



شناسایی و مقایسه ایزوفرم‌های میکرو آر.ان.ای Let-7 در ماهی آزاد ماهیان با استفاده از داده‌های بیوانفورماتیک

احمد بهمنی نژاد^۱، حمید فرحمنند^{۲*}، امیرعابد علم دوست^۳

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران - نویسنده مسئول

۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۳

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷

چکیده

میکرو آر.ان.ای توالی‌های کوتاه غیر کد شونده‌ای هستند که تنظیم بیان ژنها را در مرحله بعد از رونویسی انجام می‌دهند، این نوع از آر.ان.ای غیرکدشونده در تنظیم بیان ۶۰ درصد از ژنها دخالت دارند. در آزاد ماهیان تعداد بسیار محدودی از میکرو آر.ان.ای‌ها شناسایی شده است. لذا در این تحقیق به منظور شناسایی ایزوفرم‌های مختلف میکرو آر.ان.ای Let-7 در آزاد ماهیان، داده‌های بیوانفورماتیک موجود در NCBI مورد استفاده قرار گرفت. ۴۳ میلیون خوانش با طول حدود ۲۲ باز مورد بازبینی قرار گرفت که از این مقدار ۱۷/۸ میلیون با Let-7 همخوانی داشتند. ۹ ایزوفرم مختلف از خانواده Let-7 شناسایی شد که ۸ عدد از آنها با ایزوفرم‌های شناسایی شده در سایر رده‌های جانوری تطبیق داشته است و یک ایزوفرم جدید که دارای یک باز اختلاف با ایزوفرم Let-7f در آزاد ماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) است نیز شناسایی شد. ایزوفرم Let-7a نیز در میان ۹ ایزوفرم دارای بیشترین فراوانی بوده است. برای ۹ ایزوفرم شناسایی شده تعداد ۲۰ لوکوس بر روی کروموزوم‌های ژنوم مرجع (Otsh.V1) در مرکز داده‌های NCBI شناسایی شد و بدین طریق مشخص گردید که تعداد ۷ لوکوس بر روی ژنوم به صورت خوشه‌های ژنی از Let-7 می‌باشند، ۲ لوکوس دیگر نیز برای ایزوفرم Let-7c بر روی قطعاتی از ژنوم مرجع که در کروموزوم‌ها مکان یابی نشده بودند شناسایی شد.

واژگان کلیدی: آزاد ماهیان، میکرو آر.ان.ای، بیوانفورماتیک، Let-7، Salmonids microRNA، isoforms



Detecting the Let-7 isoforms of Salmonids using bioinformatics data

Ahmad Bahmaninejad¹, Hamid Farahmand^{2*}, Amireza Abed Elmdust³

1. Ph.D student, Professor, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Professor, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Fishery, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Received: 18-Oct-2020

Accepted: 02-Jan-2021

Abstract

MicroRNAs are short noncoding RNAs that control gene expression in post-transcriptionally manner, estimated about 60% of all genes controlled by these RNAs. Among vertebrates in Salmonids this type of RNA poorly investigated. In this study for profiling isoforms of Let-7 MicroRNA of Salmonids, the data from NCBI database was extracted and analyzed. About 43 million reads with 22 nucleotides span were analyzed. Among them, 17.8 million reads were matched to Let-7a isomer of this MicroRNA family. 9 Isoforms of this family detected in which 8 of them were detected before in other animals. One of detected isoforms was novel and not reported in other species. The novel isolated isoform in this study contains one nucleotide difference with Let-7f in Atlantic salmon (*salmo salar*). let-7a isomer abundantly expressed comparing with others. 20 loci for all isomers were on reference genome (Otsh.V1) in NCBI, and 7 of these loci organized as MicroRNA gene clusters in genome. The other 2 loci for Let-7c were detected on unplaced fragments of reference genome as well.

Keywords: Salmonids, microRNA, Bioinformatics, let-7, isoform

۱. مقدمه

طریق Exportin-5-Ran-GTP به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. در سیتوپلاسم کمپلکس Dicer به همراه TBRP(double-stranded RNA-binding protein) ساختار سنجاقتی سری را برش می‌دهد و ساختار بالغ دو رشته‌ای را تولید می‌کند (Tomari and Zamore, 2005)، یکی از رشته‌ها به همراه پروتئین آرگونوات (Ago2) در ساختار RISC قرار می‌گیرند و از این طریق این کمپلکس را برای چسبیدن به آر.ان.ای پیام‌رسان راهنمایی می‌کند سپس از طریق تجزیه کردن آر.ان.ای پیام‌رسان و یا جلوگیری از شروع فرایند ترجمه و آمین زدایی از ام.آر.ان.ای موجب غیر فعال شدن و عدم ترجمه آن به پروتئین می‌شود. رشته دوم نیز تجزیه می‌شود (Kwak and Tomari, 2012).

اتصال میکروآر.ان.ای و آر.ان.ای پیام‌رسان بر اساس تطبیق توالی منطقه ای به نام Seed در میکروآر.ان.ای بالغ با توالی آر.ان.ای پیام‌رسان انجام می‌شود. Seed بازه‌های شماره ۲ تا ۸ در شکل بالغ میکروآر.ان.ای از سمت 5' را شامل می‌شود ایزوفرم در میکرو آر.ان.ای به اشکالی گفته می‌شود که در منطقه Seed شباهت کامل داشته باشند، (Ameres and Zamore, 2013). در آخرین نسخه (شماره ۲۲/۱ منتشر شده در اکتبر ۲۰۱۸) پایگاه داده mirbase تعداد ۳۸۵۸۹ میکرو آر.ان.ای در همه گونه‌ها به ثبت رسیده است (Kozomara et al., 2018). در مورد پستانداران تخمین زده شده است که حدود ۶۰ درصد آر.ان.ای‌های پیام‌رسان دارای مناطق حفاظت شده‌ای برای اتصال میکروآر.ان.ای‌ها هستند (Friedman et al., 2009)، این نوع از آر.ان.ای‌های کوچک غیرکدشونده در عمده فرایندهای فیزیولوژیکی آزیان نیز دارای نقش‌های مهم هستند (Tsai et al., 2012). هر کدام از میکرو آر.ان.ای‌ها می‌توانند اثرات تنظیمی بر روی صدها ژن داشته باشند به طور مثال Mir-430 بیش از ۱۰۰۰ ژن را به طور مستقیم تنظیم می‌کند و از طرف دیگر هر ژن می‌تواند محل اثر چندین میکرو آر.ان.ای باشد (Giraldez et al., 2006). هر لوکوس میکرو آر.ان.ای در ژنوم در واقع می‌تواند دو میکرو آر.ان.ای بالغ را تولید کند،

