Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Bioinformatics study of the role of micro RNAs bta-mir-146a, bta-mir-223, bta-mir 21-5p, bta-mir-181 and bta-mir-16a in the cellular signaling pathways of mastitis in dairy cows

Zahra Biranvad

Graduated phd in Animal Breeding and Genetics, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: z.biranvand1983@gmail.com

Mostafa Ghaderi-Zefrehei

*Assistant Professor, Departmant of Animal Science, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran. Email: Mosmos741@yahoo.com

Seyyed Ziaeddin Mirhoseini

*Professor, Departmant of Animal Science, College of Agriculture University of guilan, Rasht, Iran. Email: szmirhosseini@gmail.com

Seyyed Hossein Hosseini Moghaddam

Assistant Professor, Departmant of Animal Science, College of Agriculture, University of guilan, Rasht, Iran. Email: hosseinim2001@yahoo.com

Arash Fazeli

Associate Professor, Departmant of plant Science, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. Email: arashfazeli57@gmail.com

Abstract

Objective

It is reasonable to investigate the signaling pathways in diseases such as mastitis in dairy cattle, which are more likely to be affected by epigenetics.

Materials and methods

In this research, 5 microscopic RNA molecules with the accession numbers bta-mir-223, bta-mir 21-5p, bta-mir-181, bta-mir-146a and bta-mir-16a in the sources were identified

and extracted from the literatures. Using mirtarbase and targetcan databases, respectively, the confirmed and predicted target genes were extracted for each of the top microRNAs, respectively. Subsequently, the expression of the predicted and confirmed target genes for each of the top microRNAs in the mammary gland tissue was investigated at the NCBI database. In addition, using the DAVID software, cellular signaling pathways were identified in KEGG.

Results

Based on the results, bta-mir-146a microRNA through effects on of 7 proteins, and microRNA bta-mir-223 through effects on 11 proteins and micro RNA bta-mir21-5p through effects on 9 proteins, involved in various cellular signaling pathways, sought to be involved in mastitis in dairy cattle. The results also showed that two bata-mir-181 and bta-mir-16a played an important role in crucial pathways such as the GnRH signaling pathway, Estrogen signaling pathway, Progesterone-mediated oocyte maturation Oxytocin Signaling Pathway and MAPK Signaling Pathway.

Conclusions

This study shows that the microRNAs can be used as molecular markers to dissect molecular etiology of mastitis in dairy cattle.

Keywords: Bioinformatics, KEGG, Mastitis, MicroRNAs, Signaling Pathways.

Citation: Biranvad Z, Ghaderi-Zefrehei M, Mirhoseini SZ, Hosseini Moghaddam SH, Fazeli A (2019) Bioinformatics study of the role of micro RNAs bta-mir-146a, bta-mir-223, bta-mir 21-5p, bta-mir-181 and bta-mir-16a in the cellular signaling pathways of mastitis in dairy cows. Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 1-24.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 1-24.
DOI: 10.22103/jab.2019.12015.1046
Received: August 25, 2018; Accepted: February 21, 2019
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

کنکاش بیوانفورماتیکی ریزRNAهای bta-mir-146a، bta-mir- 223، bta-mir 21-، bta-mir-181، 5p و bta-mir-16a در مسیرهای پیام‌دهی سلولی ورم پستان درگاو شیری

زهرا بیرانوند

دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام ، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: z.biranvand1983@gmail.com

مصطفی قادری زفره‌یی

* نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، ایمیل: Mosmos741@yahoo.com

سید ضیا الدین میرحسینی

* نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: szmirhosseini@gmail.com

سید حسین حسینی مقدم

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: hosseinim2001@yahoo.com

آرش فاضلی

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدخ کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران، ایمیل: arashfazeli57@gmail.com

تاریخ دریافت: 1397/06/03، تاریخ پذیرش: 1397/12/02

چکیده

هدف: کنکاش مسیرهای پیام‌دهی در بیماری‌هایی مثل ورم پستان در گاو شیری که بیشتر تحت تاثیر فرایندهای فراژنتیک هستند، ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش 5 مولکول ریزRNA کاندید با شماره دسترسی‌های bta-mir- 223، bta-mir 21-5p، bta-mir-181، bta-mir-146a و bta-mir-16a در منابع شناسایی و استخراج شدند و با استفاده از پایگاه داده Mirtarbase و پایگاه داده Targetscan به ترتیب ژن‌های هدف تایید شده و پیش‌بینی شده برای هر یک از ریزRNAهای بالا استخراج شدند. سپس بیان ژن‌های هدف پیش‌بینی شده و تایید شده برای هر یک از ریزRNAهای بالا در بافت غدد پستانی در پایگاه NCBI بررسی شدند. علاوه بر این با استفاده از نرم افزار DAVID، مسیرهای پیام‌رسانی سلولی در KEGG مشخص شدند.

نتایج: بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که ریز bta-mir-146a RNA از طریق تاثیر بر 7 پروتئین، و ریز bta- RNA mir-223 از طریق تاثیر بر 11 پروتئین و ریز bta-mir 21-5p RNA از طریق تاثیر بر 9 پروتئین در مسیرهای پیام‌دهی سلولی مختلفی درگیر هستند، و لذا احتمالا در بیماری ورم پستان گاو شیری نقش دارند. همچنین نتایج نشان داد که دو ریز bta-mir-181 RNAو bta-mir-16a در مسیرهای پیام‌دهی مهمی مثل GnRH signaling pathway، Estrogen signaling pathway، Progesterone-mediated oocyte maturation، Oxytocin Signaling Pathway و MAPK Signaling Pathway نقش مهمی را بازی می‌کنند.

نتیجه گیری: این پژوهش نشان می‌دهد که ریزRNAهای مورد بررسی می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی، در علت یابی ملکولی بیماری ورم پستان گاو شیری نقش مهمی ایفا کنند.

کلمات کلیدی: بیوانفورماتیک، ریز RNA، مسیر پیام‌رسانی سلولی، ورم پستان، KEGG

مقدمه

طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد 18830 واحد صنعتی گاو داری با ظرفیت 2048563 راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال‌های 1383 تا 1387 تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (Kharrati Koopaei et al. 2011). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هر نفر برابر با 95 کیلوگرم می‌باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با 169 کیلوگرم و در اروپا برابر با 350 کیلوگرم در سال است (Kharrati Koopaei et al. 2011). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه‌ریزی شود. لذا مطالعه و بررسی عواملی که روی تولید و ترکیب شیر نقش موثری دارند اهمیتی دو چندان می‌یابد (Kharrati Koopaei et al. 2012a).

ریزRNAها زیرگروهی از RNAهای غیرکدکننده با طول 25-18 نوکلئوتید هستند که نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند: رشد، تمایز، توسعه و تکامل اندام، پاسخ به سازه‌های تنش‌زا، تومورزا1 و یا مهارکننده تومور2 دارند (Santosh et al. 2015). همچنین مشخص شده است که ریزRNA ها نقش بسیار مهمی را در تنظیم رونویسی و فرایندهای پس از رونویسی، خاموشی ژن‌ها و دمتیلاسیون DNA دارند. بررسی‌ها نشان داده است که مناطق بین ژنی3 با بیان RNAهای غیرکدکننده بیماری‌های پیچیده در ارتباط بوده و استفاده از ریزRNAها به عنوان نشانگر در تشخیص بیماری و درمان بیماری منطقی به نظر می‌رسد. زیست ساخت4 ریزRNAها در هسته و سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. این مکانیسم به این صورت است که Pri-miRNA که محصول رونویسی آنزیم RNA polII بوده، ابتدا در هسته توسط آنزیم Dorsha به pre-miRNA تبدیل می‌شود و سپس pre-miRNA توسط آنزیم Exportin5 به سیتوپلاسم منتقل می‌شود، در نهایت در سیتوپلاسم توسط آنزیم Dicer پردازش نهایی ریزRNA صورت می‌گیرد (Slezak-Prochazka et al. 2010; Maurin et al. 2012). اغلب مسیرهای پیام‌دهی سلولی5، سازوکارهایی هستند که توسط آن‌ها سلول در مورد سرنوشت خود تصمیم می‌گیرد و با دیگر سلول‌ها و محیط خود ارتباط برقرار می‌کند. مثلا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده6 یکی از مسیرهای پیام‌دهی مهم سلولی به شمار می‌رود (Rosa et al. 2016). ورم پستان یکی از مشکلات جدی اقتصادی در گله‌های گاو شیری بوده و همچنین یک بیماری پیچیده و پرهزینه است. کاهش تولید شیر، کاهش کیفیت شیر، هزینهٔ کارگر اضافی، افزایش نرخ جایگزینی گاو، هزینهٔ دامپزشک و هزینه‌های درمان همه اهمیت کنترل موثر بیماری را تقویت می‌کنند. به نظر می‌رسد که در ایران، ورم پستان تحت بالینی در کنار بیماری‌های تولیدمثلی، لنگش و احتمالاً برخی بیماری‌های شایع دیگر نظیر لوکوز و یون از مهم‌ترین خسارت‌بارترین بیماری‌هایی باشد که گله‌های گاو شیری را تهدید می‌کند (Mohammadabadi et al. 2004; Baghizadeh et al. 2009; Mohammadi et al. 2009; Ruzina et al. 2010; Kharrati koopaei et al. 2012b)، لذا مدیریت این بیماری به صورت مستقیم یا غیرمستقیم، معقول به نظر می‌آید. در بیماری‌هایی مثل ورم پستان گاو شیری، که بیشتر از فراژنتیک متاثر می‌شوند، کنکاش مسیرهای پیام‌دهی در بیمارهایی مثل ورم پستان در گاو شیری، می‌تواند به مدیریت این بیماری کمک کند (Wu et al. 2015). از سوی دیگر، اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh et al. 2013; Hadizadeh et al. 2014).

