

**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](mailto:z.biranvand1983@gmail.com)

**Mostafa Ghaderi-Zefrehei**

\*Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran. Email: [Mosmos741@yahoo.com](mailto:Mosmos741@yahoo.com)

**Seyyed Ziaeddin Mirhoseini**

\*Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture University of guilan, Rasht, Iran. Email: [szmirhosseini@gmail.com](mailto:szmirhosseini@gmail.com)

**Seyyed Hossein Hosseini Moghaddam**

Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of guilan, Rasht, Iran. Email: [hosseinim2001@yahoo.com](mailto:hosseinim2001@yahoo.com)

**Arash Fazeli**

Associate Professor, Department of plant Science, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. Email: [arashfazeli57@gmail.com](mailto: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 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 bta-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-21، bta-mir-223، bta-mir-146a

bta-mir-16a و bta-mir-181، 5p در مسیرهای پیام‌دهی سلولی ورم پستان در گاو

### شیری

زهرا بیرانوند

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

مصطفی قادری زفره‌یی

\* نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، ایمیل:

[Mosmos741@yahoo.com](mailto:Mosmos741@yahoo.com)

سید ضیا الدین میرحسینی

\* نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل:

[szmirhosseini@gmail.com](mailto:szmirhosseini@gmail.com)

سید حسین حسینی مقدم

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: [hosseini2001@yahoo.com](mailto:hosseini2001@yahoo.com)

آرش فاضلی

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران، ایمیل: [arashfazeli57@gmail.com](mailto: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 ریز RNA 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 ریز RNAهای بالا استخراج شدند. سپس بیان ژن‌های هدف پیش‌بینی شده و تایید شده برای هر یک از ریز RNAهای 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-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 احتمالاً در بیماری ورم پستان گاو شیری نقش دارند. همچنین نتایج نشان داد که دو ریز bta-mir-181 و bta-mir-16a در مسیرهای پیام‌دهی مهمی مثل GnRH signaling pathway، Estrogen signaling pathway، Progesterone-mediated oocyte maturation pathway، Oxytocin Signaling Pathway و MAPK Signaling Pathway نقش مهمی را بازی می‌کنند.

**نتیجه گیری:** این پژوهش نشان می‌دهد که ریز RNAهای 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 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 اهمیت 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، تومورزا<sup>1</sup> و یا مهارکننده تومور<sup>2</sup> دارند (Santosh et al. 2015). همچنین مشخص شده است که ریزRNAها 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 ژنی<sup>3</sup> 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 ساخت<sup>4</sup> ریزRNAها در هسته و سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. این مکانیسم به این صورت است که Pri-miRNA که محصول رونویسی آنزیم RNA polIII 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 سلولی<sup>5</sup>، سازوکارهایی هستند که توسط آن‌ها سلول در مورد سرنوشت خود تصمیم می‌گیرد و با دیگر سلول‌ها و محیط خود ارتباط برقرار می‌کند. مثلاً مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده<sup>6</sup> 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، هزینه کارگر اضافی، افزایش نرخ جایگزینی گاو، هزینه 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. 2012b; 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).

<sup>1</sup> Oncogene

<sup>2</sup> Oncomir

<sup>3</sup> Intergenic Region

<sup>4</sup> Biogenesis

<sup>5</sup> Signaling Pathways

<sup>6</sup> Apoptosis

در این راستا، اخیراً تلاش شده در قالب پژوهش‌های زیست‌ملکولی، 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 پلازما بلکه برای بقای سلول‌های پلازما و لنفوسیت‌های T هم ضروری است. مشخص شده است که بیان مسیر پیام‌دهی سلولی IL-6/STAT3 در ورم پستان سلولی پلازما فعال است و ممکن است نقش مهمی در بیماری‌زایی مبتلایان به ورم پستان سلولی پلازما داشته باشد (Liu et al. 2015). در پژوهشی، ژن‌های متفاوت بیان شده در بیماری ورم پستان، در گاوهای نژاد هلستاین 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 NfκB در سلول‌های پوششی بافت پستان در زمان ابتلا به باکتری اشرشیاکلی دستخوش تغییر می‌شوند که در این راستا پیام‌دهی یکپارچه 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-223، bta-mir-146a، bta-mir-16a و bta-mir-181، mir-21-5p 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

<sup>2</sup> Insulin Receptor

<sup>3</sup> Insulin Receptor Substrate

<sup>4</sup> PI3K ACT Signaling Pathway

<sup>1</sup> integrated signaling

<sup>2</sup>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 معمولاً به این صورت بوده است که ابتدا ژن X را که می‌دانیم مثلاً 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 پرهزینه خواهد بود. حتی ممکن است در این گونه موارد سردرگم شویم و شاید نتوانیم تحلیل درستی از نتایج ارائه بدهیم. مثلاً ارجحیت بندی ریزRNAهای کاندید ممکن است به خاطر عملکرد زیستی تقریباً 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. 2018; Sengar et al. 2018; Wang et al. 2017; Lakhter et al. 2018; Li et al. 2015).

