افزار Cytoscape.

جدول ۱ آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از اشتراکات شبکه های ایجاد شده از ژن‌های متفاوت بیان شده در بافت پستان آلوده شده با لیوپیلی ساکارید برگرفته از باکتری *E. coli* بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت

نام مخفف ژن	درجه در LPS3 h	درجه در LPS6 h	درجه در شبکه مشترک
IL6	۲۵	۳۶	۲۲
IFIH1	۲۰	۲۵	۱۶
PARP14	۱۹	۲۴	۱۶
IL1B	۱۹	۲۵	۱۶
ISG15	۱۸	۲۵	۱۵
GRO1	۱۵	۱۹	۱۴
IFIT3	۱۶	۲۱	۱۴
CCL5	۱۶	۲۰	۱۴
ICAM1	۱۸	۲۲	۱۴
IRF9	۱۵	۲۰	۱۳
NOS2	۱۵	۲۳	۱۳

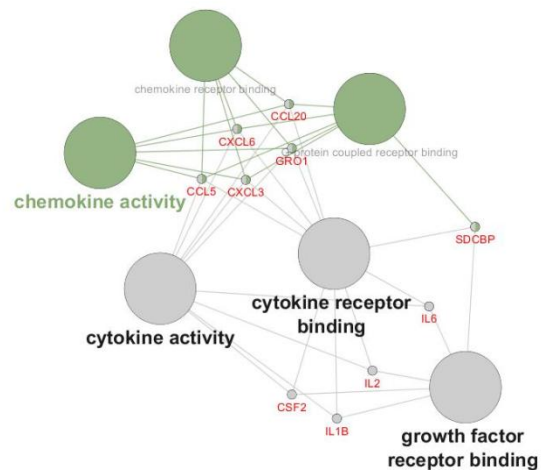
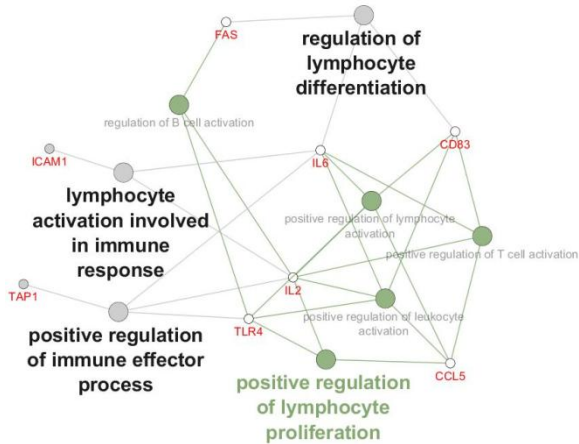


شکل ۳ شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از بخش‌های مشترک دو شبکه ایجاد شده از ژن‌های متفاوت بیان شده در بافت پستان گاوهای آلوده شده با لیوپیلی ساکارید بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت.



شکل ۶ آنالیز هستی شناسی ژنی (GO) شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از اشتراکات دو شبکه ایجاد شده از ژن های متفاوت بیان شده در بافت پستان آلوده شده با لیپوبلی ساکارید بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت رسم شده توسط نرم افزار ClueGo-Cluepedia بر اساس بخش سلولی (CC).

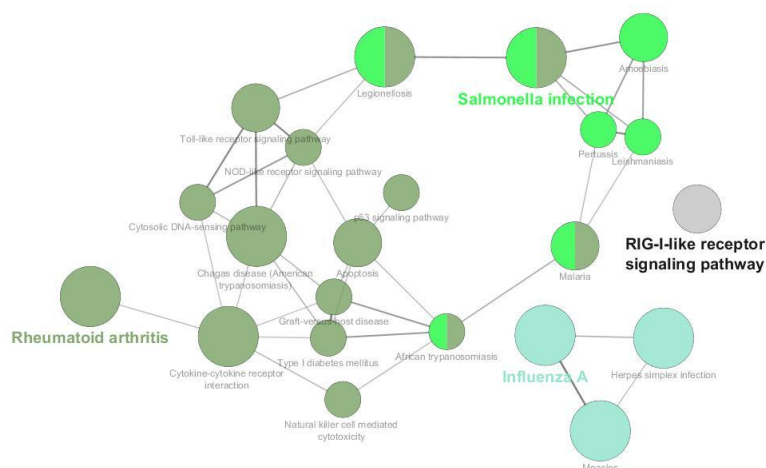
شکل ۴. آنالیز هستی شناسی ژنی (GO) شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از اشتراکات دو شبکه ایجاد شده از ژن های متفاوت بیان شده در بافت پستان آلوده شده با لیپوبلی ساکارید بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت رسم شده توسط نرم افزار ClueGo-Cluepedia بر اساس فرآیندهای بیولوژیک (BP).



