Shahid Bahonar University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Iranian Biotechnology Society

Identification of key genes and microRNAs involved in the *Androctonus Crassicauda* apoptosis pathway

Fatemeh Salabi

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: f.salabi@rvsri.ac.ir

Hedieh Jafari

Assistant Professor, Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: h.jafari@rvsri.ac.ir

Alireza Forouzan

Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: alireza.forouzan@gmail.com

Mohammad Nemati

Assistant Professor, Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: dr_mnemati@yahoo.com

Abstract

Objective

The occurrence of planned cell death or apoptosis as a protected method is controlled by a number of genes that used to remove unnecessary cells. This cellular event is involved in immune and disease-related systems. Apoptosis is a cellular regulatory mechanism that balances the effects of cell proliferation and cell death. In the path of apoptosis, many genes and molecules are involved. Recently, developments using the RNAseq technique have shown that microRNAs play an important role in regulating planned cell death or apoptosis. The purpose of this study was to identify key genes and micro-RNAs affecting the apoptosis pathway in *Androctonus crassicauda* scorpions.

Materials and methods

In this study, after transcriptome sequencing of venom glands of *A. crassicauda* scorpions using Illumina HiSeq 2000 platform and transcriptome assembly using Trinity software, the most important transcripts of the scorpion venom gland involved in apoptosis were identified using the KEGG database. Drawing of the apoptosis gene network with String software, analyzing the network of protein interactions and identifying key genes using cytoscape software and investigating the ontology of genes by the WebGestalt database were done. In addition, after identifying the scorpion microRNAs using homogeneous searches, the MRTarBase, TarBase, miRecords, and MirNet software programs were utilized to prediction of target genes and drawing a protein-microRNA interaction network.

Results

Three pathways associated with apoptosis were identified, and 103 proteins were extracted from those. The results of protein network analysis revealed that 30 key genes involved in apoptosis were identified that according to obtained results, the most effective key genes involved in apoptosis are Akt1, bsk, Jra, Dronc, and rl. The results of statistical analysis of protein-microRNA interaction network also showed that mir-7-5p microRNA has the highest value.

Conclusions

The results of this study showed that microRNAs play an essential role in the regulation of many genes in the apoptosis pathway and can be used to regulate the expression of genes.

Keywords: Scorpion of *Androctonus Crassicauda*, apoptosis gene network, interaction of protein-microRNA.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Salabi F*. Jafari H. Forouzan AR. Nemati M (2021) Identification of key genes and microRNAs involved in the *Androctonus Crassicauda* apoptosis pathway. Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 115-136.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 115-136. DOI: 10.22103/jab.2021.16141.1249

Received: February 6, 2021. Accepted: March 3, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

شناسایی ژن‌ها و میکرو RNAهای کلیدی درگیر در مسیر آپوپتوزیس عقرب *Androctonus crassicauda*

فاطمه ثعلبی

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: f.salabi@rvsri.ac.ir

هدیه جعفری

استادیار، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: h.jafari@rvsri.ac.ir

علیرضا فروزان

گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: alireza.forouzan@gmail.com

محمد نعمتی

استادیار، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: dr_mnemati@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۳

چکیده

هدف: رخداد مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوزیس به‌عنوان روش حفاظت شده، تحت کنترل تعدادی ژن قرار دارد که جهت حذف سلول‌های غیر ضروری بکار می‌رود. این رویداد سلولی در سیستم‌های مرتبط با ایمنی و بیماری دخیل است. آپوپتوزیس یک مکانیسم تنظیم‌گر سلولی است که اثرات تکثیر سلولی و مرگ سلولی را متعادل می‌کند. در مسیر آپوپتوزیس، ژن‌ها و مولکول‌های فراوانی درگیر هستند. اخیرا گسترش تولید داده‌ها با استفاده از تکنیک RNAseq نشان داده که میکروRNAها، نقش مهمی در تنظیم مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوزیس بازی می‌کنند. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌ها و میکروRNAی کلیدی موثر در مسیر آپوپتوزیس در عقرب‌های *آندروکتونوس کراسیکودا* بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش پس از توالی‌یابی ترانسکریپتوم غده زهر عقرب‌های *اندوروکتونوس کراسیکودا* با استفاده از پلتفرم ایلومینا Hiseq ۲۰۰۰ و پیکربندی ترانسکریپتوم با استفاده از نرم‌افزار Trinity، مهم‌ترین پروتئین‌های ترانسکریپتوم غده زهر عقرب دخیل در آپوپتوزیس با استفاده از پایگاه اطلاعاتی KEGG شناسایی شدند. رسم شبکه ژنی آپوپتوزیس با نرم افزار استرینگ، تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار سایتواسکیپ و بررسی هستی شناسی ژن‌های کلیدی به وسیله پایگاه WebGestalt صورت گرفت. علاوه‌برآن پس از شناسایی میکروRNAهای عقرب با استفاده از جستجوی همسانی، پیش‌بینی ژن‌های هدف و رسم شبکه میانکنش پروتئین- میکروRNA توسط برنامه‌های miRTarBase, TarBase, miRecords, و نرم افزار miRNet انجام گرفت.