[1] Oncogene
[2] Oncomir
[3] Intergenic Region
[4] Biogenesis
[5] Signaling Pathways
[1] Apoptosis

در این راستا، اخیرا تلاش شده در قالب پژوهش‌های زیست ملکولی، مسیرهای پیام‌رسان سلولی مرتبط با ورم پستان گاو شیری را بررسی کنند. بررسی مسیر پیام‌دهی سلولی IL6/STAT3 در ورم پستان نشان داده است که این مسیر پیام‌دهی سلولی نه تنها برای تمایز بین سلول‌های پلاسما بلکه برای بقای سلول‌های پلاسما و لنفوسیت‌های T هم ضروری است. مشخص شده است که بیان مسیر پیام‌دهی سلولی IL-6/STAT3 در ورم پستان سلولی پلاسما فعال است و ممکن است نقش مهمی در بیماری‌زایی مبتلایان به ورم پستان سلولی پلاسما داشته باشد (Liu et al. 2015). در پژوهشی، ژن‌های متفاوت بیان شده در بیماری ورم پستان، در گاوهای نژاد هلشتاین چینی به وسیله تکنیک ریزآرایه Gene-Chip و آنالیز بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد 79 ژن متفاوت بیان شده با مسیر پیام‌دهی سلولی TLR4/NF-κB مرتبط بودند. همچنین مشخص شد که تفاوت میزان بیان ژن و سازوکارهای مسیر پیام‌دهی سلولی TLR4/NF-κB بر روی بیماری ورم پستان اثر دارد (Wu et al. 2015). با اندازه‌گیری میزان بیان سه مسیر پیام‌دهی سلولی IR1 ، IRS-12 و PI3K3 نشان داده شد که این مسیرهای پیام‌دهی از واسطه‌های کلیدی در مسیر پیام‌دهی انسولین در گاوهای مبتلا به بیماری تخمدان کیستیک می‌باشند و میزان بیان سه مسیر پیام‌دهی IR ، IRS-1 و PI3K در سلول‌های تکا مشابه است (Hein et al. 2015). مشخص شده است که میزان تولید mRNA سه سیتوکین مختلف (RANTES, IL8, TNFα) به وسیله فاکتور رونویسی NfkB در سلول‌های پوششی بافت پستان در زمان ابتلا به باکتری اشرشیاکلی دستخوش تغییر می‌شوند که در این راستا پیام‌دهی یکپارچه[4] سلولی و شبکه ژنی تنظیمی، سازوکارهای متمایز متفاوتی را در مسیر تنظیم سلول نشان می‌دهند که مسئول تغییرات سطوح بیانی mRNA سه سیتوکین هستند (Den Breems et al. 2014). پژوهشی روی نقش مسیر پیام‌دهی سلولی TLR45 در بیماری‌زایی ورم پستان ناشی از باکتری اشرشیاکلی در گاو انجام شد. نتایج نشان دادند که مسیر پیام‌دهی سلولی TLR4 در بیماری‌زایی ورم پستان ناشی از اشرشیاکلی نقش دارد (De Schepper et al. 2008).

از آنچه رفت مشخص شد که کنکاش نقش مسیرهای پیام‌دهی در بیماری ورم پستان در گاو شیری مورد توجه پژوهشگران واقع شده است. با وجود این می‌توان گفت به نقش عملکردی احتمالی ریزRNAها در مسیرهای پیام‌دهی سلولی در ورم پستان گاو شیری کمتر پرداخته شده است. بر این اساس بررسی نقش ریزRNAهای کاندیدی مثل bta-mir-146a، bta-mir- 223، bta-mir-21-5p، bta-mir-181 و bta-mir-16a در مسیرهای پیام‌دهی سلولی ورم پستان گاو شیری، می‌تواند تا حدودی روشنی بخش سهم فراژنتیک در ایجاد بیماری ورم پستان گاو شیری باشد. در این پژوهش به روشی منطقی و جدید سعی می‌گردد به نقش

[2] Insulin Receptor
[3] Insulin Receptor Substrate
[4] PI3K ACT Signaling Pathway
[1] integrated signaling
[2]Toll-Like Receptor-4 Signaling Pathway

احتمالی این ریزRNAها در مسیرهای پیام‌دهی سلولی ورم پستان گاو شیری پرداخته شود و مسیرهای پیام‌دهی مرتبط با آن با استفاده از منابع زیستی موجود استخراج شود.

مواد و روش‌ها

در کنکاش‌هایی که تاکنون در زمینه بررسی نقش ریزRNAها در مسیرهای پیام‌دهی سلولی انجام شده است، روال کار معمولا به این صورت بوده است که ابتدا ژن X را که می‌دانیم مثلا در ورم پستان نقش دارد، در نظر گرفته می‌شود و سپس ریزRNAهای موثر روی ژن X را استخراج می‌کنیم و ممکن است در این روش هزاران ریزRNA را پیدا کنیم که بر بیان ژن X برهم‌کنش داشته باشند. در نتیجه بررسی نقش زیستی این تعداد زیاد ریزRNA، کاری بسیار زمان‌بر و پرزحمتی خواهد بود. حتی ممکن است در این گونه موارد سردرگم شویم و شاید نتوانیم تحلیل درستی از نتایج ارائه بدهیم. مثلا ارجحیت بندی ریزRNAهای کاندید ممکن است به خاطر عملکرد زیستی تقریبا یکسانی که روی ژن هدف داشته باشند، به سختی انجام شود. در این پژوهش، به جای اینکه در ابتدا به جای تمرکز روی ژن‌های دخیل در بروز ورم پستان در گاو شیری، روی ریزRNAهای کاندیدا موثر بر ورم پستان در گاو شیری متمرکز شدیم. لذا بعد از جستجو در مقاله‌های منتشره و پایگاه‌های داده، به ترتیب به صورت ذیل عمل شد:

1. در این پژوهش 5 مولکول ریزRNA کاندید با شماره دسترسی‌های bta-mir- 223، bta-mir 21-5p، bta-mir-181، bta-mir-146a و bta-mir-16a که از مهمترین ریزRNAهایی که نقش آن‌ها در بروز ورم پستان تایید شده بودند انتخاب شدند (Li et al. 2012; Naeem et al. 2012; Gigli & Maizon , 2013; Jin et al. 2014; Lawless et al. 2014; Li et al. 2015; Wang et al. 2017; Lakhter et al. 2018; Sengar et al. 2018).

2. با استفاده از پایگاه داده‌ی Mirtarbase (http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw) ژن‌های هدف تایید شده (Validated Target Genes) ریزRNAهای مذکور را که با استفاده از الگوریتم‌های مختلف تایید شده بودند بدست آمد و نتایج به صحفه گسترده اکسل وارد شد.

3. سپس ژن‌های هدف پیش‌بینی شده (Predicted Target genes) با استفاده از پایگاه داده‌ی Targetscan (/http://www.targetscan.org) استخراج و نتایج به صحفه گسترده اکسل وارد شد. لازم به ذکر است که از پایگاه داده‌ی mirwalk (http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk) امکان پذیر بود ولی چون داده‌های این پایگاه مربوط به ژنوم انسان بود و برای اختصاصی عمل کردن به جای پایگاه Mirwalk از پایگاه Targetscan استفاده شد.

4. بیان تمامی ژن‌های هدف و پیش‌بینی شده در پایگاه NCBI در بخش unigene و زیر بخش EST PROFILES در بافت سالم و ورم پستانی گاو شیری بررسی شد و برای هر یک از ژن‌های هدف، یک فایل در صفحه اکسل گسترده شد و ژن‌های

هدفی که بیان پایین داشتند یا اصلا بیان نداشتند حذف شدند. این مرحله مشکل‌ترین بخش این پژوهش به شمار می‌رود. علت آن هم – به نظر ما – به دلیل ذیل بود. در پایگاه یاد شده، دقیقا مشخص نبود که آیا ژنی که بیان آن بالا رفته یا پایین آمده اولا ناشی از اثر کدام عامل بیماری‌زا بوده و آیا تغییر بیان ژن حاصله در راستای مواجهه با عامل بیماری‌زا بوده یا در ایجاد التهاب در پستان گاو شیری نقش داشته است!. در حالت آخر اصولا هر چه بیان ژن بالاتر باشد، میزان التهاب در بدن بیشتر می‌شود. بنابراین ما خواهان مد عملکردی بیانی پایین برای ژن هستیم. اما در مواجه با عامل بیماری‌زا، انتظار می‌رود هر چقدر بیان ژن بالاتر باشد، قدرت مواجهه دام در برابر عامل بیماری‌زا بیشتر می‌شود. در نهایت چون تصور می‌رفت که داده‌های بیانی موجود در پایگاه یاد شده، اصل از اثر عامل بیماری‌زا روی نیم‌رخ بیانی گاو شیری بوده، ژن‌های با درجه بیانی بالا انتخاب شدند.

5. شناسه ژن‌های هدف تایید شده و برآورد شده با استفاده از پایگاه DAVID (https://david.ncifcrf.gov) استخراج شدند (Huang et al. 2009).