شکل ۷ آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از ژن های مشترک متفاوت بیان شده در بافت پستان آلوده شده با لیپوبلی ساکارید بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت رسم شده توسط نرم افزار ClueGo-Cluepedia بر اساس فرآیندهای سیستم ایمنی.

شکل ۵. آنالیز هستی شناسی ژنی (GO) شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از اشتراکات دو شبکه ایجاد شده از ژن های متفاوت بیان شده در بافت پستان آلوده شده با لیپوبلی ساکارید بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت رسم شده توسط نرم افزار ClueGo-Cluepedia بر اساس عملکرد مولکولی (MF).





شکل ۸ آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین - پروتئین از ژن‌های مشترک متفاوت بیان شده در بافت پستان آلوده شده با لیوپلی ساکارید بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت رسم شده توسط نرم افزار ClueGo-Cluepedia بر اساس KEGG.

با افزایش زمان حضور عامل پاتوژن در بافت است به طوری که تعداد ژن‌های تغییر بیان یافته افزایش یافته است. به منظور پی بردن به شباهت‌های بین دو شبکه ایجاد شده از ژن‌های بیان شده در بافت پستان گاوهای آلوده شده بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت، این دو شبکه ادغام شدند و بخش مشترک دو شبکه انتخاب شده و در شکل ۳ به نمایش گذاشته شده است. شبکه ایجاد شده دارای ۶۰ گره و ۲۱۲ یال است. آنالیز شبکه PPI حاصل از اشتراکات دو شبکه ۳ و ۶ ساعت نشان داد که ژن‌های IL6, IFIH1, PARP14, IL1B, JSG15, GRO1, IFIT3, CCL5, ICAM1, IRF9, NOS2 دارای بیشترین درجه هستند (جدول ۱). مطابق اطلاعات موجود در جدول مشاهده می‌شود که این پروتئین‌ها در دو زمان متفاوت دارای تعداد برهمکنش‌های متفاوت با سایر پروتئین‌ها هستند به طوری که با گذشت زمان پس از ۶ ساعت تعداد برهمکنش‌ها در پروتئین‌های هاب همراه با افزایش است. آنالیز محاسباتی شبکه‌های برهمکنش پاتوژن - میزبان نشان می‌دهد که پروتئین‌های باکتری و ویروس تمایل به برهمکنش با پروتئین‌های هاب و پروتئین‌های کلیدی مسیرها در میزبان دارند. این استراتژی احتمالاً به پاتوژن اجازه می‌دهد تا کمپلکس‌های ضروری و مسیرهای دفاع حاکم بر پاسخ میزبان را کنترل و مختل نماید. بنابراین، پروتئین‌های پاتوژنی که