نتایج: سه مسیر مرتبط با آپوپتوزیس شناسایی شدند که ۱۰۳ پروتئین از آن‌ها استخراج شدند. نتایج به دست آمده از آنالیز شبکه برهمکنش پروتئینی منجر به شناسایی ۳۰ ژن کلیدی دخیل در بروز آپوپتوزیس شد که بر اساس نتایج بدست آمده، موثرترین ژن‌های کلیدی درگیر در بروز آپوپتوزیس Akt1، bsk، Jra، Dronc و rl هستند. نتایج تجزیه و تحلیل آماری شبکه برهمکنش پروتئین- میکروRNA نیز نشان داد که میکروRNAی mir-7-5p بیش‌ترین ارزش را دارا می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان داد که میکروRNAها در تنظیم بسیاری از ژن‌های مسیر آپوپتوزیس نقش اساسی ایفا می‌کنند و می‌توان برای کنترل بیان ژن‌ها از آن‌ها کمک گرفت.

کلیدواژه‌ها: عقرب *آندروکتونوس کراسیکودا*، شبکه ژنی آپوپتوزیس، برهمکنش پروتئینی- میکروRNA.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ثعلبی فاطمه، جعفری هدیه، فروزان علیرضا، نعمتی محمد (۱۴۰۰) شناسایی ژن‌ها و میکرو RNAهای کلیدی درگیر در مسیر آپوپتوزیس عقرب *Androctonus crassicauda*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۱)، ۱۱۵-۱۳۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

عقرب‌ها یکی از قدیمی‌ترین بی‌مهرگان می‌باشند که بیش از ۴۰۰ میلیون سال در حال زیست هستند (Dunlop 2010). این جانوران از برخی از پروتئین‌های موجود در زهر خود برای شکار طعمه و همچنین بعنوان یک مکانیزم دفاعی در برابر نفوذ میکروبی استفاده می‌کنند (Bucaretchi et al. 2014). عقرب *آندروکتونوس کراسیکودا* (*Androctonus crassicauda*) یکی از خطرناک‌ترین کژدم‌های خوزستان و جهان است و شناخت ژن‌های کدکننده پپتیدهای سازنده آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

با وجود گسترش مطالعات در زمینه شناسایی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های زهر عقرب به ویژه با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید، هنوز اطلاعات ژنتیکی دقیقی در مورد ژن‌های دخیل در وقوع آپوپتوزیس در گونه‌های مختلف عقرب موجود نیست (2013 .Rendon-Anaya et al. 2012; Abdel-Rahman et al). در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است و تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود (;Mohammadabadi et al. 2018 Ahsani et al. 2019a). محیط یکی از عوامل کنترل کننده بیان ژن می‌باشد و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Ahsani et al. 2019b). علاوه‌برآن، مقدار محصولات ژن که در همان بافت و سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده نیز موجب تنظیم بیان آن ژن می‌شوند (Mohammadabadi et al. 2017).

اخیرا تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (RNA-Seq) بعنوان یک ابزار قدرتمند جهت بررسی ترانسکریپتوم ارگانیسم‌های مختلف تبدیل شده که از آن می‌توان جهت شناسایی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های سازنده زهر عقرب استفاده کرده و اقدام به رسم شبکه ژنی نمود و روابط بین ژن‌ها را مشخص کرد. رخداد مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوزیس به‌عنوان روش حفاظت شده تحت کنترل تعدادی ژن قرار دارد که جهت حذف سلول‌های غیر ضروری بکار می‌رود. این رویداد سلولی در سیستم‌های مرتبط با ایمنی و بیماری دخیل است (Kerr et al. 2013). آپوپتوزیس در مراحل متفاوت از تکامل زیستی موجود زنده نقش دارد و فرآیندی است که به شدت کنترل می‌شود و هرگونه اختلال در تنظیم آن ممکن است منجر به فرار از مرگ سلولی برنامه ریزی شده گردد، که یک ویژگی بارز سرطان است (Forstemann et al, 2005). مرگ سلولی، به ویژه آپوپتوز، یکی از موضوعاتی است که به شدت مورد توجه دانشمندان قرار گرفته و اخیرا مطالعات بسیاری برای بررسی ساز و کار این مسیر مهم زیستی و ملکول‌های تنظیم کننده آن صورت گرفته است (Xu and Mo 2012). در مسیر آپوپتوز، مولکول‌های فراوانی مانند میکروRNAها (miRNA) درگیر هستند. میکروRNA ها گروهی از RNAهای تک رشته ای غیر کدکننده پروتئین به طول تقریبا ۲۰ الی ۲۵ نوکلئوتیـد هسـتند که در تمام مو جودات یافت شده اند و نقش کلیدی در تنظیم فرایندهای سلولی نظیر رشد،تمایز و مرگ سلولی و همچنین تنظیم بیان ژن‌های کدکننده پروتئین در سطح پس از رونویسی دارند (Ambros 2004). بعنوان مثال نشان داده شده است که AKT یک تنظیم کننده کلیدی در بقا و تکثیر سلولی است و با افزایش خطر بروز سرطان روده بزرگ مرتبط است که اخیر شواهد نشان داده که میکروRNAها نقش اصلی در تنظیم این مسیر ایفا می‌کنند (Xu and Mo 2012). میکروRNA ها می‌توانند با اتصال به قسمت ۳` ناحیه ترجمه نشده (UTR) mRNA هدف، موجب تخریب رونوشت یا سرکوب ترجمه ژن هدف گردند و از این طریق به‌طور مستقیم بر بیان ژن تاثیر گذارند (Forstemann et al. 2005; Cai et al. 2004). بیش از ۷۰ درصد از

میکروRNAها در اینترون یا اگزون ژن‌های کد کننده پروتئین قرار دارند و بقیه در مناطق بین ژنتیکی آن واقع شده‌اند (Altuvia 2005).