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 صفحه 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 صفحه 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 اولاً 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 اصولاً هر چه بیان ژن بالاتر باشد، میزان التهاب در بدن بیشتر می‌شود. بنابراین ما خواهان مد عملکردی بیانی پایین برای ژن هستیم. اما در مواجهه 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 ریز RNA 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.

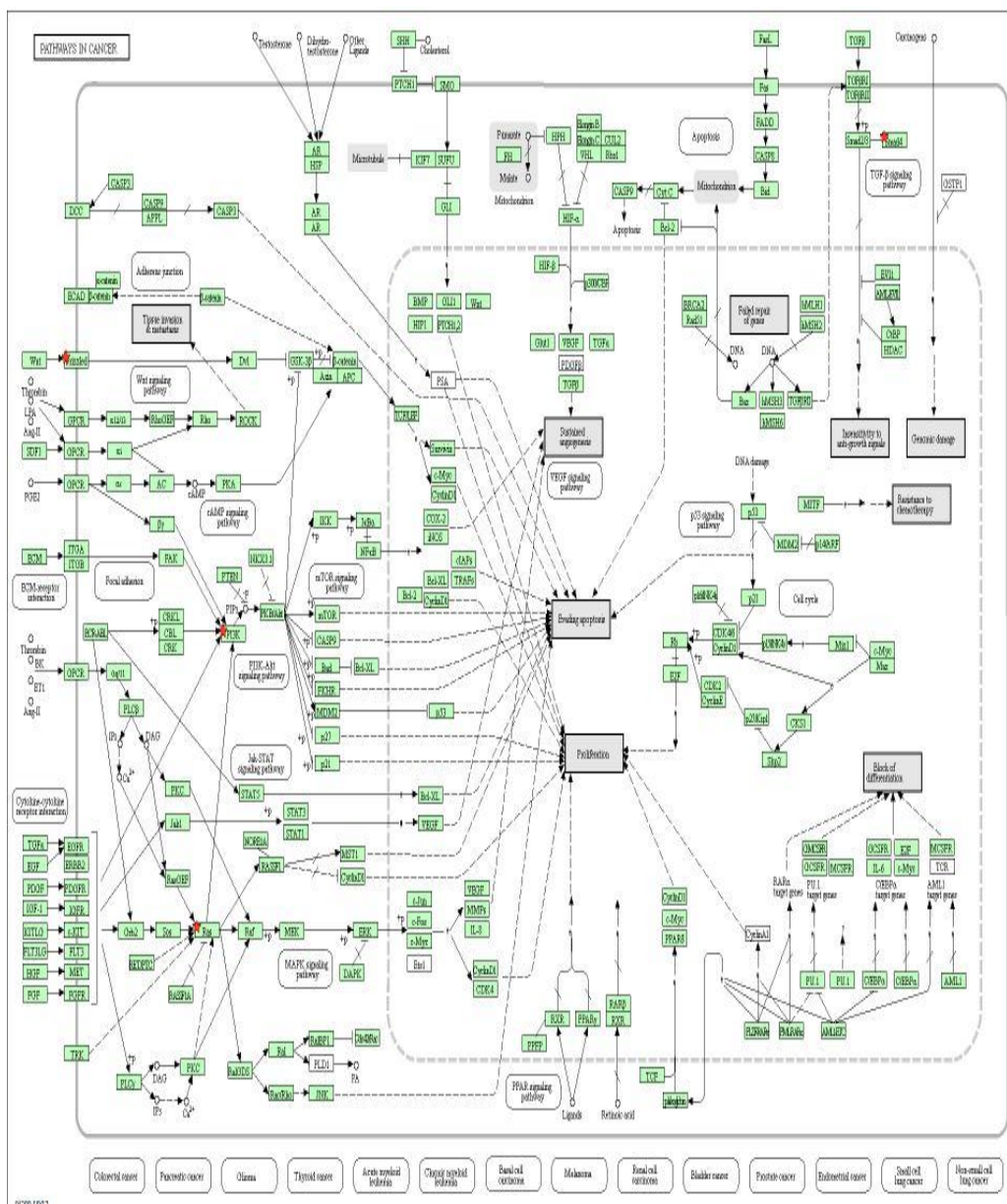
## نتایج و بحث

با توجه به روش ارایه شده، ابتدا به کنکاش مسیرهای پیام‌دهی هر یک ریز RNAها 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 ریز RNA 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 ریز RNA 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, TNF $\alpha$  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.





شکل 1. مسیر پیامدهی سرطان استخراج شده از پایگاه داده DAVID. ژن‌هایی که با علامت ستاره مشخص شده‌اند ژن‌هایی هستند که ریز bta mir-146a RNA 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 شکل 1 مشخص است bta mir-146a به وسیله ژن‌های Frizzled, RAS و PI3K در به تاخیر انداختن مرگ سلولی<sup>1</sup> 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 رگ‌زایی<sup>2</sup> 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 فرایند 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 رشد<sup>3</sup> 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 تومور<sup>4</sup> 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 سلولی<sup>5</sup> 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 انعقادی<sup>6</sup> 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 تأثیر گذار است و ژن‌های PI3K, TLR2/4 از طریق فرایندهای گلیکولیز، گلوکونوژنز، چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی اثر خود را بر این مسیر پیام‌دهی می‌گذارند.