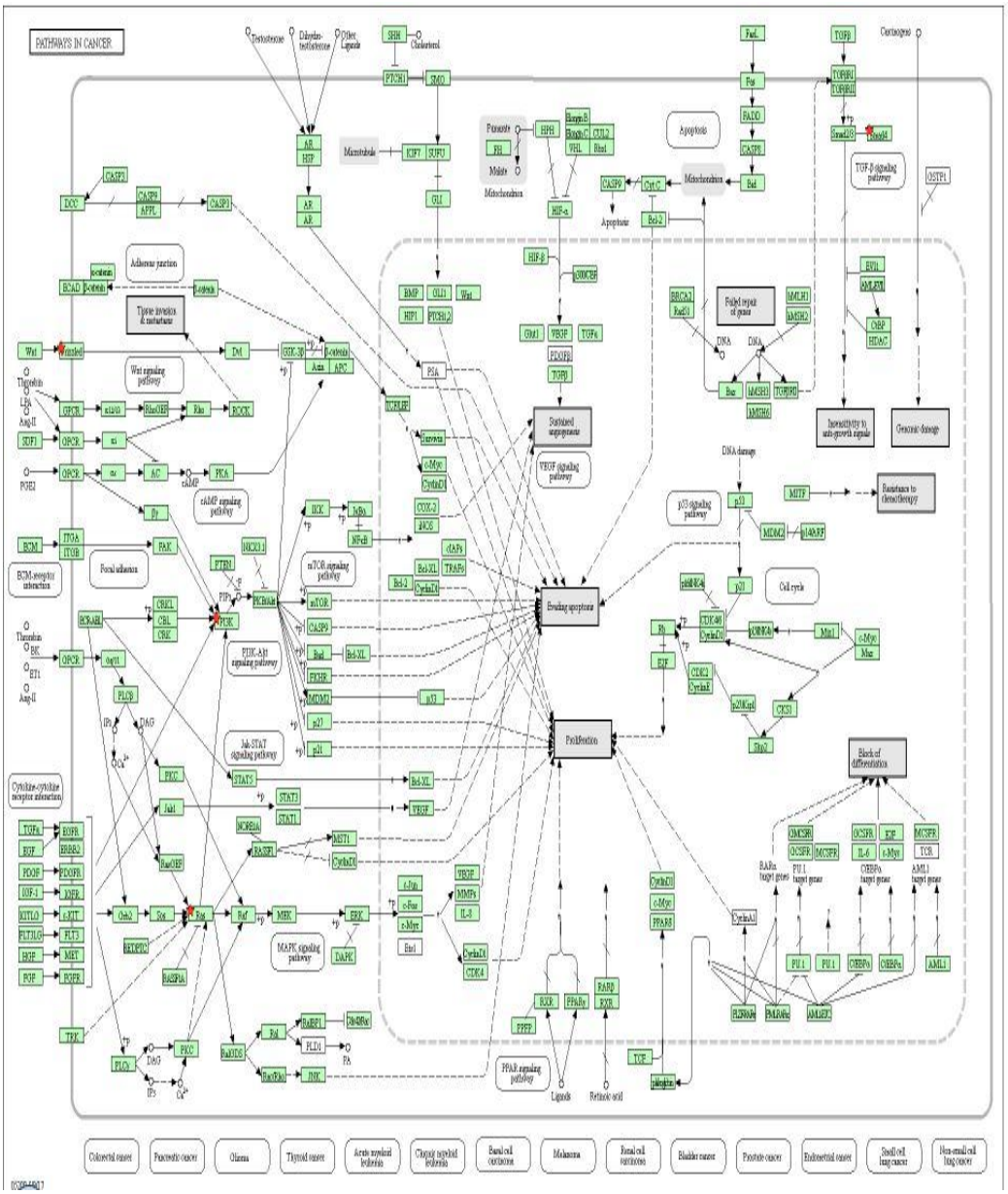
6. سپس تمامی شناسه ژن‌های بدست آمده دوباره وارد پایگاه DAVID شد و در قسمت مسیرهای پیام‌رسانی آن که متکی به KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) است، مسیرهای پیام‌دهی معنی‌دار ($p<0/05$) مرتبط با ورم پستان در گاو شیری برای هر ریزRNA بدست آمد. به این صورت عمل شد که نقش هر ریز RNA در مسیر پیام‌دهی مشخص گردد و بتوان پیشنهادات دارو و درمان و پیش‌بینی را داد.

نتایج و بحث

با توجه به روش ارایه شده، ابتدا به کنکاش مسیرهای پیام‌دهی هر یک ریزRNAها پرداخته می‌شود. حسن این روش حاضر نسبت به بررسی‌های معمول که تاکنون انجام شده است این است که در بررسی‌های معمول، اگر یک ژن را به عنوان یک زیست‌نشانگر در نظر بگیریم و به دلایلی بخواهیم تصمیم به خاموش کردن ژن بگیریم، خاموش کردن یک ژن در یک موجود کار بسیار سخت و هزینه‌بری است ولی در مورد روش مورد استفاده در این پژوهش، برای درمان ورم پستان، در ارتباط با یک ریزRNA به راحتی و با هزینه کم می‌توان آنتی آن زیست‌نشانگر را طراحی کرد. لذا در درمان بیماری‌ها و یا برای یک حالت زیستی خاص، به جای خاموش کردن یک ژن، که کار بسیار مشکل و در برخی موارد غیرممکنی می‌باشد، می‌توان از آنتی یک ریزRNA استفاده کرد.

کنکاش مسیر پیام‌دهی bta-mir-146a در بیماری ورم پستان

نتایج پژوهش نشان داد که bta-mir-146a در بیماری ورم پستان دارای ژن‌های هدف زیادی است از جمله می‌توان به ژن‌های Frizzled، RAS، PI3K و SMAD4 در مسیر پیام‌دهی سلولی سرطان ($p<0/05$) (شکل 1) و ژن‌های TLR4، PI3K ، TNFα و IRAK1 در مسیر پیام‌دهی سلولی Toll Like Receptor ($p<0/05$) (شکل 2) و ژن‌های CD3D، RAS و SLP-76 در مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌های سلولی T ($p<0/05$) (شکل 4) اشاره کرد.

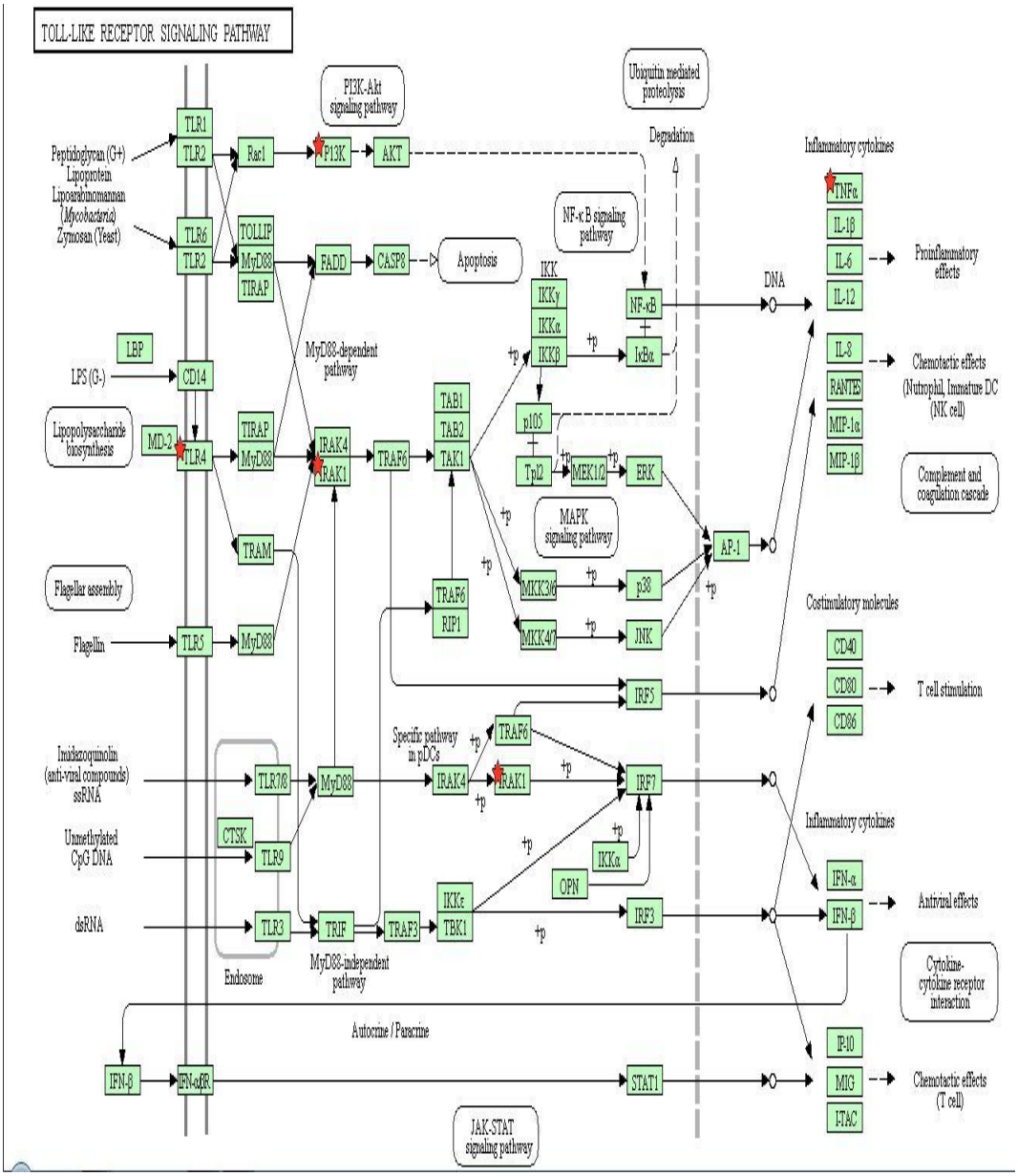


شکل1. مسیر پیام‌دهی سرطان استخراج شده از پایگاه داده DAVID. ژن‌هایی که با علامت ستاره مشخص شده‌اند ژن‌هایی هستند که ریز RNA bta mir-146a از طریق اثر روی این ژن‌ها بر روی مسیر پیام‌دهی اثر می‌کند و باعث می‌شود سازوکار عمل ژن‌ها معکوس شود