میکروآر.ان.ای‌ها^۱ توالی‌های کوتاه با طول حدود ۲۲ باز و غیرکد شونده‌ای^۲ هستند که در تمام یوکاریوت‌ها از گیاهان تا جانوران یافت می‌شوند و تنظیم بیان ژن‌ها را در مرحله بعد از رونویسی^۳ انجام می‌دهند (Bartel, 2004) و این عملکرد را عمدتاً از طریق شناسایی توالی‌های مکمل^۴ خود در منطقه UTR 3' آر.ان.ای پیام‌رسان انجام می‌دهند (Filipowicz et al., 2008). اتصال میکروآر.ان.ای به توالی مکمل خود در آر.ان.ای پیام‌رسان هدف موجب کاهش ترجمه آر.ان.ای پیام‌رسان هدف می‌شود که این کاهش از طریق تجزیه کردن آر.ان.ای پیام‌رسان و یا جلوگیری از شروع فرایند ترجمه و طویل‌سازی انجام می‌شود (Ha and Kim, 2014). میکروآر.ان.ای با قرار گرفتن در کمپلکسی به نام RISC^۵ و اتصال به منطقه UTR 3' آر.ان.ای پیام‌رسان اثر تنظیمی بعد از رونویسی خود را خود را اعمال می‌کند، توالی منطقه هسته (Seed) میکرو آر.ان.ای بالغ مهمترین عامل تعیین کننده برای اتصال کمپلکس RISC به ام.آر.ان.ای هدف بر اساس شناسایی توالی‌های مکمل می‌باشد (Griffiths-Jones et al., 2008). تولید میکرو آر.ان.ای در سلول از مسیرهای متفاوتی انجام میشود، ولی عمده آنها از طریق مسیر استاندارد^۶ تولید میشوند (Cai et al., 2004). در مسیر استاندارد ابتدا پیش‌ساز میکروآر.ان.ای (Pri-miRNA) توسط آر.ان.ای پلیمرز ۲ یا ۳ تولید می‌شود و دارای طول متفاوت از صدها تا هزاران نوکلئوتید می‌باشد (Borchert et al., 2006) و سپس در هسته توسط کمپلکس Drosha-DGCR8 برش داده می‌شود و پیش‌میکرو آر.ان.ای (pre-miRNA) ساخته می‌شود که دارای طولی حدود ۷۰ نوکلئوتید می‌باشد و ساختار سنجاقتی سری (hairpin) دارد (Lee et al., 2016) سپس از

¹ MicroRNAs

² noncoding

³ Post-transcriptionally

⁴ Complementary sequence

⁵ RNA Induced Silencing complex

⁶ Canonical pathway

آن در زمانبندی فرایند تکوین و تخصصی شدن سلول‌ها مشخص شد، Let-7 به لحاظ تکاملی در میان جانوران از حشرات تا پستانداران کاملاً محافظت شده است ولی در گیاهان تا کنون شناسایی نشده است (Reinhart *et al.*, 2000). هرچند در نماتد تنها یک ایزوفرم از let-7 وجود دارد ولی جانوران پیشرفته دارای ایزوفرم‌های متعددی از آن هستند به طور مثال انسان دارای ۱۰ ایزوفرم مختلف از آن است که در ۱۳ منطقه‌ی متفاوت ژنومی وجود دارند و تعدادی از آنها در به صورت خوشه‌های ژنی^۱ در ژنوم وجود دارند، در انسان ایزوفرم let-7a از این خانواده دارای سه پیش‌میکروآران‌ای به نام‌های let-7a-1، let-7a-2 و let-7a-3 می‌باشد که از سه منطقه متفاوت ژنومی ساخته می‌شوند (Roush and Slack, 2008). تا کنون برای این میکرو آران‌ای در پایگاه Mirbase تعداد ۷۴۰ توالی برای گونه‌های مختلف به ثبت رسیده است که از ۶۶۷ ناحیه ژنومی پیش‌میکرو آران‌ای بیان شده‌اند (<http://www.mirbase.org>).

در ماهی گوره خری^۲ (*Danio rerio*) تمام ایزوفرم‌های Let-7 در مجموع روی ۲۳۹۳ ژن اثر تنظیمی دارد که این ژن‌ها در مجموع دارای ۲۸۴۰ توالی حفاظت شده برای اتصال این میکرو آران‌ای در منطقه 3' UTRs خود می‌باشند (TargetScanFish release 6.2). در ماهیان برای آزاد ماهی اقیانوس اطلس^۳ (*Salmo salar*) تعداد ۱۰ ایزوفرم برای خانواده Let-7 شناسایی شده‌اند که از ۲۰ ژن پیش‌میکروآران‌ای بیان شده‌اند (Andreassen *et al.*, 2013) (Barozai, 2012) (Bekaert *et al.*, 2013) و برای ماهی گوره خری نیز تا کنون ۱۲ ایزوفرم در ۱۸ ژن پیش‌میکروآران‌ای شناسایی شده‌اند (Kozomara *et al.*, 2018). در ماهیان شناسایی میکرو آران‌ای‌ها نسبت به سایر گروه‌های مهره داران بسیار محدود بوده و نقش آنها در تنظیم بیان ژن به ندرت مطالعه شده و عمده تحقیقات بر روی گونه ماهی

در فرایند سنتز زیستی میکرو آران‌ای ابتدا دارای یک ساختار دورشته ای می‌باشد، هر کدام از این رشته‌ها می‌تواند وارد کمپلکس RISC شود و ادامه فرایند کنترل بیان ژن را طی کند. در صورتی که رشته ای 3' ساختار سنجاق سری میکروآران‌ای بالغ در ساختار RISC قرار بگیرد به انتهای نام ایزوفرم 3p، این شیوه نام گذاری در مورد سمت 5' نیز به همین گونه است. نحوه اتصال میکرو آران‌ای به هدف خود می‌تواند به اشکال مختلفی صورت گیرد که دارای اثرات تنظیمی متفاوتی نیز خواهند بود. برای تعیین میزان اثر گذاری میکرو آران‌ای یک سیستم امتیاز دهی بر اساس نوع اتصال و وجود سایر مناطق برای اتصال سایر میکرو آران‌ای ایجاد شده است (Garcia *et al.*, 2011) که در آن سه نوع اتصال میکرو آران‌ای به هدف تعریف شده‌اند، شدت مهارکنندگی میکرو آران‌ای بر روی هدف خود تا حدود زیادی به نوع اتصال بستگی دارد انواع اتصال به ترتیب شدت مهار کنندگی به صورت زیر تعریف شده‌اند:

8mer: تطبیق کامل بازهای ۲ تا ۸ میکرو آران‌ای بالغ با هدف که در ادامه آن یک باز آدنین قرار دارد
7mer-m8: تطبیق کامل بازهای ۲ تا ۸ میکرو آران‌ای بالغ با هدف
7mer-A1: تطبیق کامل بازهای ۲ تا ۷ میکرو آران‌ای بالغ با هدف که در ادامه آن یک باز آدنین قرار دارد.