## بحث و نتیجه گیری

به منظور افزایش درک ما از مکانیسم‌های دفاعی درگیر در غده پستانی، آنالیز مبتنی بر شبکه بر روی ژن‌های تغییر بیان یافته در بیماری که توسط گیلبرت و همکارانش با آنالیز ریزآرایه به دست آمده انجام شد تا مکانیسم بیماری و مسیرهای درگیر در طی بروز ورم پستان و هم‌چنین ژن‌های مهم کاندیدای دارویی شناسایی گردد. در این پژوهش شبکه‌های برهمکنش پروتئین - پروتئین (PPI) به وجود آمده توسط ژن‌هایی که در بافت پستان گاو آلوده شده با لیوپلی ساکارید برگرفته از باکتری E.coli بعد از گذشت ۳ و ۶ ساعت متفاوت بیان شده‌اند با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز شبکه PPI بیماری ورم پستان شامل روش‌های آماری است که یکی از اهداف آن شناسایی پروتئین‌هایی با بیشترین برهمکنش است که به هاب معروفند. شکل ۱ و ۲ شبکه PPI از ژن‌هایی با بیان متفاوت در بافت پستان گاو آلوده شده با لیوپلی ساکارید برگرفته از باکتری E.coli را بعد از گذشت ۳ (LPS3h) و ۶ (LPS6h) ساعت را نشان می‌دهد که شبکه LPS3h حاوی ۸۴ گره (نود) و ۳۱۰ یال می‌باشد. شبکه LPS6h حاوی ۱۰۴ گره و ۵۰۹ یال است. مقایسه تغییرات بیان بین دو زمان بیانگر افزایش تغییرات در بیان ژن

مشاهده می‌شود در تعامل با پروتئین‌های میزبان هستند و در عمل‌کردهای مربوط به پاسخ میزبان دخالت دارند می‌تواند پیشنهاد اهداف باکتریایی جدیدی برای ایجاد ایمونوترابی همه جانبه ارائه دهد [۲۹]. پروتئین‌های هاب هم‌چنین در حفظ یک پارچگی شبکه و پایداری آن نقش مهمی دارند و حذف آن‌ها باعث از هم پاشیدگی شبکه می‌گردد بنابراین از واضح‌ترین کاندیدای هدف‌های دارویی این پروتئین‌ها هستند. شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین از اشتراکات دو شبکه ۳ و ۶ ساعت می‌تواند مکانیسم درگیر در بیماری و مسیرهای بیماری‌زایی را مشخص نماید که با شناخت ژن‌های مهم این مسیرها می‌تواند کمک به طراحی داروهای جدید ضد باکتریایی نماید. آنالیزهای GO که توسط نرم‌افزار ClueGo-Cluepedia انجام شده، مطابق شکل ۴ نشان می‌دهد که مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژی در حضور پاتوژن در بافت میزبان ناشی از تنظیم مثبت فعال‌سازی لنفوسیت‌ها، فرآیندهای تولید مثل ویروسی، بیوسنتز نیتریک اکساید و آپوپتوز است. فرآیندهای بیولوژیک شایع در حضور عامل بیماری‌زایی اشرشیاکلی بیانگر برهمکنش‌هایی است که منجر به پاسخ دفاعی در میزبان شده است. از طرفی مازول‌های ثابت مشاهده شده در بین دو مرحله بیماری (۳ و ۶ ساعت) بیانگر تاثیر پاتوژن بر مسیرهای مشخصی از میزبان است که در فرآیند بیماری‌زایی، التهاب و دفاع ایمنی دخالت دارند [۲۹]. مطابق شکل ۵ نیز ثابت می‌شود که مهم‌ترین عمل‌کردهای سلولی مربوط به فعالیت سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها و اتصال آن‌ها به رسپتور است. این عمل‌کردها بیانگر فعالیت سیستم دفاعی میزبان بر علیه باکتری در طی مدت اثر عامل بیماری‌زایی آن است.

بر طبق شکل ۶ می‌توان نتیجه گرفت که مهم‌ترین بخش سلولی درگیر در حضور پاتوژن فضای خارج سلولی غشای پلاسمایی است. رینالدی و همکارانش [۵] نشان دادند که عمده شبکه‌های ژنی فعال شده توسط آلودگی ایجاد شده باکتری E.coli به پاسخ ایمنی و التهابی متعلق بوده و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دارای عمل‌کرد در شیمیوتاکسیس،