<sup>1</sup> Evading Apoptosis

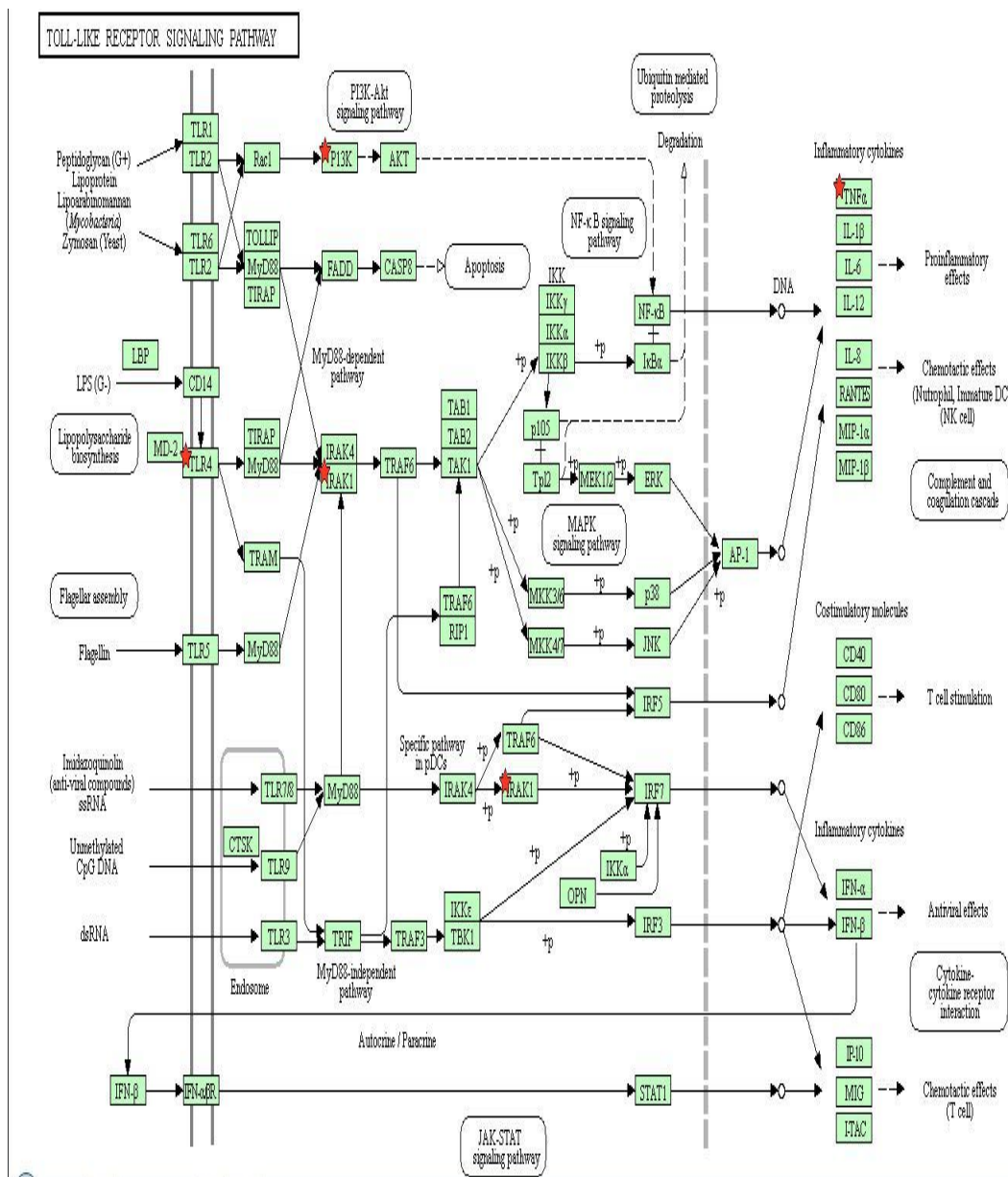
<sup>1</sup> Sustained angiogenesis

<sup>2</sup> Insensitivity to anti growth hormone

<sup>3</sup> Tumor Suppressor

<sup>4</sup> Proliferation

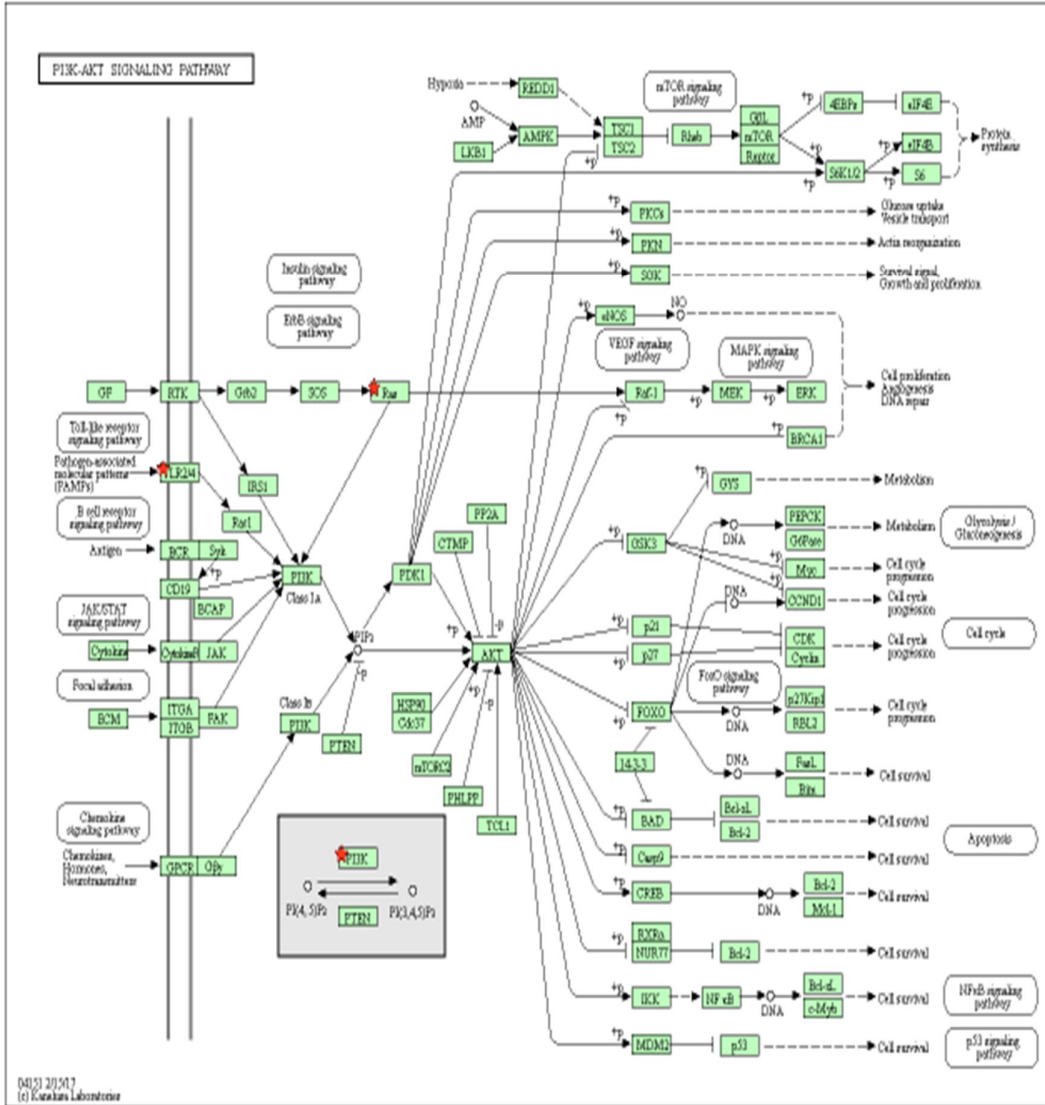
<sup>5</sup> Complement and coagulation cascades



شکل 2. مسیر پیام‌رسانی Toll-Like Receptor Signaling Pathway و ژن‌های هدف bta mir-146a