میکروRNAها به‌طور کلی توسط RNA پلیمراز II، تحت عنوان پری میکروRNAها (pri-miRNAs) رونویسی می‌شوند. پری میکروRNAها پس از آن توسط آنزیم RNAse III پردازش شده و به یک ساختار حلقه‌ای با طول ۷۰ نوکلئوتیدی تبدیل می‌شوند که میکروRNAهای پیش‌ساز (pre-miRNA) نامیده می‌شود (Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004; Kim 2005). میکروRNAهای پیش‌ساز پس از آن توسط آنزیم Exportin-5 (XPO5) از هسته به درون سیتوپلاسم انتقال یافته تا به صورت میکروRNAهای دو رشته‌ای بالغ پردازش شوند. میکروRNAهای پیش‌ساز در طی تکامل به میکروRNAها بالغ، از محافظت شوندگی کمی برخوردار هستند (Cullen 2004). در سیتوپلاسم، میکروRNAهای پیش‌ساز توسط آنزیم RNAse III دیگری بنام اندونوکلئاز Dicer پردازش می‌شود تا به میکروRNAهای بالغ با طول ۱۸–۲۳ نوکلئوتید تبدیل شوند. این میکروRNAهای بالغ به یک مجموعه چند پروتئینی بنام RISC (RNA-induced silencing complex) متصل می‌شود، این مجموعه پروتئینی به‌طور خاص یک ریبونوکلئوپروتئینی (ribonucleoprotein) است که دربرگیرنده‌ی یک رشته از یک قطعه RNA تک رشته‌ای (single-stranded RNA) مانند میکرو RNA یا یک قطعه RNA دو رشته‌ای مانند siRNA (double-stranded small interfering RNA) است. RNA تک رشته‌ای به‌عنوان الگویی برای RISC برای تشخیص mRNA مکمل عمل می‌کند (Cullen 2004; Xu and Mo 2012). پس از یافتن mRNA هدف، یکی از پروتئین‌های موجود در RISC به نام آرگونات (Argonaute)، mRNA را فعال کرده و برش می‌دهد. این فرآیند که در بسیاری از یوکاریوت‌ها یافت می‌شود و RNAi (RNA interference) خوانده می‌شود یک فرایند اساسی در خاموش کردن ژن‌ها و دفاع در برابر عفونت‌های ویروسی است (Knight and Bass 2001). مطالعات بیشماری نشان داده‌اند که میکروRNAها معمولا mRNAهای متعددی را هدف قرار می‌دهند و آن‌ها می‌توانند به اصطلاح به‌عنوان apoptomiRs نیز عمل کنند. apoptomiRs میکروRNAهای درگیر در آپوپتوزیس می‌باشند که در مطالعات زیادی اهمیت آن‌ها در تنظیم دو فرآیند مرگ سلولی، آپوپتوزیس و نکروپتوز، و نقش آن‌ها در کنترل شبکه‌های مولکولی مورد تحلیل قرار گرفته است (Visalli et al. 2018).

با این وجود تحقیقات دقیق‌تری لازم است تا نقش هر میکروRNA در آپوپتوزیس مشخص گردد. بنابراین با توجه به اهمیت این موضوع در گونه‌های مختلف از جمله عقرب‌ها و اهمیت زهر آن‌ها جهت تولید داروهای جدید، شناخت آپوپتوزیس و میکرو RNAهای تنظیم کننده آن در عقرب لازم و ضروری به نظر می‌رسد. به همین جهت در این مطالعه به بررسی ژن‌های ترانسکریپتوم غده زهر عقرب دخیل در آپوپتوزیس پرداخته شد و میکرو RNAهای تنظیم کننده آپوپتوزیس نیز پیش‌بینی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و استخراج RNA: عقرب‌های *A. Crassicauda*، توسط متخصصین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با استفاده از چراغ U.V از نقاط مختلف استان خوزستان جمع‌آوری شدند و بلافاصله توسط جعبه‌های مخصوص نگهداری عقرب به آزمایشگاه بندپایان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور– اهواز انتقال داده شدند. شناسایی عقرب‌ها و جداسازی نر و ماده‌ها در آزمایشگاه عقرب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی توسط افراد متخصص با بررسی سرپوش تناسلی و مشاهده منافذ تناسلی در ماده یا قلاب تناسلی در نر صورت گرفت. جهت استخراج RNA، ابتدا عقرب‌ها به روش شوک الکتریکی سم‌گیری شدند. حدود ۷۲ ساعت پس از سم‌گیری، غده زهر عقرب‌ها جداسازی شد و با استفاده از هاون چینی و ازت مایع پودر گردید. استخراج RNA از غده زهر عقرب‌ها با استفاده از کیت تجاری کیاژن (RNeasy Mini Kit - Qiagen) طبق دستور العمل شرکت صورت گرفت و پس از تایید کیفیت نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ و ژل الکتروفورز افقی، نمونه‌هایی با کیفیت مناسب جهت توالی‌یابی paired- end به شرکت ماکروژن کره ارسال گردیدند. فرایند توالی‌یابی توسط دستگاه Illumina Hiseq 2000 و مطابق دستور العمل مربوط به شرکت ماکروژن انجام شد.