در صورتی که یکی از بازهای منطقه Seed میکرو آران‌ای بالغ با محل اتصال خود در آران‌ای پیام رسان تطبیق نداشته باشد شدت مهار کنندگی کمپلکس RISC به شدت کاهش خواهد یافت، علاوه بر نوع اتصال تعداد مناطق موجود بر روی آران‌ای هدف برای اتصال سایر میکرو آران‌ای‌ها نیز با شدت مهار کنندگی ارتباط دارد و هرچه تعداد این مناطق بیشتر باشد اثر مهار کنندگی هر کدام از میکرو آران‌ای‌ها کاهش می‌یابد (Garcia *et al.*, 2011). Let-7 یکی از اولین میکرو آران‌ای‌های شناخته شده است که برای اولین بار در یک نوع نماتد (*Caenorhabditis elegans*) کشف شد و نقش تنظیمی

¹ Gene cluster

² Zebra fish

³ Atlantic salmon

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه برداری

تعداد ۶ عدد ماهی نر بالغ از مرکز Yellow Island Aquaculture Ltd واقع در استان بریتیش کلمبیا کانادا تهیه شد، این مرکز از سال ۱۹۸۶ تا کنون به پرورش این گونه مشغول است، شرایط پرورش کاملاً همسان بوده و ماهیان مورد استفاده ۶ نسل متوالی در این مرکز درون آمیزی شده که اختلافات ژنتیکی بین افراد جمعیت را به حداقل می‌رساند. ماهیان در کانال‌های تخم‌ریزی نیمه طبیعی تا زمان بروز رفتارهای مربوط به رسیدگی نهایی جنسی نگهداری شدند و سپس از کانال‌ها خارج شده و کل بافت مغز از ماهیان جمع‌آوری شد، برای حفاظت از نمونه‌ها بافت مغز تا زمان انتقال به آزمایشگاه و استخراج آر.ان.آ از RNAlater (Ambion, USA) استفاده شد.

۲.۲. استخراج میکرو آر.ان.ای

در ابتدا نمونه‌ها به دو گروه سه تایی تقسیم شدند و در هر گروه نمونه‌ها مخلوط شده و به صورت تجمیع شده ادامه مراحل را طی نمودند. برای استخراج میکرو آر.ان.ای از Trizol محصول شرکت Invitrogen بر اساس دستورالعمل استفاده شد و کیفیت نمونه‌های استخراج شده با استفاده از Nanodrop کنترل گردید. ساختن کتابخانه‌های cDNA و توالی‌یابی توسط Beijing Genomics Institute (BGI, Beijing, China) انجام شد. دو نمونه تجمیع شده بر روی پلتفرم Illumina HiSeq2000 توالی‌یابی شدند (Caporaso et al., 2012).

۳.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل انجام شده تحت سیستم عامل لینوکس اوبونتو سرور ۱۸ و با بسته‌های نرم افزاری FastQC, MirDeep2, R, Trimmomatic, Bowtie, NCBI Blast و با استفاده از سرور موجود در آزمایشگاه امیکس گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران با ۲۴ رشته پردازشی در پردازشگر و ۲۵۶ گیگابایت رم شده است.

گروه‌خری بوده است (Bizuayehu and Babiak, 2014). فاکتورهای تنظیم کننده زیادی انتقال سیناپسی و عملکرد عصبی مغز تحت کنترل خود دارند که در این میان میکرو آر.ان.ای‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردارند (Loohuis et al., 2012). میکرو آر.ان.ای‌ها در مغز نقش بسیار مهمی نیز در توسعه سیناپس‌ها نیز پلاستیسیته سیناپس‌ها دارند (Bredy et al., 2011). در بافت مغز Let-7 به طور کلی let-7 در زمان بندی ازدیاد و تخصیص شدن سلول‌ها در ابتدا و سپس در تنظیم عملکرد سیناپس‌ها نقش مهمی دارد (McGowan et al., 2018). مشخص شده است که در نورنها تراکم میکرو آر.ان.ای در نزدیکی سیناپس‌ها شامل مناطق سیناپسونوروزوم^۱ و سیناپتوزوم^۲ بسیار زیاد است و همچنین در این مناطق از سلول برخی میکرو آر.ان.ای‌ها با نسبت بالاتری نسبت به کل سلول وجود دارند (Lugli et al., 2008). علاوه بر در این مناطق پیش میکرو آر.ان.ای و آنزیم dicer نیز شناسایی شده که نشان می‌دهد مراحل پایانی پردازش میکرو آر.ان.ای و تبدیل آن به شکل بالغ نیز در نزدیکی سیناپس‌ها صورت می‌گیرد (Ha and Kim, 2014).

با توجه به نقش مهم میکرو آر.ان.ای‌ها در تنظیم بیان اکثر ژن‌ها و عدم وجود اطلاعات کافی در مورد آنها به ویژه در مورد ماهیان اقتصادی، تحقیق حاضر به منظور فراهم آوردن اطلاعات لازم در مورد میکرو آر.ان.ای Let-7 و ایزوفرم‌های آن که یکی از مهمترین میکرو آر.ان.ای‌های شناخته شده هستند در بافت مغز گونه آزاد ماهی چینوک انجام شده است، این تحقیق زمینه مطالعات بعدی جهت شناسایی ژن‌های تحت تاثیر این میکرو آر.ان.ای را فراهم نموده و نیز مطالعه مقایسه‌ای به منظور درک بهتر فرایند تنظیم بیان ژن‌ها تحت کنترل را در مرحله ترجمه ممکن می‌سازد و بررسی کاربردهای احتمالی در صنعت آبی‌پروری را تسهیل می‌کند.

¹ Synaptoneurosome

² synaptosomes

(Loop) و قطعه روبروی میکرو آر.ان.ای بالغ (Star)، حداقل انرژی آزاد و تصادفی بودن تشکیل ساختار سنجاق سری از جمله فاکتورهای امتیاز دهی در این الگوریتم هستند. قطعه ای که فراوانی بیشتری دارد نیز به عنوان میکرو آر.ان.ای بالغ در نظر گرفته می‌شود.

بعد از امتیازدهی لوکوس‌های احتمالی بر اساس جدول میزان صحت (Signal to Noise) تخمین زده شده (جدول ۱) حداقل امتیاز ۵ برای فیلتر کردن این لوکوس‌ها انتخاب شد.

۳. نتایج

۳.۱. کنترل کیفیت و تطبیق با ژنوم

پس از توالی‌یابی نمونه‌ها در مجموع حدود ۴۳ میلیون خوانش با سایز متوسط ۲۲ باز تولید شد. که متوسط عدد کیفیت فرد^۳ را برای خوانش‌ها ۳۸ محاسبه کرد. پس از تطبیق توالی‌های خوانش شده با ژنوم مرجع ۹۶٫۶ درصد کل خوانش‌ها بر روی ژنوم مکان یابی شدند.

کنترل کیفیت خوانش‌های تولید شده توسط پکیج نرم‌افزاری FastQC انجام شد، بعد از کنترل کیفیت خوانش‌ها و اطمینان از داشتن کیفیت لازم، با استفاده از پکیج نرم‌افزاری MirDeep2 و جریان کار^۱ پیشنهادی آن ادامه آنالیز انجام شد (Friedländer *et al.*, 2011). این نرم افزار ابتدا خوانش‌ها را با ژنوم مرجع با استفاده از ردیفگر^۲ Bowtie تطبیق می‌دهد و محل آنها را روی ژنوم پیدا میکند و سپس مناطق شناسایی شده بر روی ژنوم را بر اساس اینکه محل ژن میکرو آر.ان.ای باشند امتیاز دهی می‌کند، ژنوم مرجع مورد استفاده در این تحقیق Otsh.v1.0 می‌باشد که از پایگاه NCBI دریافت شد (Christensen *et al.*, 2018).