استخراج شده از پایگاه DAVID

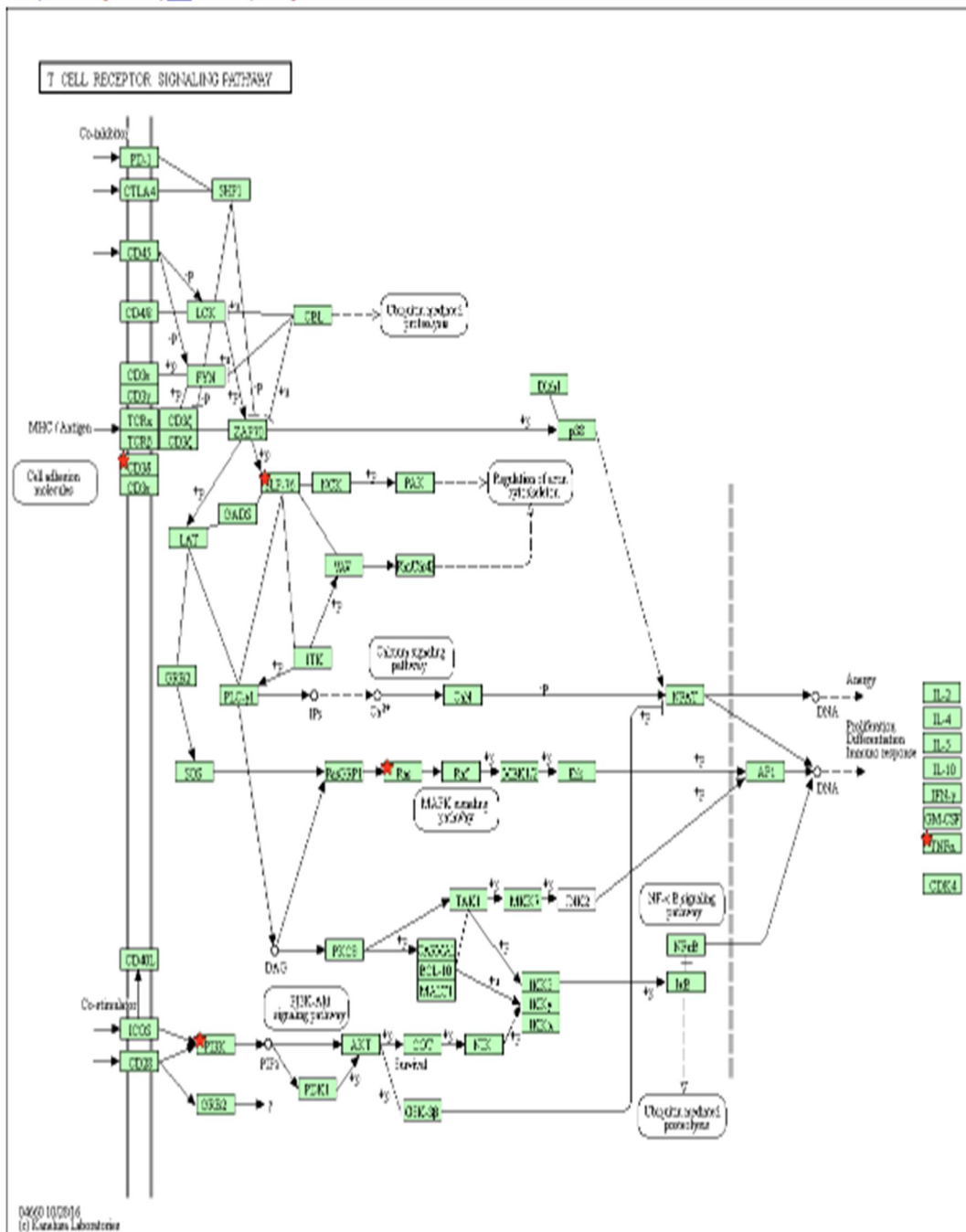
Figure 2. The Toll-Like Receptor Signaling Pathway and the bta mir-146a target genes extracted from the DAVID database



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 ریز RNA بر این مسیر از طریق اثر بر ژن‌های CD3D, SLP-76, RAS, TNFα, PI3K می‌باشد (شکل 4). نحوه اثر این ژن‌ها از طریق فرایندهای تکثیر سلولی، تمایز و پاسخ ایمنی بر این مسیر پیام‌رسانی می‌باشد.