بررسی کمی و کیفی داده‌ها: تعیین کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FASTQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) تحت سیستم عامل لینوکس انجام گردید. برای حذف خوانش‌هایی با کیفیت پایین و یا توالی‌های آداپتورها و پرایمرها از نرم‌افزار Trimmomatic استفاده شد (Lohse et al. 2012). خوانش‌های پیرایش شده پس از تایید کیفیت مجدد با نرم‌افزار FASTQC مورد تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی قرار گرفتند.

هستی‌شناسی ژن ها (Gene ontology): پس از ساخت ترانسکریپتوم با استفاده از نرم‌افزار Trinity (ورژن ۲,۱۰,۰) توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های سازنده زهر مشخص شد و سپس جهت تجزیه و تحلیل فرایندهای بیولوژیکی و مسیرهای زیستی از پایگاه اطلاعاتی DAVID به آدرس https://david.ncifcrf.gov/ استفاده شد (Dennis et al. 2003). این پایگاه با اتصال به پایگاه‌های دیگری مانند GO و KEGG به بررسی فرایندهای بیولوژیکی خاص که ژن‌ها در این فرایند دخالت دارند و همچنین رتبه‌بندی این فرایندها، بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیکی ژن‌ها می‌پردازد. به‌منظور بررسی برهمکنش و ارتباط بین ژن‌های درگیر در مسیر آپوپتوزیس از نرم افزار STRING 10 و جهت تجزیه و تحلیل شبکه و مجسم سازی اطلاعات از نرم‌افزار سایتواسکیپ ورژن ۱.۷.۳ استفاده شد. در نهایت شبکه‌ی آپوپتوزیس مرتبط با داده‌های عقرب با استفاده از مجموع داده‌های *Drosophila melanogaster* در پایگاه استرینگ به آدرس https://string-db.org/ رسم و مورد آنالیز قرار گرفت. این شبکه توسط افزونه cytoNCA موجود در Cytoscape و بر اساس شاخص‌های مرکزیت، درجه (Degree) و گلوگاه (Betweenness)، تجزیه و تحلیل شد. گره‌های واجد درجه بالا در شبکه به عنوان hub در نظر گرفته شدند.

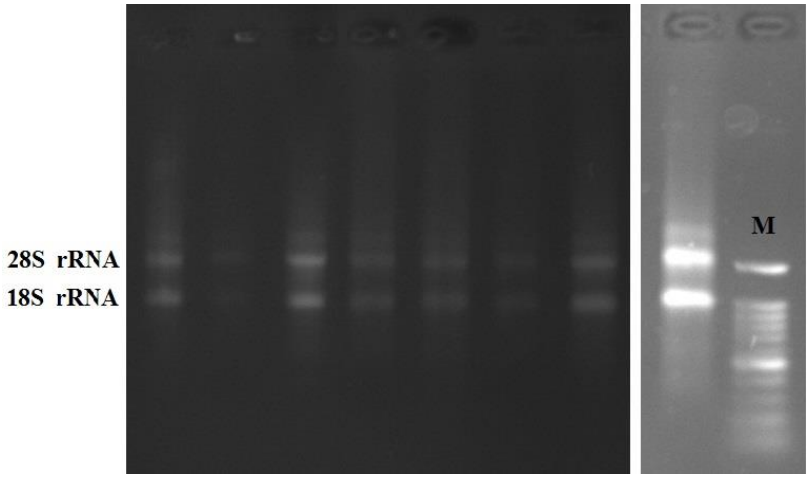
کلاسترها توسط الگوریتم MCODE (ftp://ftp.mshri.on.ca/pub/BIND/Tools/MCODE) تعیین و بررسی گردیدند (Bader et al. 2003). بررسی مسیر ژن آنتولوژی (جایگاه سلولی، عملکرد مولکولی و فرایندهای زیستی) مرتبط با ژن‌های هاب نیز با استفاده از پایگاه داده تحت وب WebGestalt (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) به آدرس http://www.webgestalt.org/ صورت گرفت.

شناسایی میکروRNAها توسط جستجوی همسانی (Homology Search): پیش از جستجوی میکروRNAهای بالقوه در عقرب *A. Crassicauda*، توالی‌های پیش‌ساز میکروRNAهای شناخته شده حشره *D. melanogaster* و انسان از دیتابیس miRBase (http://www.mirbase.org/) بارگیری شد Griffiths-Jones et al. 2006) و از داده‌های بارگیری شده دیتابیس ساخته شد. پس از آن جستجوی توالی میکروRNAهای عقرب *A. Crassicauda* علیه دیتابیس میکروRNAهای بارگیری شده با استفاده از BLASTn با پارامترهای پیش فرض و *e*-value 0.01 انجام شد. در نهایت نتایج بلاست مورد بررسی قرار گرفتند و دو معیار برای انتخاب میکروRNAهای همولوگ در نظر گرفته شد: ۱- درصد همترازی بیش از ۹۰ درصد بین میکروRNAهای عقرب و مجموعه مرجع (میکرو RNAهای همولوگ شناخته شده)؛ ۲- تفاوت توالی میکروRNAهای عقرب و مجموعه مرجع نباید بیش از ۳bp باشد.