Figure 1. The cancer signaling pathway extracted from the DAVID database. The genes identified by the star sign are the genes that the microRNA bta mir-146a influences on them and therefore affects signaling pathway leading to the reversal of the mechanism of action of the genes

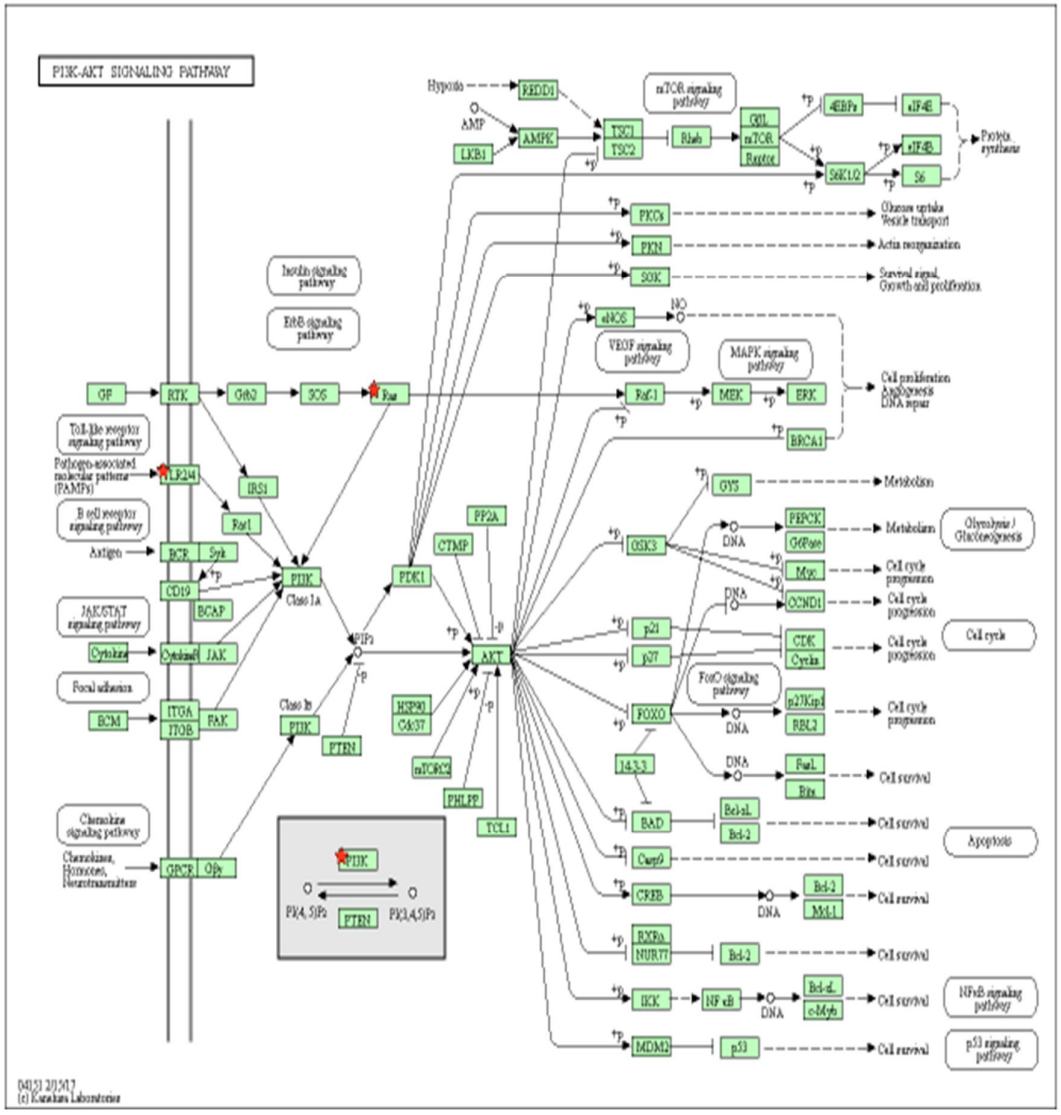
مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی - که در مکان‌های مختلف رخ می‌دهد - نوعی مرگ سلولی فعال است که به وسیله این فرایند رشد و تقسیم سلول‌ها کنترل می‌شود. ژن‌های مسئول ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به 2 دسته تقسیم می‌شوند ژن‌های ایجاد کننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و ژن‌های ممانعت کننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Rosa et al. 2016). همانطور که در شکل1 مشخص است bta mir-146a به وسیله ژن‌های Frizzled, RAS و PI3K در به تاخیر انداختن مرگ سلولی1 نقش دارد. ژن Frizzled ژنی است که وظیفه انتقال پیام‌های شیمیایی را از خارج سلول به درون هسته بر عهده دارد. ژن RAS به عنوان یک انکوژن شناخته می‌شود و این ژن در تقسیم و تمایز سلولی و در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش دارد. ژن PI3K نقش اضافه کردن اتم‌های فسفر و اکسیژن را به پروتئین‌های دیگر در فرایند فسفریلاسیون بر عهده دارد و علاوه بر آن در تنظیم برخی از هورمون‌ها و در بلوغ سلول‌های چربی نقش دارد. bta-mir- 146a از طریق اثر بر روی ژن RAS در فرایند رگ‌زایی2 نقش دارد (Duman and Voleti. 2012). از آن جا که سلول‌های سرطانی رشد سریع‌تر و کنترل نشده‌ای نسبت به سلول‌های طبیعی دارند، برخی از آن‌ها که دور از رگ‌های خونی قرار می‌گیرند دچار کمبود اکسیژن می‌شوند. از این رو شروع به فرآیند رگ‌زایی در درون و اطراف سلول‌های سرطانی می‌کنند تا اکسیژن مورد نیاز سلول‌ها را تأمین کنند (Martin. 2003). ژن SMAD4 بر روی فرایند ضد حساسیت به هورمون رشد3 نقش دارد. ژن SMAD4 بخشی از مسیر پیام‌رسانی TGFβ Signaling Pathway می‌باشد که علاوه بر نقشی که به عنوان فاکتور رونویسی در کنترل فعالیت ژن‌ها دارد به عنوان یک ژن سرکوب کننده تومور4 نیز فعالیت دارد (Yang and Yang. 2010). ژن RAS علاوه بر نقشی که در به تاخیر انداختن مرگ سلولی در مسیر پیام‌دهی سرطان بر عهده دارد، در فرایند تکثیر سلولی5 نیز نقش دارد (Duman & Voleti. 2012). مسیر پیام‌دهی دومی که متأثر از bta-mir-146a می‌باشد عبارت است از Toll-Like Receptor Signaling Pathway می‌باشد. ژن‌هایی که در این مسیر پیام‌دهی تحت تأثیر bta-mir- 146a می‌باشند ژن‌های IRAK1, PI3K, TNFα و TLR4 هستند. نحوه اثر هر چهار ژن از طریق مسیر آبشارهای تکمیلی و انعقادی6 می‌باشد. علاوه بر این ژن TLR4 از طریق فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز بر این مسیر پیام‌دهی تأثیر می‌گذارد. مسیر پیام‌رسانی سوم PI3K-Akt signaling pathway می‌باشد. که bta mir- 146a از طریق ژن‌های PI3K، TLR2/4،RAS بر این مسیر پیام‌دهی سلولی اثر می‌گذارد. ژن RAS از طریق سه فرایند چرخه سلولی، تعمیر DNA و تکثیر سلولی بر این روند تأثیرگذار است و ژن‌های PI3K،TLR2/4 از طریق فرایندهای گلیکولیز، گلوکونئوژنز، چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی اثر خود را بر این مسیر پیام‌دهی می‌گذارند.