جهت شناسایی لوکوس‌های احتمالی میکرو آر.ان.ای از الگوریتم امتیاز دهی MirDeep2 (Friedlander *et al.*, 2008) استفاده گردید. امتیاز دهی در این الگوریتم بر اساس پیش فرض‌های موجود در پردازش زیستی میکرو آر.ان.ای انتخاب شده اند. فراوانی خوانش‌های منطبق با مناطق متفاوت ساختار سنجاق سری پیش-میکرو آر.ان.ای شامل قطعه بالغ، حلقه

جدول ۱- میزان تخمین زده شده signal-to-noise برای امتیاز ۰ تا ۱۰

امتیاز الگوریتم MirDeep2	میزان صحت تخمین زده شده (estimated signal-to-noise)
۱۰	۱۸/۵
۹	۱۸/۴
۸	۱۸/۳
۷	۱۸/۲
۶	۱۸
۵	۱۷/۷
۴	۱۱/۵
۳	۵/۱
۲	۳/۶
۱	۳/۳
۰	۳/۶

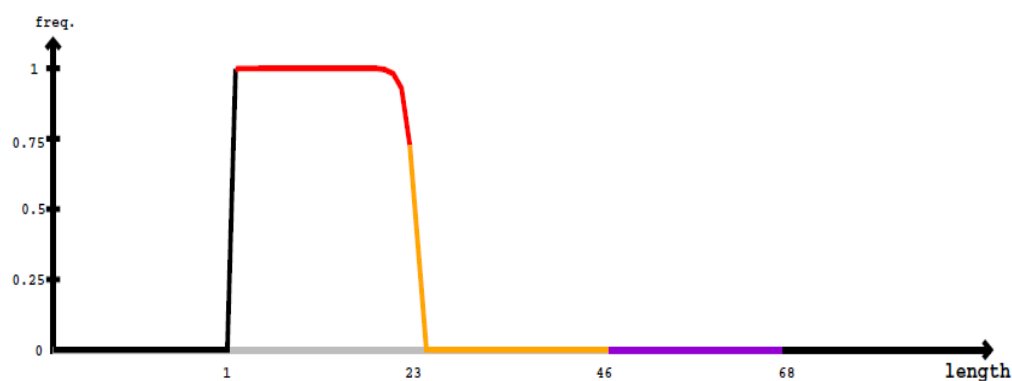
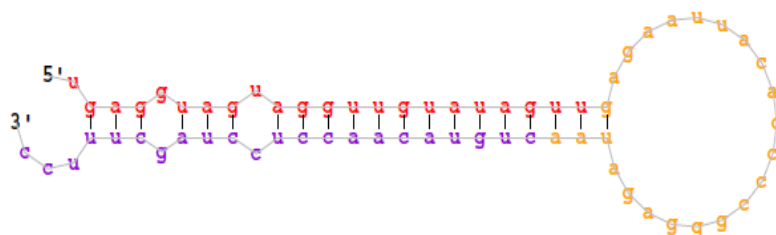
^۱ Workflow

^۲ Aligner

^۳ Phred quality score

خوانش‌ها با ۵۲ لوکوس احتمالی برای Let-7 بر روی ژنوم شناسایی همخوانی داشتند، با توجه به الگوریتم امتیازدهی MirDeep2 این لوکوس‌های احتمالی امتیازدهی شدند (شکل ۱).

Provisional ID : NC_037110.1_138098
 Score total : 8227554.1
 Score for star read(s) : 3.9
 Score for read counts : 8227544.2
 Score for mfe : 1.4
 Score for randfold : 1.6
 Score for cons. seed : 3
 Total read count : 16137985
 Mature read count : 16137951
 Loop read count : 5
 Star read count : 29



Mature **Star**

5' - cagacugcuugucuccaggcugagguaguagguuguuaguugagaauuacacccocgggagauaacuguaacaaccuucuguuuuccuguggugugcacaaccuucugc - 3' obs
 cagacugcuugucuccaggcugagguaguagguuguuaguugagaauuacacccocgggagauaacuguaacaaccuucuguuuuccuguggugugcacaaccuucugc exp

شکل ۱- نمودار بالا: فاکتورهای موثر در امتیازدهی به لوکوس‌های احتمالی میکرو آر.ان.ای در الگوریتم MirDeep2 و شکل دو بعدی محاسبه شده پیش‌میکرو آر.ان.ای. سری پایین: ن فراوانی خوانش‌های شمارش شده برای قطعات مختلف پیش‌میکرو آر.ان.ای

(جدول ۲).

در مجموع بیشترین تعداد خوانش با حدود ۱۷/۸ میلیون، با پیش‌میکرو آر.ان.ای let-7a تطبیق داشته‌اند و کمترین خوانش با مقدار ۲۲۳۸ عدد با پیش‌میکرو آر.ان.ای let-7f همخوانی داشته‌اند (شکل ۲). در مورد خوانش‌های که می‌توانند با ایزوفرم‌های متفاوت تطبیق داشته باشند و تعداد آنها برای چندین ایزوفرم محاسبه شود.

۲.۳. شناسایی لوکوس‌های احتمالی برای Let-7

بر روی ژنوم

به طور کل حدود ۲۸ میلیون از خوانش‌ها با ۲۸۰۷ لوکوس برای همه میکرو آر.ان.ای‌های ممکن در ژنوم مرجع همخوانی داشتند که از این تعداد ۱۷/۸ میلیون از

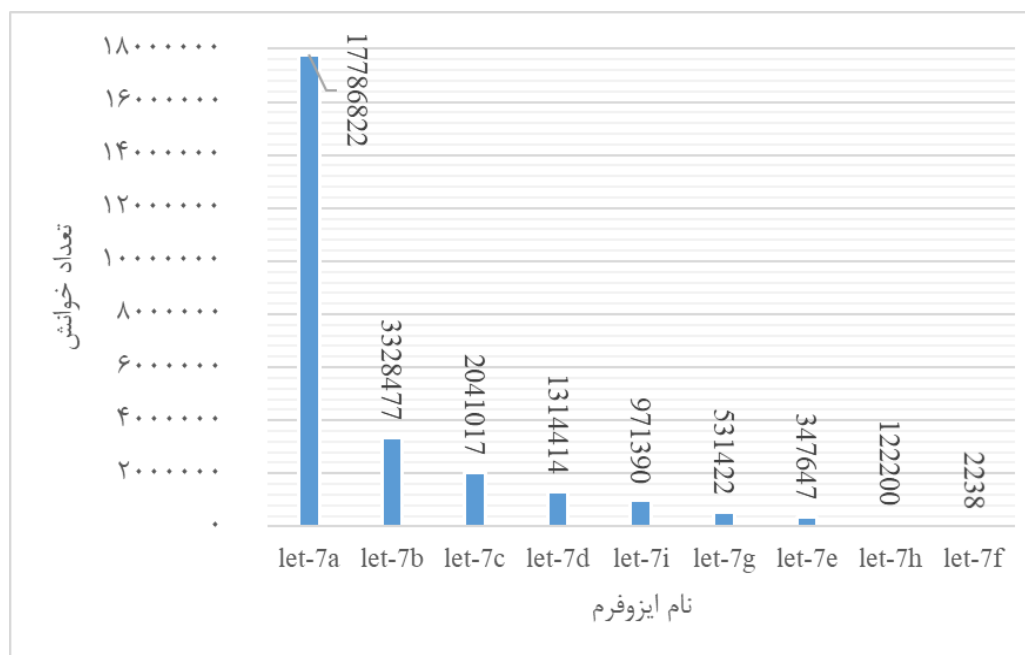
بر اساس جدول میزان صحت (Signal to Noise)

تخمین زده شده ۲۱ لوکوس داری امتیاز کمتر از ۵ بودند و از لیست لوکوس‌های احتمالی حذف شدند.