فعال‌سازی لوکوسیت‌ها و سیگنالینگ در طی این آلودگی به طور چشمگیری القا شده بودند. مطالعات منتشر شده زیادی بر نقش مهمی که سلول‌های تولیدکننده شیر در فعال‌سازی و تداوم پاسخ ایمنی در غده پستان در طی آلودگی ایفا می‌کنند، اشاره داشته‌اند. در سلول‌های تولیدکننده شیر جدا شده از گونه‌های آلوده شده با E.coli و S.aureus، افزایش بیان ژن‌های مربوط به سایتوکین‌های پیش‌التهابی نظیر IL-6، IL-8، GM-CSF، TNF $\alpha$  و IL-12 در مقایسه با نمونه‌های سالم مشاهده شد. اما در زمانی که عامل ایجادکننده ورم پستان E.coli بود دامنه و سرعت پاسخ ژن‌ها بیش‌تر از زمان S.aureus بود. در سلول‌های بدنی شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان استافیلوکوکوس آرتوسی، سایتوکین‌های پیش‌التهابی، کایموکین‌ها و رسپتورهایشان به طور معنی‌داری القا شدند [۳۰]. برای مثال در سلول‌های تولیدکننده شیر نمونه‌های عفونی در مقایسه با سالم، بیان ژن‌های کایموکین (CCR8 و RANTES)، سایتوکین‌ها (IL-7 و M-CSF)، مولکول‌های معرفی‌کننده آنتی‌ژن (MHC1 و TAP2) و مولکول‌های تشخیص‌دهنده الگو (CD14 و ICAM3) افزایش بیان داشتند. این مشاهدات نشان داد که پس از تشخیص پاتوژن‌های مهاجم، سلول‌های تولیدکننده شیر قادر به آغاز سیگنال برای فراخوانی فاکتورهای سلولی دفاع ایمنی از خون به غده پستان می‌باشند.

مطالعات انجام گرفته نشان داده شد که با گذشت چندین ساعت از زمان آغاز عفونت بافت پستان متحمل تغییرات چشمگیر ترانسکریپتومی می‌شود. برای مثال، پاتوژن‌های مختلف به طور مشترک باعث ایجاد تغییراتی در مسیرهای مربوط به پاسخ‌های ایمنی و التهابی، تکثیر سلولی، آپوپتوزیس و تغییر مدل ماتریکس خارج سلولی شده‌اند. در کل، عفونت ایجاد شده در بافت پستان باعث مهار متابولیسم لیبید شده است. به نظر می‌رسد که افزایش در بیان ژن‌های TLR2 و TLR4 چند ساعت پس از ایجاد عفونت در پستان، مستقل از نوع پاتوژن‌ها اتفاق می‌افتد. القا شدن بیان این TLRها یک پدیده سیستمیک نبوده بلکه محدود به نمونه‌های عفونی



پاتوزن - میزبان در حین عفونت فراهم می‌نماید. علاوه بر این آن‌ها می‌توانند به به عنوان نقطه شروع مدل‌سازی بیولوژی سیستم‌ها در گسترش مداخلات درمانی و پیشگیری‌کننده بالقوه مهم باشند [۲۹، ۱۸].

## تشکر و قدردانی

از دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز به خاطر همکاری در جمع‌آوری اطلاعات و تدوین مقاله، قدردانی و تشکر می‌گردد. از تمامی افرادی که در جمع‌آوری و تدوین مقاله همکاری داشتند، قدردانی و تشکر می‌گردد.

## منابع

- [1] Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 2002; 164: 116-128.
- [2] Bar D, Tauer LW, Bennett G, Gonzalez RN, Hertl JA, Schukken YH, et al. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J Dairy Sci* 2008; 91: 2205-2214.
- [3] Hill A, Gyles C. *Escherichia coli* mastitis. *Escherichia coli* in domestic animals and humans 1994; 117-133.
- [4] Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 2003; 34: 475-491.
- [5] Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MV, et al. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 2010; 10: 21-38.
- [6] Loor JJ, Moyes KM, Bionaz M. Functional adaptations of the transcriptome to mastitis-causing pathogens: the mammary gland and beyond. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16: 305-322.
- [7] De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD, Paape MJ, Peelman L, Burvenich C. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2008; 39: 1-23.
- [8] Lutzow YC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, et al. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res* 2008; 4: 18.
- [9] Moyes KM, Drackley JK, Morin DE, Bionaz M, Rodriguez-Zas SL, Everts RE, et al. Gene network and pathway analysis of bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPAR $\gamma$  signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism. *BMC Genomics* 2009; 10: 542.
- [10] Rinaldi M, Li RW, Capuco AV. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 138: 267-279.