[1] Evading Apoptosis
[1] Sustained angiogenesis
[2] Insensitivity to anti growth hormone
[3] Tumor Suppressor
[4] Proliferation
[5] Complement and coagulation cascades



شکل 2. مسیر پیام‌رسانی **Toll-Like Receptor Signaling Pathway** و ژن‌های هدف **bta mir-146a** استخراج شده از پایگاه **DAVID**

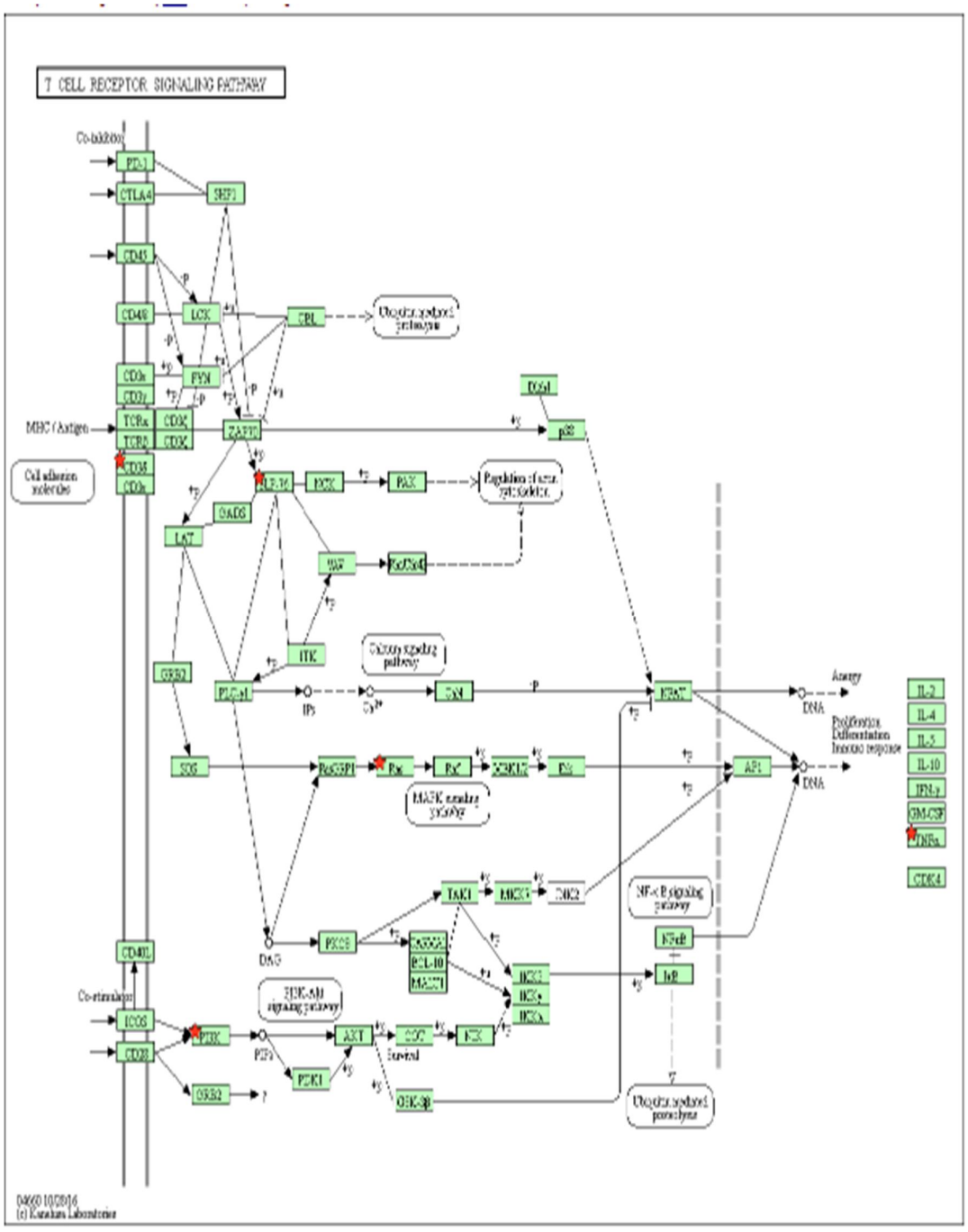
Figure 2. The Toll-Like Receptor Signaling Pathway and the bta mir-146a target genes extracted from the DAVID database



شکل 3. مسیر پیام‌رسانی PI3K-AKT Signaling Pathway و ژن‌های هدف ریز bta mir-146a RNA استخراج شده از پایگاه داده DAVID

Figure 3. PI3K-AKT Signaling Pathway and bta mir-146a target genes extracted from the DAVID database.

مسیر پیام‌دهی چهارم و آخری که تحت تأثیر bta mir-146a قرار می‌گیرد مسیر T cell receptor signaling pathway می‌باشد که اثر این ریزRNA بر این مسیر از طریق اثر بر ژن‌های PI3K، TNFa، RAS، SLP-76، CD3D می‌باشد (شکل 4). نحوه اثر این ژن‌ها از طریق فرایندهای تکثیر سلولی، تمایز و پاسخ ایمنی بر این مسیر پیام‌رسانی می‌باشد.

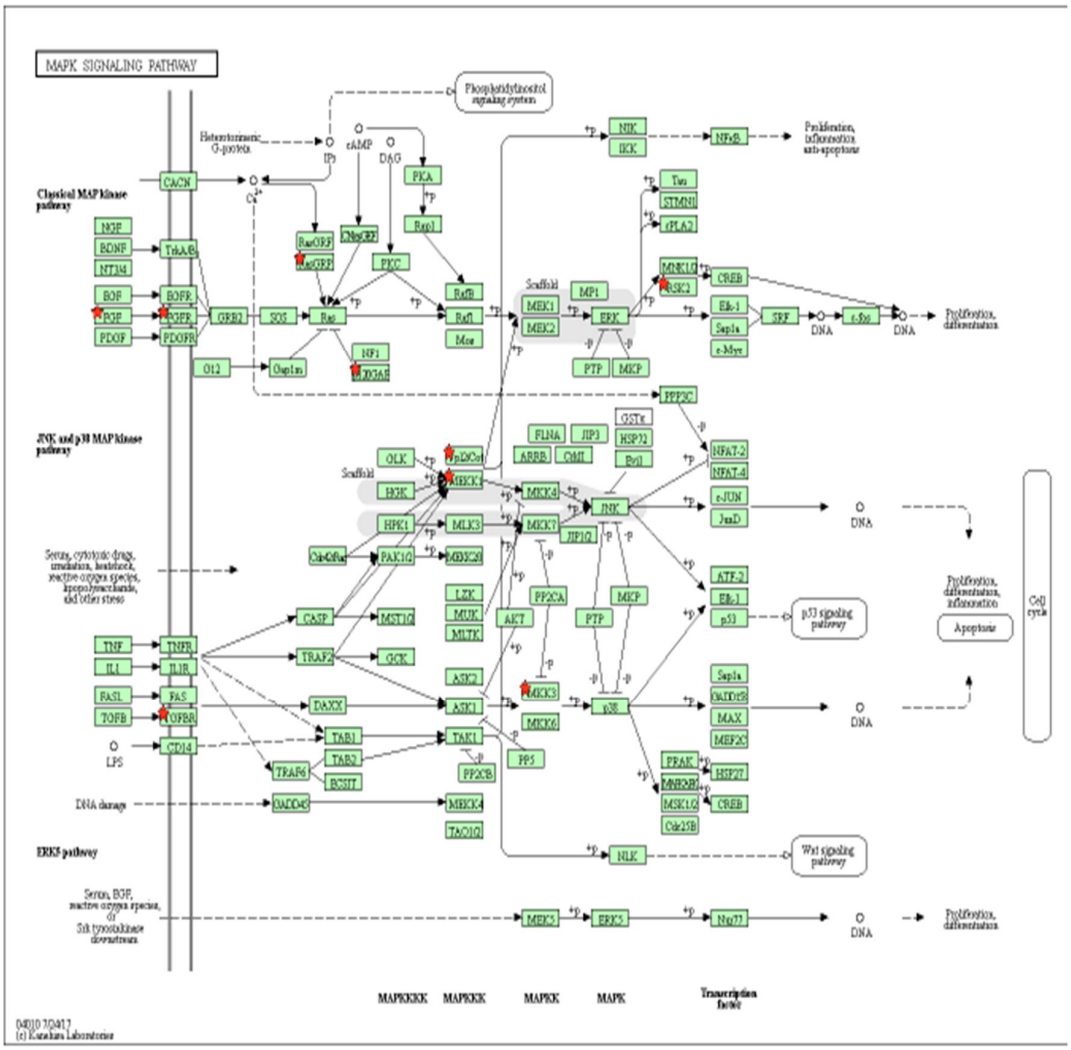


شکل 4. مسیر پیام رسانی T Cell Receptor Signaling Pathway و ژن‌های هدف bta mir-146a استخراج شده از پایگاه DAVID

Figure 4. The T Cell Receptor Signaling Pathway and the bta mir-146a target genes extracted from the DAVID database

کنکاش مسیر پیام‌دهی bta-mir- 21-5p در بیماری ورم پستان

نتایج نشان می‌دهد که bta-mir- 21-5p اثر خود را بر بیماری ورم پستان از طریق مسیر MAPK Signaling Pathway ($p<0,05$) اعمال می‌کند. نحوه اثر bta-mir-21-5p از طریق ژن‌های FGF، FGFR، RasGRP، MAP3K8،RSK2، RASA1، MAP3K1، MAP2K3 و TGFBR می‌باشد (شکل 5). تمامی این ژن‌ها از طریق فرایندهای تمایز، تکثیر سلولی، التهاب و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی اثر خود را اعمال می‌کنند.