از ۳۱ لوکوس باقیمانده ۲ لوکوس نیز دارای تعداد خوانش کمتر از ۱۰۰ بودند که حذف شدند، در نهایت ۲۹ منطقه به عنوان لوکوس‌های Let-7 در نظر گرفته شد که در مجموع تعداد ۹ ایزوفرم از Let-7 را تولید می‌کنند

جدول ۲-مختصات لوکوس‌های مختلف ایزومرهای Let-7 بر روی ژنوم مرجع و امتیاز لوکوس بر اساس الگوریتم MirDeep2

ردیف	NCBI RefSeq ID	کروموزوم در ژنوم مرجع	آغاز	پایان	رشته دی.ان.ا.	امتیاز Mirdeep2	نام لوکوس	ایزومر
۱	NC_037113.1		۵۲۰۰۸۴۸	۵۲۲۹۲۰	-	۹۰۶۸۱۷۲	let-7a-1	let-7a
۲	NC_037111.1		۱۶۱۱۲۶۷۲	۱۶۱۱۲۷۴۴	-	۹۰۶۸۱۶۹	let-7a-2	
۳	NC_037115.1		۱۱۷۴۳۹۳	۱۱۷۴۴۶۵	-	۹۰۶۷۷۵۰	let-7a-3	
۴	NC_037097.1		۱۱۵۰۲۰۴۱	۱۱۵۰۲۱۱۳	+	۹۰۶۷۷۴۹	let-7a-4	
۵	NC_037098.1		۵۰۸۹۶۶۱۲	۵۰۸۹۶۶۸۸	-	۹۰۴۱۰۸۵	let-7a-5	
۶	NC_037103.1		۳۵۸۲۸۶۶۳	۳۵۸۲۸۷۴۰	+	۹۰۳۹۸۰۴	let-7a-6	
۷	NC_037110.1		۲۹۵۱۹۰۴۴	۲۹۵۱۹۱۱۱	+	۸۲۲۷۵۵۴	let-7a-7	
۸	NC_037109.1		۵۲۴۵۴۱۹۱	۵۲۴۵۴۲۵۸	+	۸۲۲۷۵۵۴	let-7a-8	
۹	NC_037115.1		۱۴۱۱۵۶۴۱	۱۴۱۱۵۷۰۸	+	۸۲۱۷۸۸۱	let-7a-9	
۱۰	NC_037126.1		۴۰۰۱۷۹۰۷	۴۰۰۱۷۹۷۲	-	۸۲۱۷۸۷۵	let-7a-10	
۱۱	NC_037097.1		۱۱۵۰۲۳۲۷	۱۱۵۰۲۴۰۴	+	۱۶۹۶۹۴۶	let-7b-1	let-7b
۱۲	NC_037115.1		۱۱۷۴۰۷۶	۱۱۷۴۱۵۲	-	۱۶۹۶۹۲۰	let-7b-2	
۱۳	NC_037111.1		۱۶۱۱۲۳۵۳	۱۶۱۱۲۴۳۰	-	۱۶۹۶۸۹۳	let-7b-3	
۱۴	NC_037113.1		۵۲۰۰۵۳۸	۵۲۰۰۶۱۵	-	۱۶۹۶۸۹۱	let-7b-4	
۱۵	NW_020142509.1		۱۴۴۶۳۳۲	۱۴۴۶۳۹۹	-	۱۰۴۰۵۶۶	let-7c-1	let-7c
۱۶	NW_020128814.1		۲۰۰۰۵۸	۲۰۰۱۲۵	+	۱۰۴۰۵۶۶	let-7c-2	
۱۷	NC_037105.1		۲۸۲۱۶۲۶۸	۲۸۲۱۶۳۳۵	+	۱۰۴۰۵۶۴	let-7c-3	
۱۸	NC_037127.1		۳۵۵۴۹۲۹۴	۳۵۵۴۹۳۶۴	+	۶۷۰۱۲۵/۳	let-7d-1	let-7d
۱۹	NC_037103.1		۳۵۸۲۸۲۱۷	۳۵۸۲۸۲۹۰	+	۱۷۷۲۴۳/۴	let-7e-1	let-7e
۲۰	NC_037098.1		۵۰۸۹۷۰۵۸	۵۰۸۹۷۱۳۱	-	۱۷۷۲۴۱/۷	let-7e-2	
۲۱	NC_037116.1		۴۴۹۵۳۳۴۷	۴۴۹۵۳۴۲۵	-	۵/۱	let-7f-1	let-7f
۲۲	NC_037118.1		۸۳۱۶۳۳۳	۸۳۱۶۴۰۴	+	۵/۴	let-7g-1	let-7g
۲۳	NC_037112.1		۶۴۵۰۰۳۷۳	۶۴۵۰۰۴۴۳	-	۵/۳	let-7g-2	
۲۴	NC_037118.1		۸۳۱۶۷۵۴	۸۳۱۶۸۳۶	+	۶۲۳۰۵/۲	let-7h-1	let-7h
۲۵	NC_037112.1		۶۴۵۰۰۰۶۴	۶۴۵۰۰۱۴۶	-	۶۲۲۷۴/۲	let-7h-2	
۲۶	NC_037115.1		۱۶۵۳۹۸۰	۱۶۵۴۰۵۸	+	۴۹۵۲۴۳/۷	let-7i-1	let-7i
۲۷	NC_037111.1		۱۵۹۰۴۵۶۶	۱۵۹۰۴۶۴۴	-	۴۹۵۲۳۲/۶	let-7i-2	
۲۸	NC_037097.1		۱۰۹۹۲۷۳۰	۱۰۹۹۲۸۰۶	-	۴۹۵۰۱۲/۹	let-7i-3	
۲۹	NC_037113.1		۵۵۳۰۰۵۹	۵۵۳۰۱۳۷	+	۴۹۵۰۱۰/۲	let-7i-4	



شکل ۲- تعداد خوانش‌های همسان با ایزوفرم‌های میکرو آر.ان.ای Let-7 در نمونه‌های بافت مغز جنس نر آزادماهی چینوک

پایگاه داده میکرو آر.ان.ای Mirbase نسخه ۲۲,۱ مقایسه شدند که در نتایج آن نشان داد ۸ عدد از ایزوفرم‌ها شناسایی شده در این تحقیق با ایزوفرم‌های شناخته شده در *S. salar* موجود در پایگاه داده تطبیق کامل داشتند (جدول ۳).