پیش بینی ژن‌های هدف: در حیوانات، استفاده از روش‌های محاسباتی برای شناسایی میکروRNAها، بسیار چالش برانگیز است. این به این دلیل است که میکروRNAهای حیوانات تا حد کمی مکمل mRNAهای هدف خود هستند، در حالی که، میکروRNA گیاهان کاملا یا تقریبا نزدیک ژن هدف مکمل خود می‌باشند. در این مطالعه از پایگاه‌های داده miRTarBase v8.0 و TarBase v8.0 وmiRecords برای شناسایی ژن‌های هدف میکروRNAهای پیش‌بینی شده استفاده شد. تمام سوابق موجود در پایگاه‌های داده در مجموعه‌ای از میکروRNAهای پیش‌بینی شده حفظ و ادغام شدند. در نهایت شبکه میانکنش mRNA-miRNA با استفاده از نرم افزار miRNet (https://www.mirnet.ca) ترسیم شد و ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوزیس با استفاده از پایگاه داده KEGG و بررسی منابع مشخص شده و در شبکه برجسته شدند.

نتایج و بحث

در این مطالعه به‌منظور بررسی ژن‌های درگیر در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده از تکنیک توالی‌یابی نسل جدید استفاده شد. بدین منظور، RNA از نمونه‌های غده زهر *آندروکتونوس کراسیکودا* استخراج شد و نتایج تعیین کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده توسط ژل آگارز در شکل ۱ قابل مشاهده است.

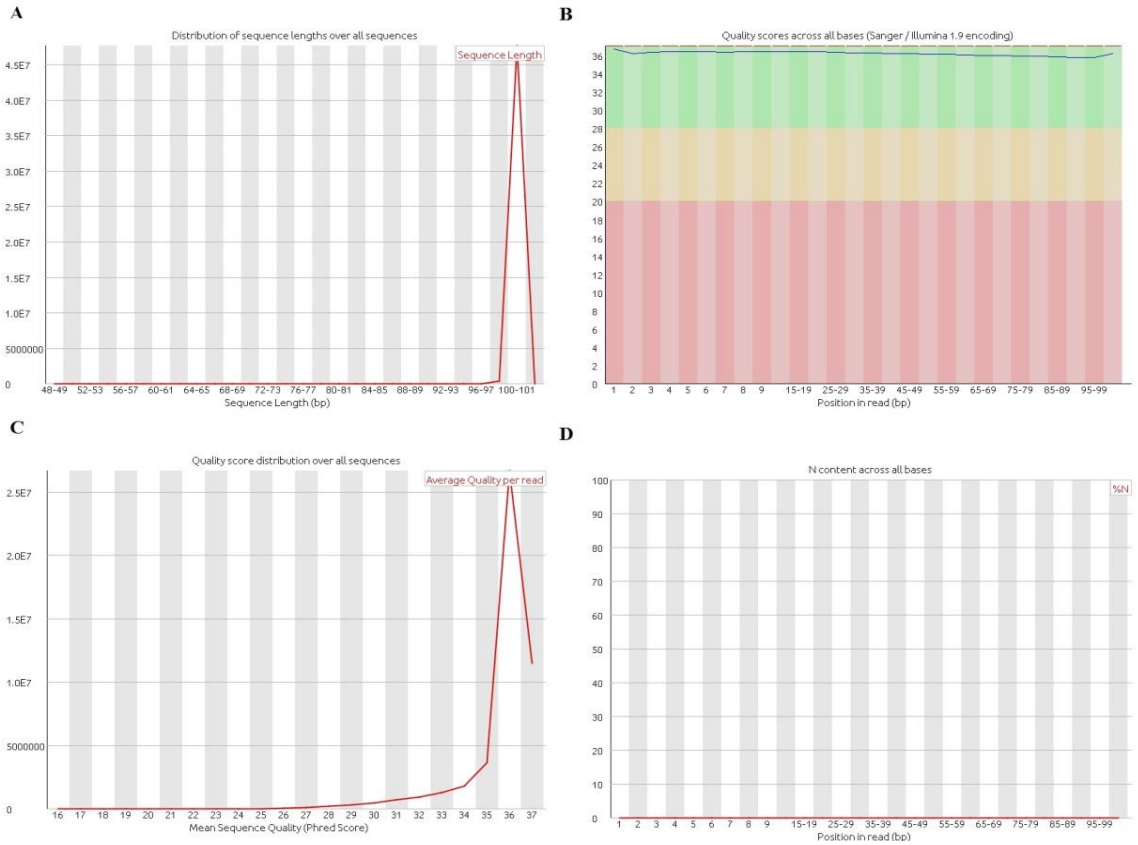


شکل۱. تعیین کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده توسط ژل آگارز (M: مارکر 100 bp)