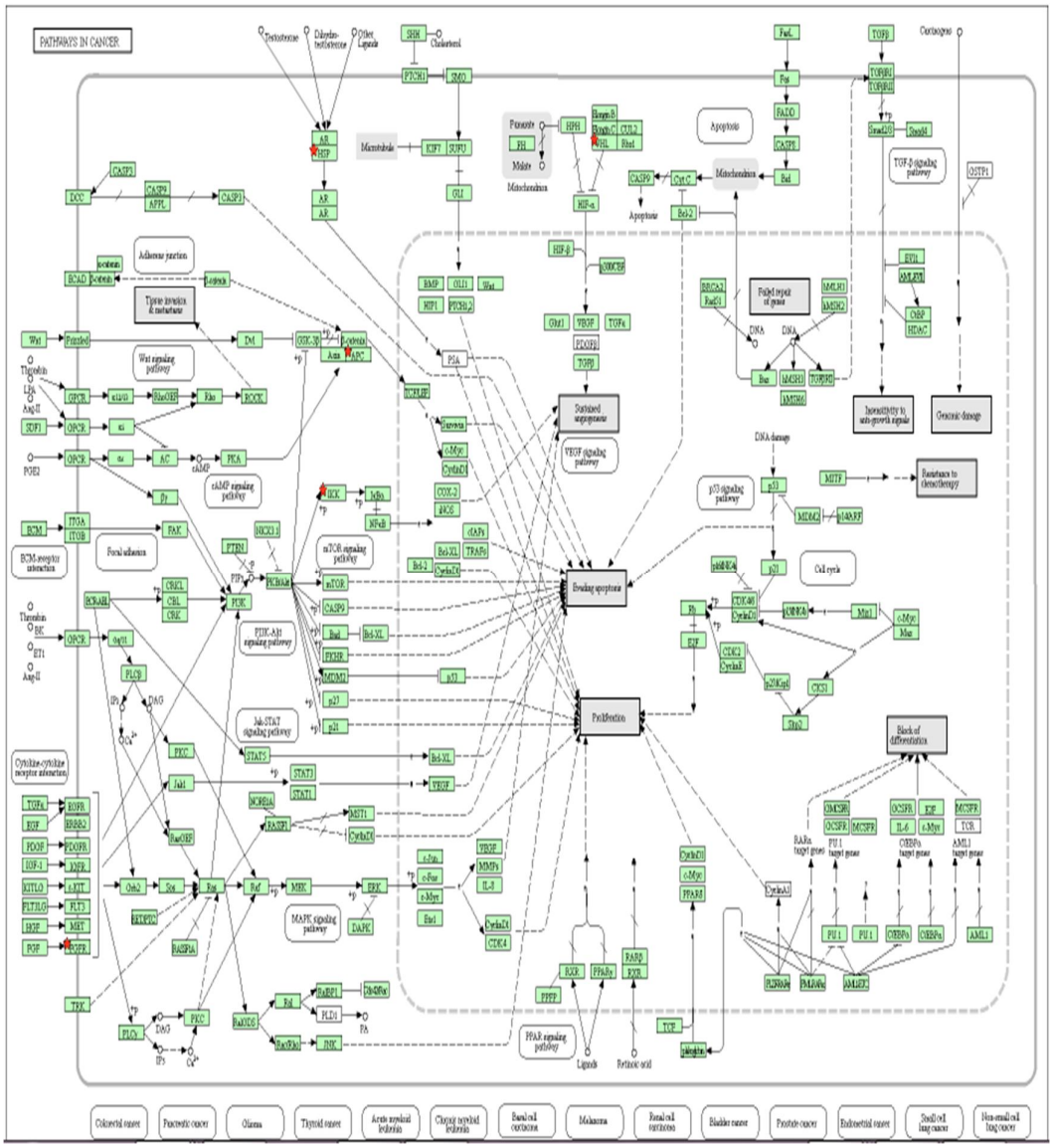


شکل 5. مسیر پیام رسانی MAPK Signaling Pathway و ژن‌های هدف bta mir-21-5p استخراج شده از پایگاه DAVID

Figure 5. The MAPK Signaling Pathway and the bta mir-21-5p target genes extracted from the DAVID database

کنکاش مسیر پیام‌دهی bta-mir- 223 در بیماری ورم پستان

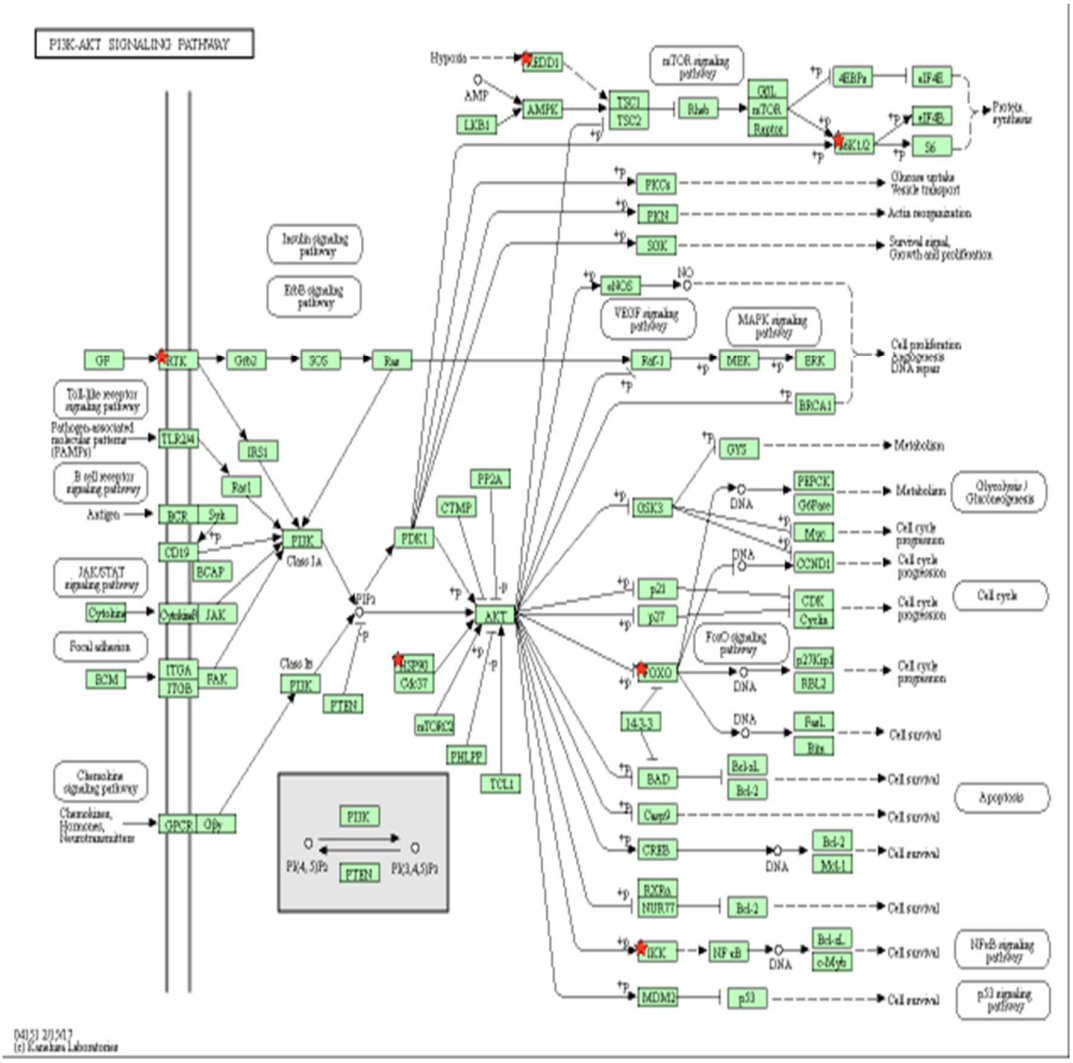
این ریزRNA اثر خود را از طریق اثر بر مسیر پیام‌دهی سرطان ($p<0,05$) از طریق ژن‌هایHSP، APC، IKK، VHL و FGFR اعمال می‌کند. FGFR از طریق فرایندهای تکثیر سلولی و به تأخیر انداختن مرگ سلولی و رگ‌زایی اثر خود را اعمال می‌کند و ژن IKK از طریق فرایند رگ‌زایی و ژن‌های HSP و APC از طریق به تأخیر انداختن مرگ سلولی و ژن VHL از طریق فرایند رگ‌زایی اثر خود را بر مسیر پیام‌دهی سرطان اعمال می‌کنند (شکل 6).



شکل 6. مسیر پیام‌دهی سرطان و ژن‌های هدف bta-mir-223 استخراج شده از پایگاه DAVID

Figure 6. The pathway in cancer and the bta-mir-223 target genes extracted from the DAVID database

مسیر پیام‌دهی دیگری که bta-mir- 223 روی آن اثر می‌گذارد، مسیر PI3K-AKT signaling pathway می‌باشد($p<0,05$) (شکل 7). ژن‌های متأثر از bta-mir- 223 در این مسیر ژن‌های IKK، HSP90، FOXO، S6K1/2، REDD1 و RTK بودند. ژن‌های S6K1/2 و REDD1 از طریق سازوکار سنتز پروتئین و ژن IKK از طریق فرایند بقای سلولی و ژن FOXO از طریق فرایندهای چرخه سلولی و تکثیر و ژن‌های HSP90 و RTK از طریق سازوکارهای متعددی مثل چرخه سلولی، گلیکولیز و گلوکونئوژنز، تکثیر سلولی، رگ‌زایی، تعمیر DNA، و مرگ سلولی کنترل شده، نقش خود را در این مسیر پیام‌رسانی اعمال می‌کنند.



شکل 7. مسیر پیام‌رسانی PI3K-AKT signaling pathway و ژن‌های هدف bta-mir-223 استخراج شده از پایگاه DAVID

Figure 7. The PI3K-AKT signaling pathway and the bta-mir-223 target genes extracted from the DAVID database

کنکاش مسیر پیام‌دهی bta-mir-181 در بیماری ورم پستان

این ریزRNA از طریق اثر بر مسیرهای پیام‌دهی متعددی نقش خود را اعمال می‌کند. فهرست این مسیرهای پیام‌رسانی و ژن‌هایی که تحت تاثیر ریزbta-mir-181 RNA از طریق سازوکارهای متفاوتی مانند مرگ سلولی کنترل شده، رگ‌زایی، تکثیر سلولی، چرخه سلولی، به تاخیر انداختن مرگ سلولی و گلیگولیز و گلوکونئوژنز اثر خود را بر مسیر پیام‌دهی اعمال می‌کنند. فهرست این مسیرها در جدول ذیل آمده است($p<0,05$) (جدول 1).