۳.۳. مقایسه توالی لوکوس‌های شناسایی شده با

پایگاه‌های داده

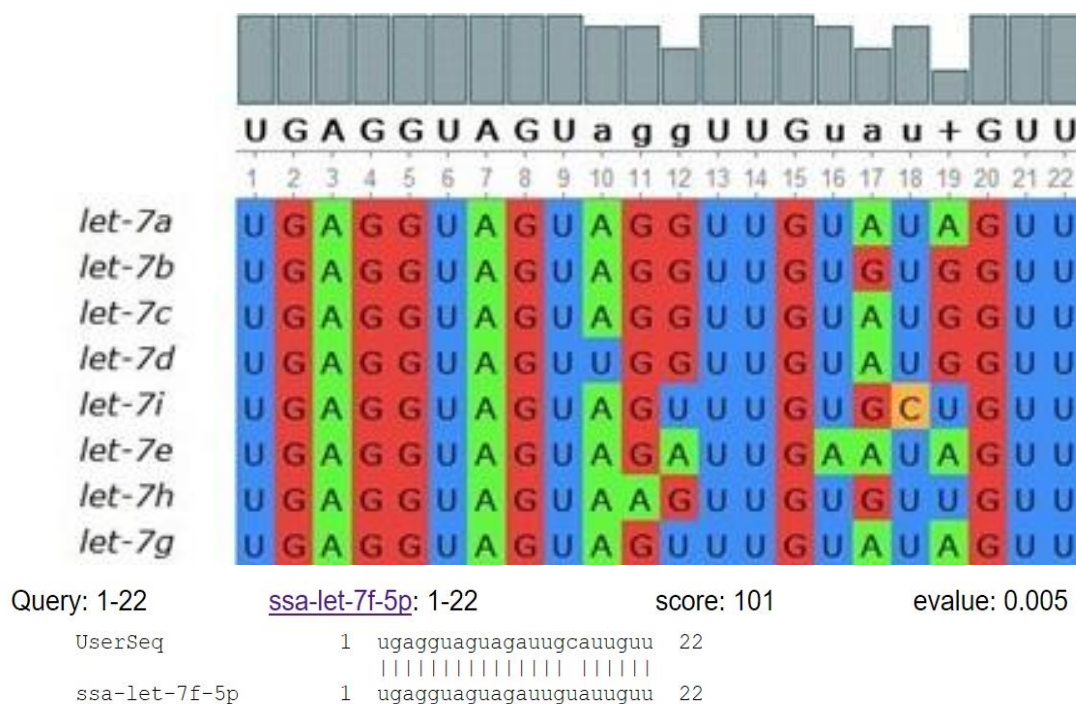
توالی ایزوفرم‌های شناسایی شده با استفاده از الگوریتم Blast به صورت محلی (Local) با پایگاه داده توالی ایزوفرم‌های شناخته شده *Salmo salar* تهیه شده از

جدول ۳- فراوانی، تعداد لوکوس در ژنوم و توالی ایزوفرم‌های مختلف Let-7 شناسایی شده در آزادماهی چینوک و نتایج الگوریتم Blast در مقایسه با آزاد ماهی اقیانوس اطلس

ردیف	نام ایزوفرم	تعداد خوانش	نام ایزوفرم در <i>Salmo salar</i>	میزان شباهت با ایزوفرم در <i>Salmo salar</i>	تعداد لوکوس شناسایی شده
۱	let-7a	۱۷۷۸۶۸۲۲	ssa-let-7a-5p	۱۰۰	۱۰
۲	let-7b	۳۳۲۸۴۷۷	ssa-let-7b-5p	۱۰۰	۴
۳	let-7c	۲۰۴۱۰۱۷	ssa-let-7c-5p	۱۰۰	۳
۴	let-7d	۱۳۱۴۴۱۴	ssa-let-7d-5p	۱۰۰	۱
۵	let-7i	۹۷۱۳۹۰	ssa-let-7i-5p	۱۰۰	۴
۶	let-7g	۵۳۱۴۲۲	ssa-let-7g-5p	۱۰۰	۲
۷	let-7e	۳۴۷۶۴۷	ssa-let-7e-5p	۱۰۰	۲
۸	let-7h	۱۲۲۲۲۰۰	ssa-let-7h-5p	۱۰۰	۲
۹	let-7f	۲۲۳۸	ssa-let-7f-5p	۹۵	۲

داد که از نظر توالی ۹۵٪ با توالی ایزوفرم let-7f در گونه *s.salar* تطبیق دارد و تنها در یک باز با ایزوفرم ssa-let-7f-5p اختلاف دارد (شکل ۳).

علاوه بر ایزوفرم‌های شناسایی شده توالی یکی از ایزوفرم نیز جدید می‌باشد و تا کنون در هیچ گونه ای به ثبت نرسیده است، مقایسه توالی این ایزوفرم جدید با ایزوفرم‌های شناسایی شده برای این میکرو آر.ان.ای نشان



شکل ۳- نمودار بالا: مقایسه توالی میکرو آر.ان.ای‌های شناسایی شده در آزادهای چینوک پایین: مقایسه توالی میکرو آر.ان.ای جدید شناسایی شده با ssa-let-7f-5p با استفاده از الگوریتم Blast، این دو توالی دارای یک اختلاف در باز شماره ۱۶ هستند.

است let-7 در پویای اتصالات سیناپسی (سیناپتیک پلاستیسیته^۱) دارای نقش حیاتی هستند (Hu and Li, 2017).

با توجه به نتایج به دست آمده تعداد 26445627 معادل ۶۲ درصد از کل خوانش‌ها متعلق به ایزوفرم‌های مختلف خانواده let-7 بوده است، این میزان معادل ۹۲ درصد کل میکرو آر.ان.ای‌های شناسایی شده در این تحقیق می‌باشد. درصد فراوانی غیر معمول این میکرو آر.ان.ای نسبت به بقیه میکرو آر.ان.ای‌ها و نیز نسبت به سایر بافت‌ها دیگر در سایر مطالعاتی که بر روی میکرو

۴. بحث و نتیجه گیری

در مورد نقش میکرو آر.ان.ای let-7 مشخص گردیده است که این میکرو آر.ان.ای در تمایز سلولی و تخصصی شدن سلول‌ها و نیز پویایی سلول‌ها نقش مهمی دارد (Fairchild *et al.*, 2019)، سلول‌های مغز (نورون‌ها) نسبت به سلول‌های سایر بافت‌ها تنوع بسیار بیشتری دارند و به طور مثال در موش با استفاده از تکنیک ترانسکریپتوم تک-سلول^۱ بیش از ۱۰۰ نوع سلول عصبی تنها در قسمت کورتکس مغز شناسایی شده است (Tasic *et al.*, 2016) از طرفی اتصالات سیناپسی نورون‌ها در مغز بسیار پویا هستند، مشخص گردیده

¹ Single-cell

² Synaptic placticity

آر.ان.ای‌های بافت مغز انجام شده گزارش شده است. در مغز انسان ایزومر let-7f بیشترین میزان بیان را داشته و به تنهایی یک سوم کل میکرو آر.ان.ای‌های بیان شده را تشکیل میدهد و همچنین در میان ۵ میکرو آر.ان.ای با بیشترین میزان بیان ۴ ایزوفرم از این خانواده وجود دارد (Shao et al., 2010).