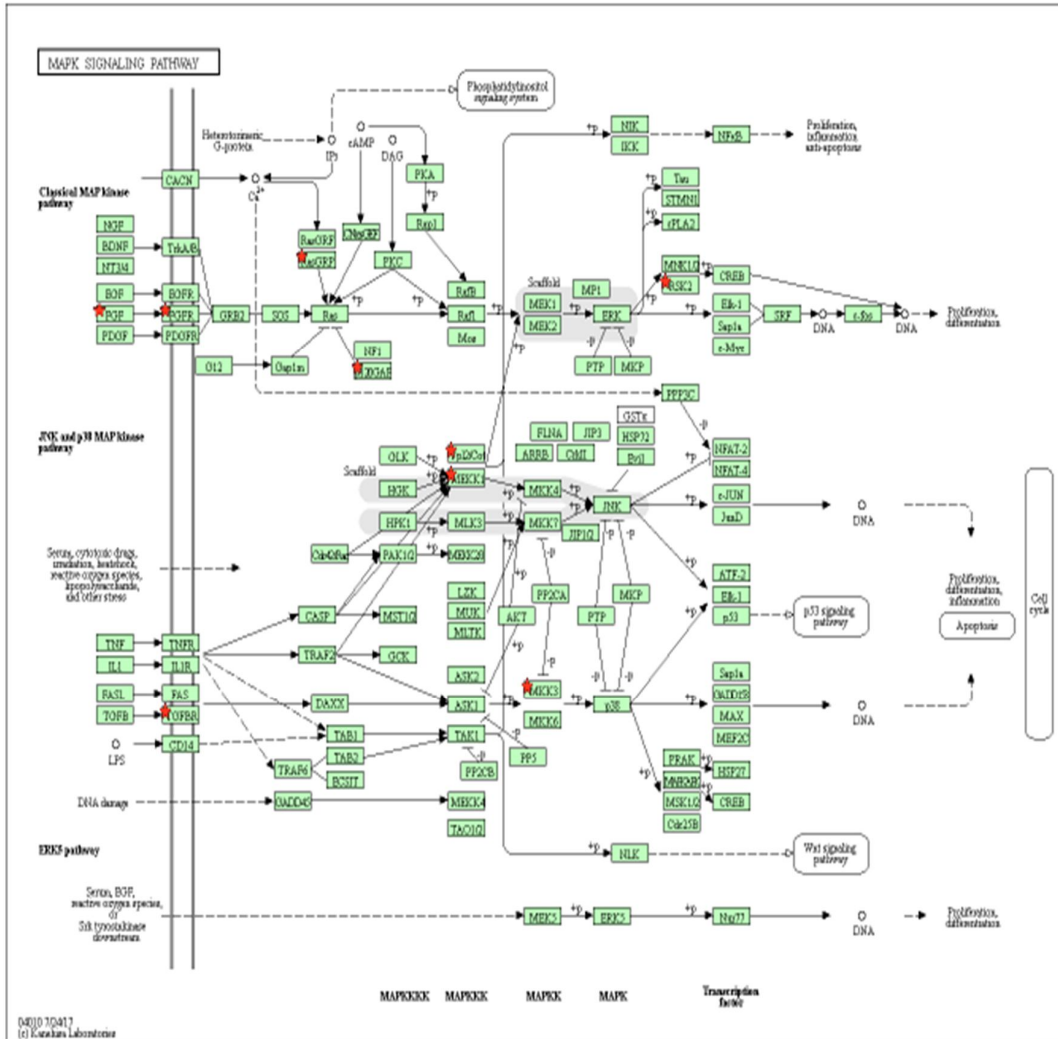


شکل 4. مسیر پیام رسانی T Cell Receptor Signaling Pathway و ژن‌های هدف bta mir-146a استخراج شده از پایگاه DAVID

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 اعمال می‌کند. نحوه اثر bta-mir-21-5p از طریق ژن‌های FGFR, FGF, RasGRP, Ras, MAP3K8, RSK2, MAP3K1, RASA1 و MAP2K3 و TGFBR می‌باشد (شکل 5). تمامی این ژن‌ها از طریق فرایندهای تمایز، تکثیر سلولی، التهاب و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی اثر خود را اعمال می‌کنند.



شکل 5. مسیر پیام‌رسانی MAPK Signaling Pathway و ژن‌های هدف bta mir-21-5p استخراج شده