کنکاش مسیر پیام‌دهی bta-mir-16a در بیماری ورم پستان

ریزbta mir-16a RNA از طریق ژن‌های هدف زیادی که در مسیرهای پیام‌دهی سلولی نقش دارند و از طریق معکوس کردن فعالیت این ژن‌ها، اثر خود را بر بیماری ورم پستان در گاو شیری اعمال می‌کند. فهرست این مسیرهای پیام‌دهی به همراه ژن‌های هدف ریزbta-mir-16a RNA در این مسیرها در جدول شماره 2 آمده است($p<0,05$). از آنچه گذشت می‌توان نتیجه گرفت که ریزRNAهای یاد شده در مسیرهای پیام‌دهی متفاوتی اثرگذار هستند. در این میان دو ریزbta-mir-181 RNA و bta-mir-16a در مسیرهای پیام‌دهی متفاوتی درگیر بودند (جدول 1 و 2). مسیرهای پیام‌دهی تقسیم سلولی و تکثیر سلولی تقریبا توسط تمامی ریزRNA تحت تاثیر قرار گرفتند. بحث مهمی که اینجا پیش می‌آید این است که آیا این ریزRNAها نقش القا کننده بیان ژن‌ها هدف را دارند یا نقش ممانعت کننده! استخراج این عملکرد زیستی می‌تواند بر مدیریت مسیرهای پیام‌دهی یافت شده موثر باشد. مثلا چنانچه افزایش بیان یا عملکرد زیستی مسیرهای پیام‌دهی استخراج شده مطلوب باشد یا باعث مدیریت بهتر ورم پستان در گاو شیری شود و ریزRNAهای مورد بررسی، نقش افزایندگی مسیرهای پیام‌دهی یاد شده را داشته باشند، آنگاه می‌توان با با افزایش بیان این ریزRNAها، بیان مسیرهای یاد شده و به طبع آن مدیریت زیستی ورم پستان در گاو شیری را بهبود داد. بنابراین، به جای نگاه کردن به حجم انبوه ژن‌های هدف، می‌توان با دست‌ورزی چند مسیر پیام‌دهی و تعداد کمی ریزRNA، به کنکاش ورم پستان در گاو شیری پرداخت. البته پیچیدگی‌های زیستی زیاد وجود دارد که باید به وجود این پیچیدگی‌ها اذعان شود. مثلا طراحی پرایمر برای ریزRNAها خیلی سخت‌تر از طراحی پرایمر برای ژن‌های معمول است. از طرفی ممکن است در سطح بیانی هر ریزRNA در پستان یا سلول‌های درگیر بیماری ورم پستان یکسان نباشد و یا اینکه اهداف ژنی مشابه برای ریزRNAها وجود داشته باشد که تعاملات رقابتی بین ریزRNA را فراهم می‌سازد.

جدول 1. مسیرهای پیام‌رسانی تحت تاثیر bta-mir-181

Table 1. Signaling pathways affected by bta-mir-181

Signaling pathways مسیرهای پیام رسانی	P Value	Effective genes in each of the signaling pathways ژن های موثر در هر مسیر پیام رسانی
GnRH signaling pathway مسیر پیام رسانی هورمون آزادکننده گنادوتروپین ها	8.9E-3	CAMK, CAM, MEKK, MEK1/2, RAS
Estrogen signaling pathway مسیر پیام رسانی استروژن	1.6E-2	PI3K, RAS, MEK, HSP90, TF, MAPK1/3, CAM
Progesterone-mediated oocyte maturation اووسیت بالغ متشکل از پروژسترون	3.6E-2	MEK1, PI3K, CPEB, Rsk1/2, APC/C, MAPK3
Oxytocin Signaling Pathway مسیر پیام رسانی اوکسی توسین	4.0E-2	RAS, MEK1/2, CALM, CaMK, MLCK, MLCP, PI3K, MAPK1/3
Oocyte meiosis میوز اووسیت	1.1E-4	CPEB,MAPK3,MEK1, RSK1/2, PP1,APC/C, Calm,B56,KAMKII,14-3-3
PI3K-AKT Signaling pathway مسیر پیام رسانی PI3K-AKT	3.0E-4	REDD1, RAS, RTK, HSP90, ITGA, TLR2/4, ERK, MEK, S6K1/2, PTEN, PI3K, ECM, ITGB, Mcl-1, 14-3-3, PP2A
MAPK Signaling Pathway مسیر پیام رسانی MAP کیناز	7.3E-3	RSK2,ERK, MEK1, MEKK1, MKP, PDGFR, RAS, RAP1, MEKK2/3, CNasGEF, MAPK38,TGFBR
GAP junction پیوند GAP	3.8E-2	RAS, RTK, TUBB, MEKK2, MAPK1/3, MEKK1/2

تحلیل مسیرهای پیام‌دهی در گاو متکی به ژن‌های ساختاری بوده است و تحلیل ریزRNAها در این راستا کم بوده است. به عنوان مثال در این زمینه پژوهشی بر روی بیان ژن‌های دخیل در مسیر پیام‌دهی سلول‌های T در سلول‌های ایمنی بدن گاو پس از ابتلا به آنسفالوپاتی اسفنجی آمیلودوتیک گاوی[1] انجام شد. بررسی اثر این بیماری بر بیان ژن در سلول‌های ایمنی گاوهای بیمار، در مقایسه با گاوهای گروه شاهد انجام شد. نتایج نشان که از بین مسیرهای پیام‌دهی مربوط به ایمنی، ژن‌ها بیشتر تحت تأثیر مسیرهای فعال‌سازی سلول T گیرنده سلول T می‌باشند.

[1] Bovine Amylodotic Spongiform Encephalopathy

جدول 2- مسیرهای پیام‌رسانی تحت تاثیر bta-mir-16a

Table 1. Signaling pathways affected by bta-mir-16a

Signaling pathways مسیرهای پیام رسانی	P Value	Effective genes in each of the signaling pathways ژن های موثر در هر مسیر پیام رسانی
MAPK Signaling Pathway مسیر پیام رسانی MAP کیناز	1.8E-3	FGF, FGFR, NF1, Raf1, c-fos, RSK2, MNK1/2, MP1, MEK1, HSP72, PAK1/2, CrkII, NFAT-4, PP2CA, MKK3
Esterogrn Signaling Pathway مسیر پیام رسانی استروژن	3.5E-2	HSP70, Raf, MEK, TF, FKBP52, Gi/o, CAM
Oxytocin Signaling Pathway مسیر پیام رسانی اکسی توسین	3.7E-2	MEK1/2, Raf-1, NFAT, c-fos, CALM, GIRK, ROCK, MLCK, Gi/o
cGAMP-PKG Signaling Pathway مسیر پیام رسانی cGAMP-PKG	2.4E-2	NFAT, GPCR, Cam, MLCK, ROCK, MPT, Gi, MEK, Raf-1, βAR

همچنین در پژوهشی دیگر با اشاره به اهمیت بیماری ورم پستان در گاو شیری در نمونه‌های استخراج شده از بافت سالم و آلوده به عفونت، به ترتیب در 24 و 192 ساعت بعد از عفونت برای نشان دادن پاسخ فاز حاد و مرحله مزمن جمع‌آوری کردند. ژن‌های متفاوت بیان‌شده در هر مرحله تجزیه و تحلیل شدند و ژن‌های متفاوت بیان شده در 24 ساعت بعد از ابتلا به عفونت نیز با داده‌های جمع‌آوری شده از پژوهش‌های قبلی بافت‌های ورم پستانی آلوده شده با باکتری اشرشیاکلی ، که بر روی بافت پستان پس از مرگ انجام شده بود، مقایسه کردند. تجزیه و تحلیل مسیر پیام‌دهی KEGG نشان داد که 248 ژن در 13 مسیر پیام‌دهی مرتبط با پاسخ پیش ازمرحله التهاب بافت پستان نقش دارند. همچنین علاوه بر این 13 مسیر پیام‌دهی دو مسیر پیام‌دهی مهم نیز به صورت غیرمنتظره شناسایی شد: مسیر پیام‌دهی Natural killer cell mediated cytotoxicity و مسیر پیام‌دهی RIG-I-like receptor signaling pathway (Buitenhuis et al. 2011). نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که پژوهش بیوانفورماتیکی با استفاده از پایگاه‌های داده معتبری مانند MiRWalk و DAVID و NCBI و Targetscan و یافتن پروتئین‌ها یا ژن‌هایی که در ارتباط با نقش ریزRNAهای مورد بررسی در این پژوهش دارند و مسیر پیام‌دهی سلولی را از حالت طبیعی خارج می‌کنند و به سمت بیماری سوق می‌دهند، می‌تواند در مدیریت ورم پستان گاو شیری مهم باشد. در این راستا، این پژوهش رایانه‌پایه، ریزRNAهای را به عنوان زیست نشانگرهای مهمی در مدیریت زیستی بیماری ورم پستان در گاو شیری معرفی می‌کند. نتایج این پژوهش رایانه‌پایه با نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه نقش ریزRNAها در بیماری ورم‌پستان همخوانی دارد. به عنوان مثال