از میان ۱۰ ایزوفرم میکرو آر.ان.ای Let-7 شناسایی شده برای خانواده آزاد ماهیان ۸ ایزوفرم در این تحقیق شناسایی شده است. یک ایزوفرم جدید و اختصاصی در این مطالعه برای آزادماهی چینوک شناسایی شده است که تا کنون در گونه‌های دیگر شناسایی نشده است هر چند ممکن این این ایزوفرم در دیگر گونه‌های نزدیک به چینوک (جنس *Oncorhynchus*) نیز وجود داشته باشد، از آنجا که تعدادی از میکرو آر.ان.ای‌ها و ایزوفرم‌های آنها در بافت‌ها و اندام‌های خاصی بیان می‌شود

بررسی سایر بافت‌های این گونه ایزوفرم‌های دیگر برای این میکرو آر.ان.ای در این گونه شناسایی شود. به طور کل ۱۲ ایزوفرم تا به حال برای این میکرو آر.ان.ای در گونه‌های مختلف شناسایی شده است که در میان آنها ایزوفرم Let-7a فراوانترین ایزوفرم این خانواده از میکرو آر.ان.ای می‌باشد (Lee et al., 2016) که نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز با این موضوع تطبیق دارد. در ماهیان مختلف تعداد متفاوتی از ایزوفرم‌های Let-7 شناسایی شده است، بیشترین تعداد ایزوفرم شناسایی شده در یک گونه ۱۰ عدد بود است (جدول ۴) که در این تحقیق ۹ ایزوفرم از آنها شناسایی شده است، حداکثر تعداد لوکوس شناسایی شده نیز ۲۰ عدد در آزاد-ماهی اقیانوس اطلس بوده است، در تحقیق حاضر ۲۹ لوکوس برای ایزوفرم‌های مختلف شناسایی شده است.

جدول ۴- تعداد ایزوفرم‌ها و لوکوس‌های شناخته شده برای ماهیان مختلف

گونه	تعداد لوکوس	تعداد ایزوفرم	منابع
<i>Salmo salar</i>	۲۰	۱۰	(Barozai, 2012) (Andreassen et al., 2013) (Bekaert et al., 2013)
<i>Cyprinus carpio</i>	۵	۵	(Zhu et al., 2012) (Yan et al., 2012) (Zhao et al., 2016)
<i>Danio rerio</i>	۱۸	۱۰	(Chen et al., 2005) (Olena and Patton, 2010)
<i>Oreochromis niloticus</i>	۱۹	۹	(Huang et al., 2012) (Xiao et al., 2014)
<i>Petromyzon marinus</i>	۷	۴	(Li et al., 2010) (Hertel et al., 2012)

یابی نشده اند، در ژنوم رفرنس این گونه قطعات با پیشوند NW نامگذاری شده اند. علاوه بر این تعداد ۷ عدد از لوکوس‌های شناسایی شده در فاصله بسیار نزدیک و کمتر از ۶۰۰ باز از لوکوس‌های دیگر قرار گرفته اند و تشکیل خوشه‌های^۱ میکرو آر.ان.ای را داده‌اند، در مورد میکرو

در گونه آزاد ماهی اقیانوس اطلس که نزدیکترین گونه به آزادماهی چینوک است تعداد ۲۰ لوکوس شناسایی شده است و در این تحقیق تعداد ۹ لوکوس بیشتر پیش بینی شده است. لوکوس‌های let-7c-1 و let-7c-2 شناسایی شده در این تحقیق بر روی قطعاتی کوچکی از ژنوم رفرنس قرار گرفته‌اند که بر روی کروموزوم‌ها مکان

¹ Cluster

اطلس برای بیان این میکرو آر.ان.ای برابر است. در این تحقیق تعداد ۷ خوشه برای let-7 در قطعاتی به طول کمتر از ۱۰۰۰ باز شناسایی شده است (جدول ۵). بنابراین تعداد لوکوس‌های شناسایی شده در این تحقیق با در نظر گرفتن لوکوس‌های پیدا شده بر روی کروموزوم‌ها و تجمیع خوشه با تعداد لوکوس‌های شناسایی شده در آزاد ماهی اقیانوس اطلس برابر است.

آر.ان.ای‌ها تشکیل خوشه‌های ژنی بسیار معمول است و تقریباً ۴۰ درصد تمام میکرو آر.ان.ای‌ها درون خوشه‌های با حداقل ۲ میکرو آر.ان.ای در قطعاتی به طول کمتر از ۳ هزار باز قرار گرفته اند (Altuvia et al., 2005). بنا براین با در نظر گرفتن این دو نکته و در نظر گرفتن هر خوشه ژنی به عنوان یک لوکوس، تعداد لوکوس‌های شناسایی شده بر روی ژنوم چینوک در این تحقیق با تعداد لوکوس‌های موجود بر روی ژنوم آزاد ماهی اقیانوس

جدول ۵- خوشه‌های let-7 در قطعات کوتاه‌تر از ۱۰۰۰ باز

رشته دی.ان.ای	انتها	ابتدا	فاصله بین لوکوس‌ها بر اساس تعداد باز	نام ایزوفرم	NCBI RefSeq ID کروموزوم در ژنوم مرجع
-	۵۲۰۰۹۲۰	۵۲۰۰۵۳۸	۲۳۱	let-7a-1	NC_037113.1
				let-7b-4	
-	۱۶۱۱۲۷۴۴	۱۶۱۱۲۳۵۳	۲۴۰	let-7a-2	NC_037111.1
				let-7b-3	
-	۱۱۷۴۴۶۵	۱۱۷۴۰۷۶	۲۳۹	let-7a-3	NC_037115.1
				let-7b-2	
+	۱۱۵۰۲۴۰۴	۱۱۵۰۲۰۴۱	۲۱۲	let-7a-4	NC_037097.1
				let-7b-1	
-	۵۰۸۹۷۰۵۸	۵۰۸۹۶۶۸۸	۳۶۸	let-7a-5	NC_037098.1
				let-7e-2	
+	۳۵۸۲۸۷۴۰	۳۵۸۲۸۲۱۷	۳۷۱	let-7a-6	NC_037103.1
				let-7e-2	
+	۸۳۱۶۸۳۶	۸۳۱۶۳۳۳	۳۴۸	let-7g-1	NC_037118.1
				let-7h-1	
-	۶۴۵۰۰۴۴۳	۶۴۵۰۰۰۶۴	۲۲۵	let-7g-2	NC_037112.1
				et-7h-2	

نتیجه گیری کلی

ژن‌های میکرو آر.ان.ای در مقیاس مکانی-زمانی، نوع سازمان یافتگی ژنومی آنها مخصوصاً حضور زیاد آنها در خوشه‌های ژنی میکرو آر.ان.ای، پراکندگی گسترده در ژنوم، قرار گرفتن در میان قطعات اینترون ژن‌های دیگر و تفاوت در عملکرد ایزومرهای مختلف از جمله عواملی می‌باشند که پیچیدگی مطالعه آنها و بررسی تاثیرات آنها بر فرایندهای زیستی به خصوص در پستانداران را

با توجه به میزان بسیار زیاد بیان این میکرو آر.ان.ای در بافت مغز و نیز توجه به این نکته که میکرو آر.ان.ای‌ها در تنظیم بیان ژن‌ها در مرحله بعد از رونویسی عمل می‌کنند و میتوان نتیجه گرفت که این میکرو آر.ان.ای‌ها در کنترل سیناپتیک پلاستیسیته و تخصصی شدن سلولهای عصبی مغز دارای نقش حیاتی هستند. نحوه بیان

توالی میکرو آر.ان.ای‌ها نسبت به سایر ژن‌ها در صورتی که نقش آنها در فرآیندهای سلولی به درستی شناخته شود میتوان در آینده برای اهداف اقتصادی به خصوص در پرورش آبزیان از کاربردهای آن در روش‌های مانند ژن درمانی استفاده کرد.