می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که تشخیص سریع پاتوزن‌ها توسط TLRها در تمامی نواحی غده پستان امری واضح است. نکته جالب توجه این است که وقتی پاتوزنی توسط TLRها شناخته می‌شود، تفاوت در مسیرهای پیام‌رسانی پایین دست بر حسب نوع پاتوزن ایجاد می‌شود. مسیرهای مربوط به پاسخ‌های ایمنی ذاتی خاص نظیر شیمیوتاکسی گلبول‌های سفید و فعال‌شدن نوتروفیل‌ها در جریان IMI فارغ از نوع پاتوزن ایجادکننده ورم پستان افزایش بیان می‌یابد. برای مثال، به ترتیب در ۱۲ و ۱۶ ساعت پس از ایجاد آلودگی با *E. coli* و *S. aureus*، بیان ژن‌های *CCL2*، *CCL4*، *CCL20*، *CXCL2* و *IL-8* که پروتئین‌های ضروری برای سرازیر شدن گلبول‌های سفید به غده پستانی را تولید می‌کنند، افزایش بیان می‌یابد. بسیاری از سیتوکین‌های پیش‌التهابی درگیر در پاسخ فاز حاد نظیر  $IL-1\beta$ ، *IL-6* و *TNF* در طی عفونت بافت پستان آپرگولیت شدند [۸، ۵]. مسیرهای پیام‌رسانی *IL-10* و *IL-6* در طی آلودگی تجربی با *S. uberis* فعال‌سازی می‌شوند [۳۰]. پاتوزن‌های مختلف پاسخ‌های ترانسکریپتومی خاصی را القا می‌نمایند. بی‌شک آگاهی پیدا کردن در خصوص بی‌همتا بودن پاسخ‌های مختص پاتوزن، طراحی واکسن و توسعه استراتژی‌های مداخله‌ای را تسهیل خواهد نمود.

از طرفی آنالیز شبکه نشان داد که مهم‌ترین فرآیند ایمنونولوژیکی که به علت حضور پاتوزن فعال شده (مطابق شکل ۷) حضور و فعالیت لنفوسیت‌ها است که در مکانیسم‌های دفاع ایمنی دخالت دارند.

بر اساس آنالیز انجام شده مهم‌ترین مسیرهای کشف شده بر اساس پایگاه KEGG در حضور پاتوزن اشرشیاکلی با عفونت‌زایی سالمونلا و ویروس آنفولانزا و هریس ویروس و تعدادی دیگر از ویروس‌ها و باکتری‌ها که در شکل ۸ نشان داده شده، هم‌چنین بیماری اتوایمیون آرتریت روماتوئید مطابقت دارد. فاکتورهای بیماری‌زایی پاتوزن‌های باکتریایی منجر به ترشح محصولات می‌شود که افزایش بقای باکتری و یا آسیب به میزبان می‌گردد. شبکه‌های کلی و محلی مربوط به خواص بیولوژیکی شناخته شده، چشم‌انداز مهمی از برهمکنش

hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 207-210.

[20] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D561-D568.

[21] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13: 2498-2504.

[22] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 2000; 25: 25-29.

[23] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plugin to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 2009; 25: 1091-1093.

[24] Hu Z, Mellor J, Wu J, DeLisi C. VisANT: an online visualization and analysis tool for biological interaction data. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 17.

[25] Zhu X, Gerstein M, Snyder M. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev* 2007; 21: 1010-1024.

[26] Milo R, Shen-Orr S, Itzkovitz S, Kashtan N, Chklovskii D, Alon U. Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* 2002; 298: 824-827.

[27] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 27-30.