Figure 1. Determination the quality of extracted RNA samples using agarose gel (M: 100 bp)

پس از آن توالی‌یابی ترانسکریپتوم با استفاده از پلتفرم ایلومینا Hiseq ۲۰۰۰ و تعیین کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FASTQC صورت گرفت. در نرم‌افزار FASTQC وضعیت قبول، رد یا هشدار برای آزمون‌ها ملاک سنجش کیفیت داده‌ها می‌باشد و نتایج هر آزمون بطور جداگانه و بصورت گرافیکی ارائه می‌گردد. نتایج سنجش کیفیت داده‌ها نشان داد که تمام داده‌های این تحقیق در وضعیت قبول قرار دارند و از کیفیت خوبی برخوردار هستند. برای نمونه، نتایج مربوط به یک داده در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج پیکربندی ترانسکریپتوم نشان داد که در مجموع ۹۵۲۷۲۵ کانتیگ ساخته شد که از این تعداد ۵۸۵۱۷۷ یونی‌ژن به دست آمد.

توالی ترانسکریپت‌های عقرب با فرمت فستا در پایگاه KEEG بارگذاری شد که یکی از نتایج آن شناسایی ۳ مسیر مرتبط با مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بود. در مجموع ۱۰۳ پروتئین درگیر در این مسیرها استخراج شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار استرینگ و مجموع داده *D. melanogaster* شبکه برهمکنش میان پروتئین‌ها رسم شد. نتایج تجزیه و تحلیل شبکه ژنی مربوط به ژن‌های مسیر آپوپتوزیس عقرب *A. Crassicauda* با نرم افزار استرینگ، در جدول ۱ گزارش شده است. علاوه بر آن تجزیه و تحلیل شبکه و مجسم سازی اطلاعات با نرم‌افزار سایتواسکیپ با افزونه MCODE و cytoNCA نیز صورت گرفت که نتایج حاصل از آنالیز با افزونه cytoNCA نشان داد که از مجموع ۱۰۳ ژن، ۳۰ ژن در وقوع آپوپتوزیس دخیل است و از این میان ۱۰ ژن دارای بیشترین درجه اثر متقابل با دیگر ژن‌ها هستند و می‌توانند بعنوان ژن‌های هاب در شبکه در نظر گرفته شوند. مشخصات پروتئین‌های هاب در جدول شماره ۲ آورد شده است. نتایج گزارش شده در جدول شماره ۲ نشان داد که بر اساس درجه (Degree) ژن‌های Akt1، bsk و Jra بیشترین ارزش را دارند و بر اساس مرکزیت بینابینی (Betweenness) بیشترین ارزش متعلق به ژن‌های bsk، Dronc و rl به ترتیب می‌باشد. نتایج تجزیه و تحلیل کلاسترهای پروتئینی تشکیل شده با استفاده از افزونه MCODE نیز در شکل ۳ گزارش شده است.



شکل۲. گزارش کیفیت توالی RNA-seq **از مجموعه داده‌های** *Androctonus Crassicauda* **توسط نرم افزار** Fastqc. A) **توزیع طول خوانش‌ها** B) **کیفیت نوکلئوتیدهای خوانده شده** C) **کیفیت توالی‌های خوانده شده** D) **محتوای نوکلئوتیدهای خوانش نشده**

Figure 2. RNA-seq sequence quality report of *Androctonus Crassicauda* data set by Fastqc software. A) Length distribution of reads B) The quality of the read C) The quality of the sequences D) The content of the un-read nucleotides

مسیر ژن آنتولوژی ژن‌های هاب توسط WebGestalt بررسی شد و نتایج آن در شکل ۴ آمده است. بررسی نتایج آنالیز شبکه آپوپتوزیس و هستی شناسی ژن‌های هاب روشن ساخت که پروتئین کینازها از مهم‌ترین فاکتورهای تنظیم رشد، تکثیر سلولی، تمایز سلولی، رشد و سرکوب آپوپتوزیس می‌باشند که از مهم‌ترین عناصر تاثیرگذار بر رخداد سلولی آپوپتوزیس می‌باشند. بعنوان مثال ژن Akt1 پروتئین کینازی است که تنظیم کننده رشد سلولی و اندازه ارگان‌ها است و یکی از ژن‌های کلیدی سرکوب کننده آپوپتوزیس می‌باشد که این کار را با غیر فعال کردن ترکیبات آپوپتوتیک انجام می‌دهد. Akt (پروتئین کیناز B) دارای سوبستراهای بسیاری می‌باشد و از مسیرهای مختلفی باعث مهار مرگ سلولی می‌گردد و از این رو، این مسیر را به عنوان مسیر بقای سلولی نیز نامگذاری کرده‌اند (Datta et al. 1999).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۱. تجزیه و تحلیل شبکه ژنی ژن‌های مسیر آپوپتوزیس در عقرب *A. Crassicauda* با استفاده از نرم افزار استرینگ

Table 1. Gene analysis of apoptosis pathway genes in Scorpion of *A. Crassicauda* using string software

number of nodes	31
number of edges	103
average node degree	6.65
average local clustering coefficient	0.562
expected number of edges	14
PPI enrichment p-value	< 1.0e-16