در پژوهشی نقش ریزRNAهای مختلف در بیماری ورم پستان بررسی شد. نتایج نشان داد bta-mir-223 در بروز بیماری ورم پستان موثر می‌باشد (Li et al. 2012). همچنین نقش ریزRNAهای مختلف در بیماری ورم پستان ناشی از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی شد. نتایج پژوهش نقش bta-mir-21-5p را در بیماری ورم پستان تایید کرد (Jin et al. 2014). نقش ریزRNAهای bta mir-146a، bta mir- 223، bta mir 21-5p، bta mir-181, و bta mir-16a را در بیماری ورم پستان گاو تایید شده است (Naeem et al. 2012). میزان بیان ریزRNAهای مختلف در دوره شیردهی و بیماری ورم پستان اندازه‌گیری شده است. نتایج نشان‌دهنده کاهش میزان بیان ریزbta mir-16a RNA در بیماری ورم پستان و افزایش میزان بیان ریزbta-mir-223 RNA در بیماری ورم پستان و در دوره شیردهی می‌باشد (Gigli & Maizon. 2013). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان‌دهنده نقش ریزRNAهای bta-mir-146a، bta-mir-223، bta-mir-21-5p، bta-mir-181 و bta-mir-16a از طریق اثر بر روی ژن‌های مختلف موجود در مسیرهای پیام‌دهی سلولی در سازوکارهای مرگ سلولی کنترل شده، رگ‌زایی، تکثیر سلولی، چرخه سلولی، به تاخیر انداختن مرگ سلولی و گلیگولیز و گلوکونئوژنز در بیماری ورم پستان می‌باشد. این روش بررسی و پژوهش ریزRNAها به صورت بیوانفورماتیکی و استفاده از پایگاه‌های داده معتبر زیستی و یافتن پروتئین‌ها و ژن‌هایی که نقش مهمی در ارتباط با ریزRNAهای کاندید زیستی دارند، روشی نو در پژوهش‌هایی از این دسته محسوب می‌شود.

نتیجه گیری

آنچه که مسلم است نگاه مسیر پیام‌دهی محور نسبت به نگاه ژن و حتی مجموعه ژن[1] محور، می‌تواند هم میزان پیچیدگی زیستی موجود در برهم‌کنش‌های ملکولی در بیماری ورم پستان بهتر آشکار کند و هم مدیریت زیستی آن را راحت‌تر کند. امروزه ورم پستان جز سه بیماری است که در گله‌ها ضررهای اقتصادی فراوانی به بار می‌آورد. ورم پستان در تمام پستان‌داران وجود دارد اما به دلیل استرس شیردوشی که به گاو وارد می‌شود، این بیماری بیشتر در گاو مطرح می‌باشد ضررهای اقتصادی ناشی از ورم پستان تنها مربوط به هزینه‌های درمانی و دامپزشکی، کاهش تولید شیر و بیرون ریختن شیر به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک درمانی نبوده بلکه حذف دام مبتلا نیز می‌تواند ضرر اقتصادی بزرگی محسوب شود. در پژوهش‌های مربوط به بیماری ورم پستان آنچه که معقول و منطقی به نظر می‌رسد این است که بهتر است ریزRNAها پایه اصلی پژوهش‌های بررسی ورم پستان قرار گیرند. در سالیان اخیر استفاده از ریزRNAها به عنوان زیست‌نشانگر در درمان بسیاری از بیماری‌ها به شدت رواج یافته است. در این پژوهش، بررسی ریزRNAهای مورد بررسی، مسیرهای پیام‌دهی را آشکار کرد که با کنکاش بهتر آن می‌توان هم در جهت تعاریف اهداف دارویی قدم برداشت و هم آن دسته از ژن‌هایی که اهمیت بالاتری در مسیرهای زیستی دارند را در مدل‌های اصلاح نژاد به کار برد و به این صورت سعی شود که وقوع ورم پستان کم شود.

[1] Gene Set

منابع

خراتی‌کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا و همکاران (1390) تغییرات ژنتیکی ژن DGAT1 و ارتباط آن با تولید شیر در جمعیت گاو هولشتاین ایران. مجله علمی پژوهشی ایران 3(2)، 185-192 .

خراتی‌کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا، ترنگ علی‌رضا و همکاران (1391) بررسی ارتباط بین تغییرات آلل ژن DGAT1 با ورم پستان در گاوهای هولشتاین ایران. مجله ژنتیک نوین 7(1)، 104-101.

هادی‌زاده مرتضی، محمدآبادی محمدرضا، نیازی علی و همکاران (1392) استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک برای مطالعه اگزون 2 ژن GDF9 در بز های تالی و بی‌تال. مجله ژنتیک نوین 8 (334)، 283-288.

هادی‌زاده مرتضی، نیازی علی، محمدآبادی محمدرضا و همکاران (1392) تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک از اگزون 2 ژنBMP15 در بزهای تالی و بی‌تال. ژنتیک نوین 9(1)،117-120.

References

Baghizadeh A, Bahaaddini M, Mohamadabadi MR, Askari N (2009) Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere Goat. American-Eurasian J Agric Environ Sci 6, 454-459.

Buitenhuis B, Røntved CM, Edwards SM et al. (2011) In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine Escherichia coli-mastitis. BMC Genomics 12, 130-142.

De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD et al. (2008) The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of Escherichia coli mastitis in dairy cattle. Vet Res 39, 1-23.

Den Breems NY, Nguyen LK, Kulasiri D (2014) Integrated signaling pathway and gene expression regulatory model to dissect dynamics of Escherichia coli challenged mammary epithelial cells. Bio Systems 126, 27-40.

Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. Trends Neurosci 35, 47–56.

Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A et al. (2013). Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. Modern Genet J 8, 283-288 (In Persian).

Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad Abadi MR et al. (2014). Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genet J 9, 117-120 (In Persian).

Hein G, Panzani C, Rodríguez F et al. (2015) Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. Anim Reprod Sci 156, 64-74.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols 4, 44-57.

Gigli I, Maizon DO (2013) MicroRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. Genet Mol Biol 36, 465-474.

Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G et al. (2014) Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. BMC genomics 15, 181-192.

Kharrati Koopaei H, Mohammad Abadi MR, Ansari Mahyari S et al. (2012a) Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. Anim Sci Papers Report 30, 231-240.

Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mehyari S et al. (2011) Genetic Variation of DGAT1 gene and its association with milk production in Iranian Holstein cattle breed population. Iran J Anim Sci Res 3, 185-192 (In Persian).

Kharrati koopaei H, Mohammadabadi MR, Tarang A et al. (2012b) Study of the association between the allelic variations in DGAT1 gene with mastitis in Iranian Holstein cattle. Modern Genet J 7, 101-104 (In Persian).

Lakhter AJ, Pratt RE, Moore RE et al. (2018) Beta cell extracellular vesicle miR-21-5p cargo is increased in response to inflammatory cytokines and serves as a biomarker of type 1 diabetes. Diabetilogia 61, 1124-1134.

Lawless N, Reinhardt TA, Bryan K et al. (2014) MicroRNA regulation of bovine monocyte inflammatory and metabolic networks in an in vivo infection model. G3: Gene Genome Genet 4, 957-971.

Li L, Huang J, Zhang X et al. (2012) One SNP in the 3′-UTR of HMGB1 gene affects the binding of target bta-miR-223 and is involved in mastitis in dairy cattle. Immunogenet 64, 817-824.

Li R, Zhang CL, Liao XX et al. (2015) Transcriptome MicroRNA Profiling of Bovine Mammary Glands Infected with Staphylococcus aureus. International J Mol Sci 16, 4997-5013.

Liu Y, Zhang J, Zhou YH et al. (2015) IL-6/STAT3 signaling pathway is activated in plasma cell mastitis. International J Clinic Experiment Pathol 8, 12541–12548.

Martin G S. (2003) Cell signaling and cancer. Cancer cell 4, 167-174.

Maurin T, Cazalla D, Yang JS et al. (2012) RNase III-independent microRNA biogenesis in mammalian cells. RNA 18, 2166-2173.

Mohammadabadi MR, Shaikhaev GO, Sulimova GE et al (2004) Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in Yaroslavsl, Mongolian and black pied cattle by PCR. Cell Mol Biol Letter 9, 766-768.

Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M (2011) Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. Genet Mol Res 10, 2658-2663.

Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J et al. (2009) Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bos indicus). Russ J Genet 45, 198-202.

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

Ruzina MN, Shtyfurko TA, Mohammadabadi MR et al. (2010) Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. Russ J Genet 46, 456-463.

Rosa RD, Capelli-Peixoto J, Mesquita RD et al. (2016) Exploring the immune signaling pathway-related genes of the cattle tick Rhipicephalus microplus: from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. Develop Comparative Immunol 59, 1-14.

Santosh B, Varshney A, Yadava PK (2015) Noncoding RNAs: biological functions and applications. Cell Biochem Function 33, 14-22.

Sengar GS, Deb R, Singh U et al. (2018) Identification of differentially expressed microRNAs in Sahiwal (Bos indicus) breed of cattle during thermal stress. Cell Stress Chaperones 23,1019-1032.

Slezak-Prochazka I, Durmus S, Kroesen BJ, van den Berg, A (2010) MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. RNA 16, 1087-1095.

Wang XP, Luoreng ZM, Zan LS et al. (2017) Bovine miR-146a regulates inflammatory cytokines of bovine mammary epithelial cells via targeting the TRAF6 gene. J Dairy Sci 100, 7648-7658.

Wu J, Li L, Sun Y et al. (2015) Altered molecular expression of the TLR4/NF-κB signaling pathway in mammary tissue of Chinese Holstein cattle with mastitis. PloS One 10, 1-16.

Yang G, Yang X (2010) Smad4-mediated TGF-β signaling in tumorigenesis. International J Biol Sci 6, 1-8.