[28] Dahlquist KD, Salomonis N, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR. GenMAPP, a new tool for viewing and analyzing microarray data on biological pathways. *Nature Genetics* 2002; 31: 19-20.

[29] Zoraghi R, Reiner NE. Protein interaction networks as starting points to identify novel antimicrobial drug targets. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 566-572.

[30] Tao W, Mallard B. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis of Canadian Holstein cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 120: 201-211.

[11] Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, et al. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 2010; 11: 138.

[12] Buitenhuis B, Røntved CM, Edwards SM, Ingvarstsen KL, Sørensen P. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. *BMC Genomics* 2011; 12: 130.

[13] Moyes KM, Drackley JK, Morin DE, Rodriguez-Zas SL, Everts RE, Lewin HA, Looor JJ. Predisposition of cows to mastitis in non-infected mammary glands: effects of dietary-induced negative energy balance during mid-lactation on immune-related genes. *Funct Integr Genomics* 2011; 11: 151-156.

[14] Swanson K, Stelwagen K, Dobson J, Henderson H, Davis S, Farr V, Singh K. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *J Dairy Sci* 2009; 92: 117-129.

[15] Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 2005; 31: 72-86.

[16] Sørensen AS, Tosser-Klopp G, Waddington D, Watson M, Yangq W, Zerbem H, Seyfert H-M. Analysis of the real EADGENE data set: comparison of methods and guidelines for data normalisation and selection of differentially expressed genes (open access publication). *Genet Sel Evol* 2007; 39: 633-650.

[17] Jiang L, Sørensen P, Røntved C, Vels L, Ingvarstsen KL. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. *BMC Genomics* 2008; 9: 443.

[18] Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res* 2013; 44: 1-23.

[19] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and

## Bioinformatics analysis of *E. coli* causing mastitis in Holstein dairy cattle by using microarray data

Samad VajdiHokm Abad (Ph.D Student)<sup>1</sup>, Sadegh Alijani (Ph.D)<sup>1</sup>, Hossein Daghigh Kia (Ph.D)<sup>1</sup>, Hakimeh Zali (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Soheyla Khoda Karim (Ph.D)<sup>3</sup>, Mohsen Bigdeli Pashaie (B.A)<sup>3</sup>

1- *Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran*

2- *Proteomics Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

3- *Dept. of Epidemiology, Faculty of Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

4- *Health Technology Incubator Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran*

(Received: 18 Aug 2015; Accepted: 9 Sep 2015)

**Introduction:** Mastitis is the inflammation of the mammary gland. One of its major pathogens is *Escherichia coli*. In order to develop new strategies for prevention of *E. coli* causing mastitis, it is necessary to have a clear understanding of the details and molecular mechanisms involved in host immunological responses to the pathogen. In this study by using available transcriptomic data, bioinformatics analysis of the diseases was performed.

**Materials and Methods:** The data in this study was extracted from GEO web site, based on Gilbert's microarray study on the mammary tissue transcriptome. Protein-protein interactions (PPIs) were identified by using String database and PPI networks generated by using Cytoscape software. In order to recognize and cluster the hubs based on GO, the network analysis was carried out by using ClueGO-Clue-Pedia.

**Results:** The PPI network resulted from differentially expressed genes (DEGs) in contaminated mammary tissue with *E. coli* crude lipo-polysaccharide (LPS) were determined after 3 and 6 hours. PPI network was performed from common segments of the two PPI networks. Analysis of this new network showed that genes (IL6, IFIH1, PARP14, IL1B, ISG15, GRO1IFIT3, CCL5, ICAM1, IRF9 and NOS2) had the greatest degree and function as hubs. The most significant biological processes (BP), molecular functions (MF), cellular compartments (CC), immunological system and dominant pathways based on KEGG database were identified through GO-based cluster analysis of the network.

**Conclusion:** This study suggests that expansion of pathogen presence in the host tissue would lead to the increase in the number of interactions in the hub proteins. So these proteins can be introduced as drug targets.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Mastitis bovine, Protein interaction maps, Microarray analysis, Transcriptome

\* Corresponding author. Tel: +98 21 22714248

h.zali@sbmu.ac.ir