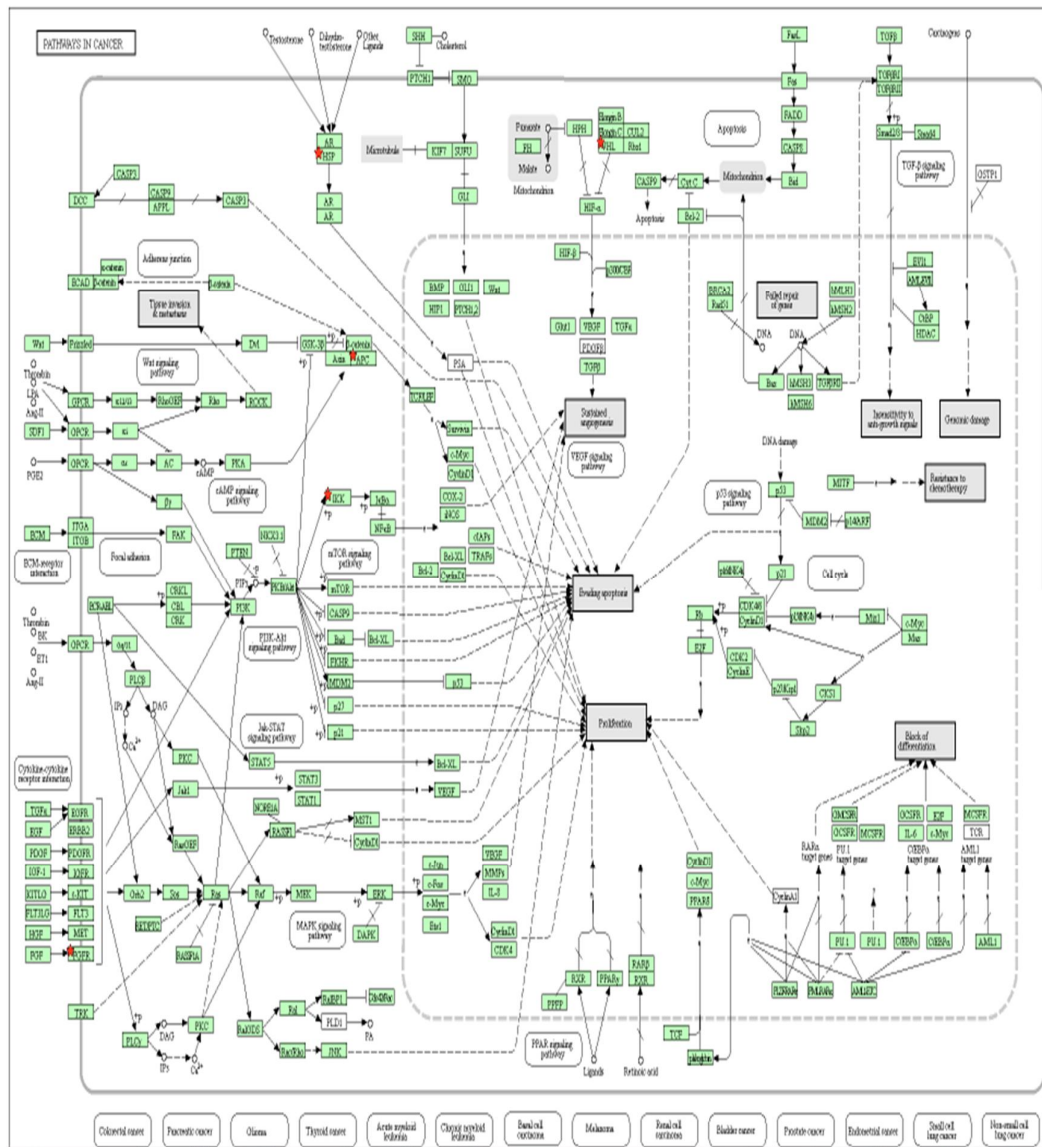
از پایگاه DAVID

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

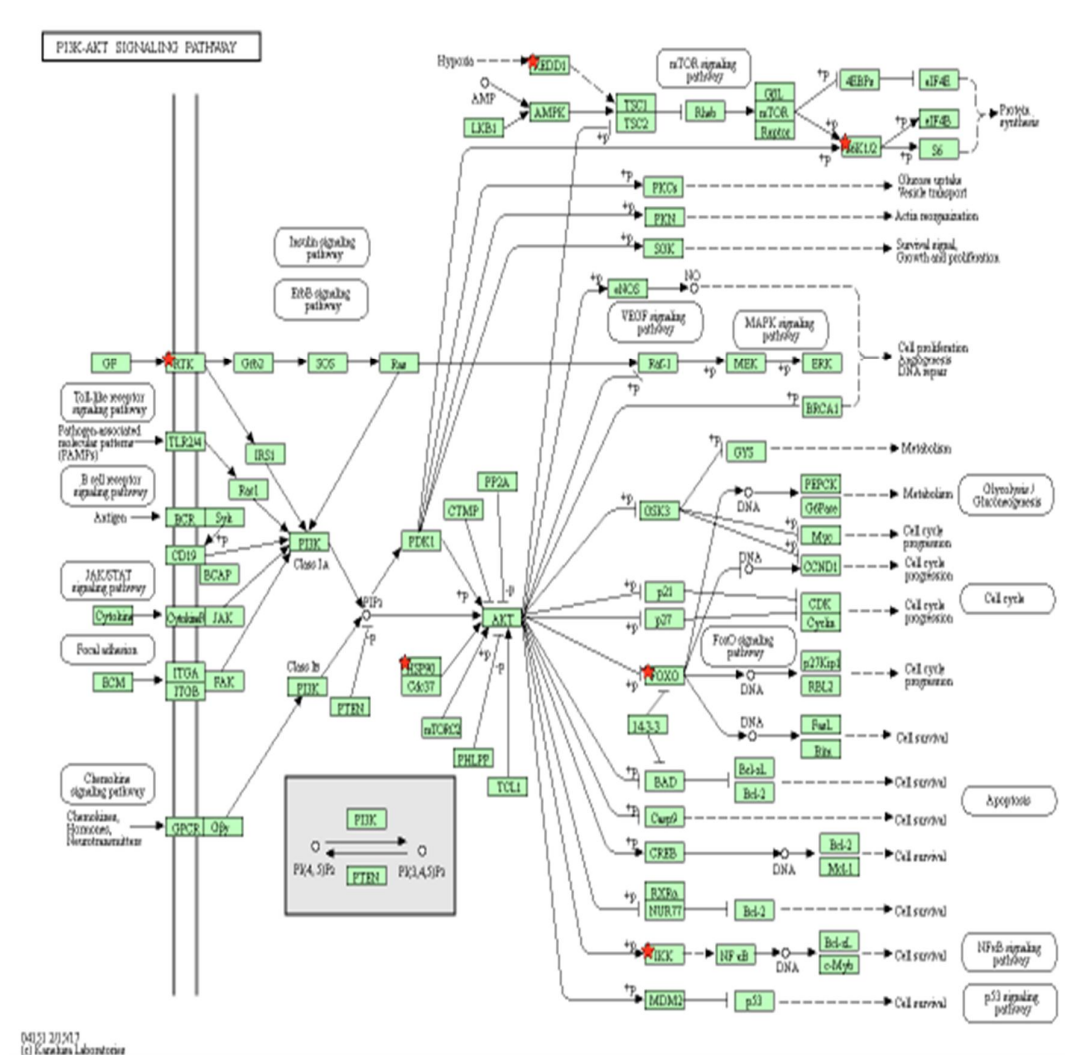
این ریز RNA اثر خود را از طریق اثر بر مسیر پیامدهی سرطان ( $p < 0,05$ ) از طریق ژن‌های HSP, APC, IKK, VHL و FGFR اعمال می‌کند. FGFR از طریق فرایندهای تکثیر سلولی و به تأخیر انداختن مرگ سلولی و رگ‌زایی اثر خود را اعمال می‌کند و ژن IKK از طریق فرایند رگ‌زایی و ژن‌های HSP و APC از طریق به تأخیر انداختن 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 گلوکونئوزنز، 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 ریز RNA از طریق اثر بر مسیرهای پیامدهی متعددی نقش خود را اعمال می‌کند. فهرست این مسیرهای پیام‌رسانی و ژن‌هایی که تحت تاثیر ریز RNA bta-mir-181 از طریق سازوکارهای متفاوتی مانند مرگ سلولی کنترل شده، رگ‌زایی، تکثیر سلولی، چرخه سلولی، به تاخیر انداختن مرگ سلولی و گلیگولیز و گلوکونوژنز 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**