جدول ۲. مشخصات پروتئین‌های رتبه بالا در شبکه ژنی مسیر آپوپتوزیس عقرب *A. Crassicauda*

Table 2. Characterization of high-ranking proteins involved in gene network of apoptosis pathway in Scorpion of *A. Crassicauda*

Gene	Degree	Network	Closeness	Betweenness
Akt1	16	11.926	0.690476	113.28
bsk	15	9.2191	0.630435	122.58
Jra	15	12.589	0.659091	72.027
Dronc	14	9.8312	0.644444	119.18
tefu	12	8.8167	0.604167	58.258
crc	12	6.9333	0.58	108.26
Traf6	11	8.0778	0.591837	24.851
rl	11	7.6722	0.58	116.36
Parp	10	7.4167	0.58	41.456
Dark	10	6.5159	0.54717	38.433

ژن Akt از واسطه‌های مهم بقای سلولی در پاسخ به تحریک فاکتور رشد و نفوذ Ca^{2+} می‌باشد. تعدادی از پروتئین‌های درگیر در آپوپتوزیس به‌عنوان بسترهای مستقیم Akt شناسایی شده‌اند، از جمله گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK-3)، BAD، caspase-9 و فاکتورهای رونویسی Forkhead، که در هنگام فسفوریلاسیون توسط Akt سرکوب می‌شوند (Kim et al. 2001). مطابق با این تحقیق، مطالعات بسیاری نقش این ژن را در آپوپتوزیس گزارش

کرده‌اند (Kim et al. 2001; Green et al. 2013). علاوه بر آن، ژن bsk که در واقع Stress-activated protein kinase است و به JNK نیز مشهور است، در پاسخ به استرس محیطی و محرک‌های متنوعی مانند آپوپتوزیس و تمایز یا تکثیر فعال می‌گردد و باعث تنظیم رونویسی می‌گردد. در مجموع در تحقیق حاضر، شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به مرگ سلولی برنامه ریزی شده در عقرب و بازسازی شبکه‌های ژنی و برهم‌کنش پروتئینی مربوطه، منجر به شناسایی ژن‌های هاب در وقوع آپوپتوزیس گردید که انتظار می‌رود از کلیدی‌ترین ژن‌های درگیر در آپوپتوزیس در عقرب باشند.

شکل ۳. خوشه‌های پروتئینی (کلاسترها) در شبکه ژنی مسیر آپوپتوزیس عقرب *A. Crassicauda*. پروتئین seed با رنگ زرد مشخص شده‌اند. A) خوشه پروتئینی ۱ با رتبــه ٦ است. B) خوشه پروتئینی ۲ با رتبه ٤ است.

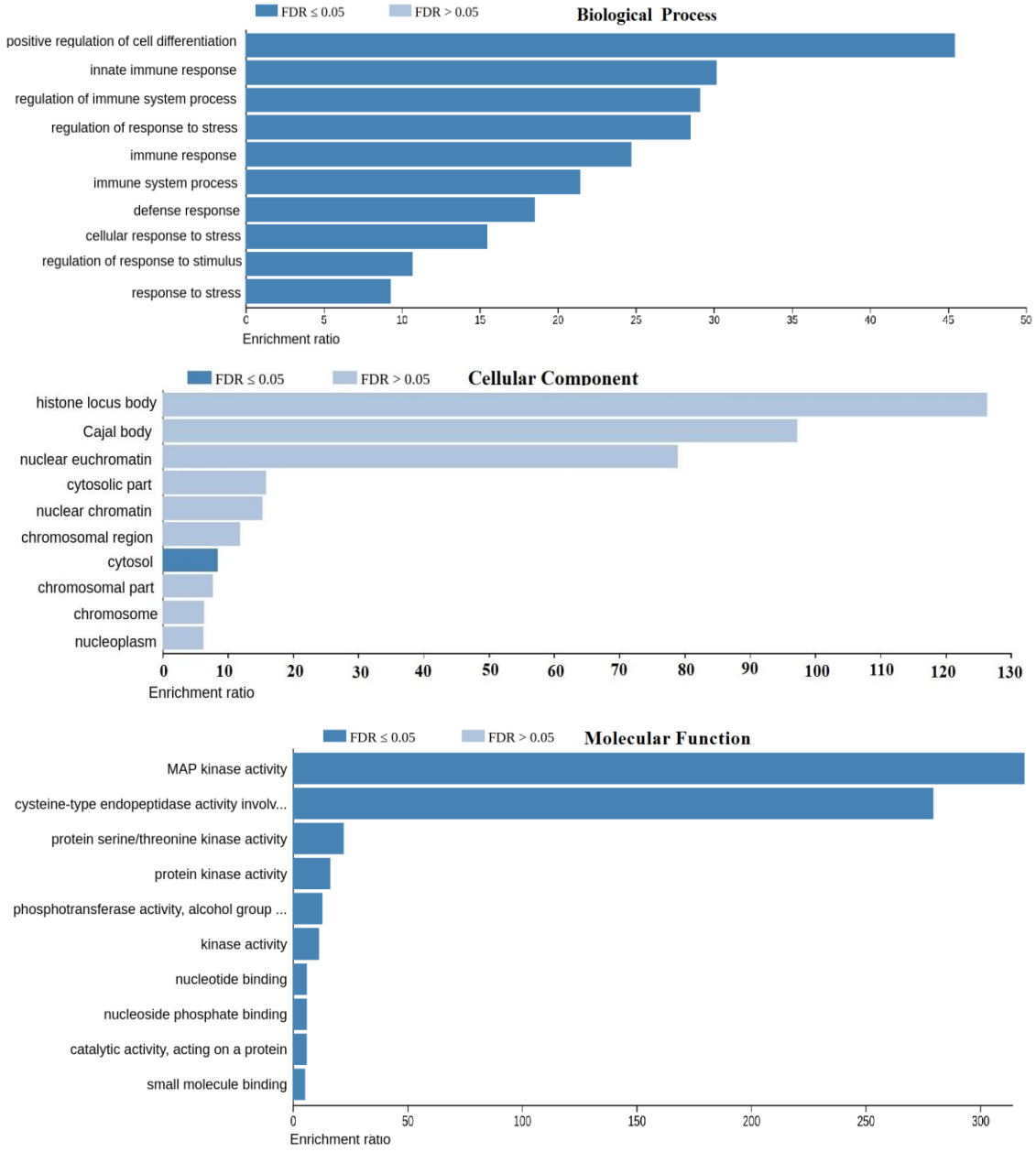
Figure 3. Protein clusters in gene network of apoptosis pathway in Scorpion of *A. Crassicauda*. Seed proteins are marked in yellow. A) Protein cluster 1 with rank of 6. B) Protein cluster 2 with rank of 4.