دشواری می‌کند، به نظر می‌رسد گونه‌های با پیچیدگی کمتر که دارای مزیت نسبت به سایر موجودات باشند مدل مناسبی برای مطالعه آنها فراهم می‌کند، اولین گام در مطالعه میکرو آر.ان.ای‌ها شناسایی آنها می‌باشد که از اهداف اولیه این تحقیق بوده است. با توجه به کوتاه بودن

References

۵. منابع

- Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., Margalit, H., 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 2697–2706.
- Ameres, S.L., Zamore, P.D., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14. 475–488.
- Andreassen, R., Worren, M.M., Hoyheim, B., 2013. Discovery and characterization of miRNA genes in atlantic salmon (*Salmo salar*) by use of a deep sequencing approach. *Bmc Genomics* 14. 482 p.
- Barozai, M.Y.K., 2012. Identification and characterization of the microRNAs and their targets in *Salmo salar*. *Gene* 499, 163-168.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bekaert, M., Lowe, N.R., Bishop, S.C., Bron, J.E., Taggart, J.B., Houston, R.D., 2013. Sequencing and characterisation of an extensive Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microRNA repertoire. *PLoS One* 8. e70136.
- Bizuayehu, T.T., Babiak, I., 2014. MicroRNA in teleost fish. *Genome Biology and Evolution* 6, 1911-1937.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 1097-1101.
- Bredy, T.W., Lin, Q., Wei, W., Baker-Andresen, D., Mattick, J.S., 2011. MicroRNA regulation of neural plasticity and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 96, 89-94.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 10, 1957-1966.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621-1624.
- Chen, P.Y., Maninga, H., Slanchev, K., Chien, M.C., Russo, J.J., Ju, J.Y., Sheridan, R., John, B., Marks, D.S., Gaidatzis, D., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., 2005. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes & Development* 19, 1288-1293.
- Christensen, K.A., Leong, J.S., Sakhrani, D., Biagi, C.A., Minkley, D.R., Withler, R.E., Rondeau, E.B., Koop, B.F., Devlin, R.H., 2018. Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) genome and transcriptome. *PLoS One* 13. e0195461.
- Fairchild, C.L.A., Cheema, S.K., Wong, J., Hino, K., Simo, S., La Torre, A., 2019. Let-7 regulates cell cycle dynamics in the developing cerebral cortex and retina. *Scientific Reports* 9, 1-21.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature Reviews Genetics* 9, 102-114.
- Friedlander, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., Rajewsky, N., 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature Biotechnology* 26, 407-415.
- Friedländer, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., Rajewsky, N.J.N.A.R., 2011. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research* 40, 37-52.

- Friedman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 19, 92-105.
- Garcia, D.M., Baek, D., Shin, C., Bell, G.W., Grimson, A., Bartel, D.P., 2011. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *lscy-6* and other microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 1139 p.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., Schier, A.F., 2006. Zebrafish *MiR-430* promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* 36, 154-158.
- Ha, M., Kim, V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 509-524.
- Hertel, J., Bartschat, S., Wintsche, A., Otto, C., Students of the Bioinformatics Computer, L., Stadler, P.F., 2012. Evolution of the *let-7* microRNA family. *RNA Biology* 9, 231-241.
- Hu, Z., Li, Z., 2017. miRNAs in synapse development and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 45, 24-31.
- Huang, C.W., Li, Y.H., Hu, S.Y., Chi, J.R., Lin, G.H., Lin, C.C., Gong, H.Y., Chen, J.Y., Chen, R.H., Chang, S.J., Liu, F.G., Wu, J.L., 2012. Differential expression patterns of growth-related microRNAs in the skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Science* 90, 4266-4279.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S.J.N.A.R., 2018. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 47, 152-162.
- Kwak, P.B., Tomari, Y., 2012. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 145 p.
- Lee, H., Han, S., Kwon, C.S., Lee, D., 2016. Biogenesis and regulation of the *let-7* miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell* 7, 100-113.
- Li, S.C., Chan, W.C., Hu, L.Y., Lai, C.H., Hsu, C.N., Lin, W.C., 2010. Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics* 96, 1-9.
- Loohuis, N.F.M.O., Kos, A., Martens, G.J.M., Van Bokhoven, H., Kasri, N.N., Aschrafi, A., 2012. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 89-102.
- Lugli, G., Torvik, V.I., Larson, J., Smalheiser, N.R., 2008. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *Journal of Neurochemistry* 106, 650-661.
- McGowan, H., Mirabella, V.R., Hamod, A., Karakhanyan, A., Mlynaryk, N., Moore, J.C., Tischfield, J.A., Hart, R.P., Pang, Z.P., 2018. *hsa-let-7c* miRNA Regulates Synaptic and Neuronal Function in Human Neurons. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 10, 19 p.
- Olena, A.F., Patton, J.G., 2010. Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology* 222, 540-545.
- Preusse, M., Theis, F.J., Mueller, N.S., 2016. miTALOS v2: Analyzing Tissue Specific microRNA Function. *PLoS One* 11, e0151771.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Roush, S., Slack, F.J., 2008. The *let-7* family of microRNAs. *Trends in Cell Biology* 18, 505-516.
- Shao, N.Y., Hu, H.Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Li, N., Chen, W., Khaitovich, P., 2010. Comprehensive survey of human brain microRNA by deep sequencing. *BMC Genomics* 11, 409 p.
- Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N., Kim, T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., Bertagnolli, D., Goldy, J., Shapovalova, N., Parry, S., Lee, C., Smith, K., Bernard, A., Madisen, L., Sunkin, S.M., Hawrylycz, M., Koch, C., Zeng, H., 2016. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nature Neuroscience* 19, 335-346.
- Tomari, Y., Zamore, P.D., 2005. MicroRNA biogenesis: *droscha* can't cut it without a partner. *Current Biology* 15, 61-64.

- Tsai, W.C., Hsu, S.D., Hsu, C.S., Lai, T.C., Chen, S.J., Shen, R., Huang, Y., Chen, H.C., Lee, C.H., Tsai, T.F., Hsu, M.T., Wu, J.C., Huang, H.D., Shiao, M.S., Hsiao, M., Tsou, A.P., 2012. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 122, 2884-2897.
- Xiao, J., Zhong, H., Zhou, Y., Yu, F., Gao, Y., Luo, Y.J., Tang, Z.Y., Guo, Z.B., Guo, E.Y., Gan, X., Zhang, M., Zhang, Y.P., 2014. Identification and Characterization of MicroRNAs in Ovary and Testis of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Using Solexa Sequencing Technology. *Plos One* 9. e86821.
- Yan, X., Ding, L., Li, Y., Zhang, X., Liang, Y., Sun, X., Teng, C.B. 2012. Identification and profiling of microRNAs from skeletal muscle of the common carp. *PLoS One* 7. e30925.
- Zhao, L., Lu, H., Meng, Q., Wang, J., Wang, W., Yang, L., Lin, L. 2016. Profilings of MicroRNAs in the Liver of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Infected with *Flavobacterium columnare*. *International Journal of Molecular Sciences* 17. 566 p.
- Zhu, Y.P., Xue, W., Wang, J.T., Wan, Y.M., Wang, S.L., Xu, P., Zhang, Y., Li, J.T., Sun, X.W. 2012. Identification of common carp (*Cyprinus carpio*) microRNAs and microRNA-related SNPs. *BMC Genomics* 13. 413 p.