ریز RNA bta mir-16a 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 ریز RNA bta-mir-16a در این مسیرها در جدول شماره 2 آمده است ( $p < 0,05$ ). از آنچه گذشت می‌توان نتیجه گرفت که ریز RNAهای یاد شده در مسیرهای پیامدهی متفاوتی اثرگذار هستند. در این میان دو ریز RNA bta-mir-181 و bta-mir-16a در مسیرهای پیامدهی متفاوتی درگیر بودند (جدول 1 و 2). مسیرهای پیامدهی تقسیم سلولی و تکثیر سلولی تقریباً توسط تمامی ریز RNA تحت تاثیر قرار گرفتند. بحث مهمی که اینجا پیش می‌آید این است که آیا این ریز RNAها 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. مثلاً چنانچه افزایش بیان یا عملکرد زیستی مسیرهای پیامدهی استخراج شده مطلوب باشد یا باعث مدیریت بهتر ورم پستان در گاو شیری شود و ریز RNAهای مورد بررسی، نقش افزایش مسیرهای پیامدهی یاد شده را داشته باشند، آنگاه می‌توان با افزایش بیان این ریز RNAها، 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 ریز RNA، به کنکاش ورم پستان در گاو شیری پرداخت. البته پیچیدگی‌های زیستی زیاد وجود دارد که باید به وجود این پیچیدگی‌ها اذعان شود. مثلاً طراحی پرایمر برای ریز RNAها خیلی سخت‌تر از طراحی پرایمر برای ژن‌های معمول است. از طرفی ممکن است در سطح بیانی هر ریز RNA در پستان یا سلول‌های درگیر بیماری ورم پستان یکسان نباشد و یا اینکه اهداف ژنی مشابه برای ریز RNAها وجود داشته باشد که تعاملات رقابتی بین ریز RNA را فراهم می‌سازد.

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

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

Signaling pathways مسیرهای پیام‌رسانی	P Value	Effective genes in each of the signaling pathways ژن‌های موثر در هر مسیر پیام‌رسانی
GnRH signaling pathway مسیر پیام‌رسانی هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها	8.9E-3	CAMK, CAM, MEKK, MEK1/2, RAS
Estrogen signaling pathway مسیر پیام‌رسانی 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 پیام‌رسانی اوکسی‌توسین	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 پیام‌رسانی 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 پیام‌رسانی 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<sup>1</sup> 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.

<sup>1</sup> Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy

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

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

Signaling pathways مسیرهای پیام‌رسانی	P Value	Effective genes in each of the signaling pathways ژن‌های موثر در هر مسیر پیام‌رسانی
MAPK Signaling Pathway مسیر پیام‌رسانی 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 پیام‌رسانی استروژن	3.5E-2	HSP70, Raf, MEK, TF, FKBP52, Gi/o, CAM
Oxytocin Signaling Pathway مسیر پیام‌رسانی اکسی‌توسین	3.7E-2	MEK1/2, Raf-1, NFAT, c-fos, CALM, GIRK, ROCK, MLCK, Gi/o
cGAMP-PKG Signaling Pathway مسیر پیام‌رسانی cGAMP-PKG	2.4E-2	NFAT, GPCR, Cam, MLCK, ROCK, MPT, Gi, MEK, Raf-1, $\beta$ AR

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 از مرحله 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 زیست‌نشانگرهای 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 ریز bta mir-16a RNA در بیماری ورم پستان و افزایش میزان بیان ریز bta-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 گلوکونوژنز 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 زیست‌نشانه‌گر 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.

<sup>1</sup> Gene Set

## منابع

- خراتی کوپایی 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.
- خراتی کوپایی 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 بزهای 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 ژن BMP15 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 Mehryari 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. *Diabetologia* 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 Yaroslavl, 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, Moisés 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- $\kappa$ B signaling pathway in mammary tissue of Chinese Holstein cattle with mastitis. *PloS One* 10, 1-16.
- Yang G, Yang X (2010) Smad4-mediated TGF- $\beta$  signaling in tumorigenesis. *International J Biol Sci* 6, 1-8.