برای شناسایی میکروRNAهای درگیر در آپوپتوزیس در مرحله اول تمام میکروRNAهای همولوگ شناسایی شدند. پس از آن ژن‌های هدف میکروRNAهای شناسایی شده با استفاده از برنامه‌های miRTarBase, TarBase ,miRecords پیش بینی شدند و تنها میکروRNAهای همولوگ با شرایط ذکر شده در مواد و روش که دارای ژن هدف درگیر در مسیر آپوپتوزیس بودند برای مرحله بعد انتخاب شدند که شامل ۹ میکروRNA می‌باشند. پس از آن، شبکه برهمکنش پروتئین- میکروRNA در وب سایت MirNet رسم شد.

لیست میکروRNAهایی که ژن‌های هدف برای آن‌ها پیش‌بینی شده در جدول ۳، شبکه برهمکنش پروتئین- میکروRNA در شکل ۵ به تصویر کشیده شده است و تجزیه و تحلیل آماری شبکه برهمکنش پروتئین- میکروRNA نیز در جدول ۴ گزارش شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که بر اساس درجه (Degree) و مرکزیت بینابینی (Betweenness)، میکروRNA mir-7-5p بیشترین ارزش را درا می‌باشد. این میکروRNA، تنظیم‌گر بسیاری از ژن های درگیر در مسیر آپوپتوزیس است.

ژن‌های هدف mir-7-5p در این مطالعه شامل ژن‌های BAX, BCL2, CASP16P, CASP9, AKT3, ATF5 MYC, PARP1, PARP11, PIK3CB, PIK3CD, CDC37, CFLAR, CHP1, EIF5A2, FADD, HSPBP, PIK3CG, PIK3R3, RELA, RPRD2, SIRT2, TMED10, XIAP می‌باشند. در مطالعه‌ای که در جریان پیشرفت تومور صورت گرفته، تایید شده که بیان بیش از حد miR-7-5p، تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد، در حالی که همبستگی معکوس بین miR-5-5p و بیان SH3GLB1 مشاهده شد. مشخص شده که تعامل بین پروتئین‌های SH3GLB1 و BAX منجر به فعال سازی کاسپاز ۳ و در نتیجه آن القای آپوپتوزیس گردیده است (Liu et al. 2018).

در مطالعه دیگری نقش mir-7-5p و Bcl-2/Bax و کاسپاز بر آپوپتوزیس شرح داده شده است (Zhang et al. 2020). علاوه برآن، در مطالعات پیشین گزارش شده است که میکروRNA mir-7-5p، به‌طور قابل توجهی رشد، مهاجرت و تشکیل کلونی سلول‌های کبدی موش و انسان را در شرایط آزمایشگاهی مهار کرده و موجب القای فاز G1/G0 چرخه سلولی شد (Hu et al. 2019). شواهدی زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد miR-7 در پیشرفت سرطان‌های انسان نقش دارد. مهم‌تر از همه، محققین نشان دادند که miR-7، مسیر EGFR و Akt را در گلیوبلاستوما (Glioblastoma) مهار می‌کند (Kefas et al. 2008; Yin et al. 2019). همچنین گزارش شده که بیان بیش از حد miR-7-5p موجب مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوزیس در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدن می‌گردد (Shi et al. 2015). میکروRNA mir-7-1-3p بر اساس درجه (Degree) و مرکزیت بینابینی (Betweenness) در رده دوم قرار دارد که در این مطالعه ژن‌های هدف آن، MDM4, HSPA1B, HSP90AA1, CASP16P , AGO2 TP53INP1, می‌باشند.



شکل ٤. هستی شناسی مربوط به ۱۰ ژن کلیدی مسیر آپوپتوزیس در عقرب *A. Crassicauda*

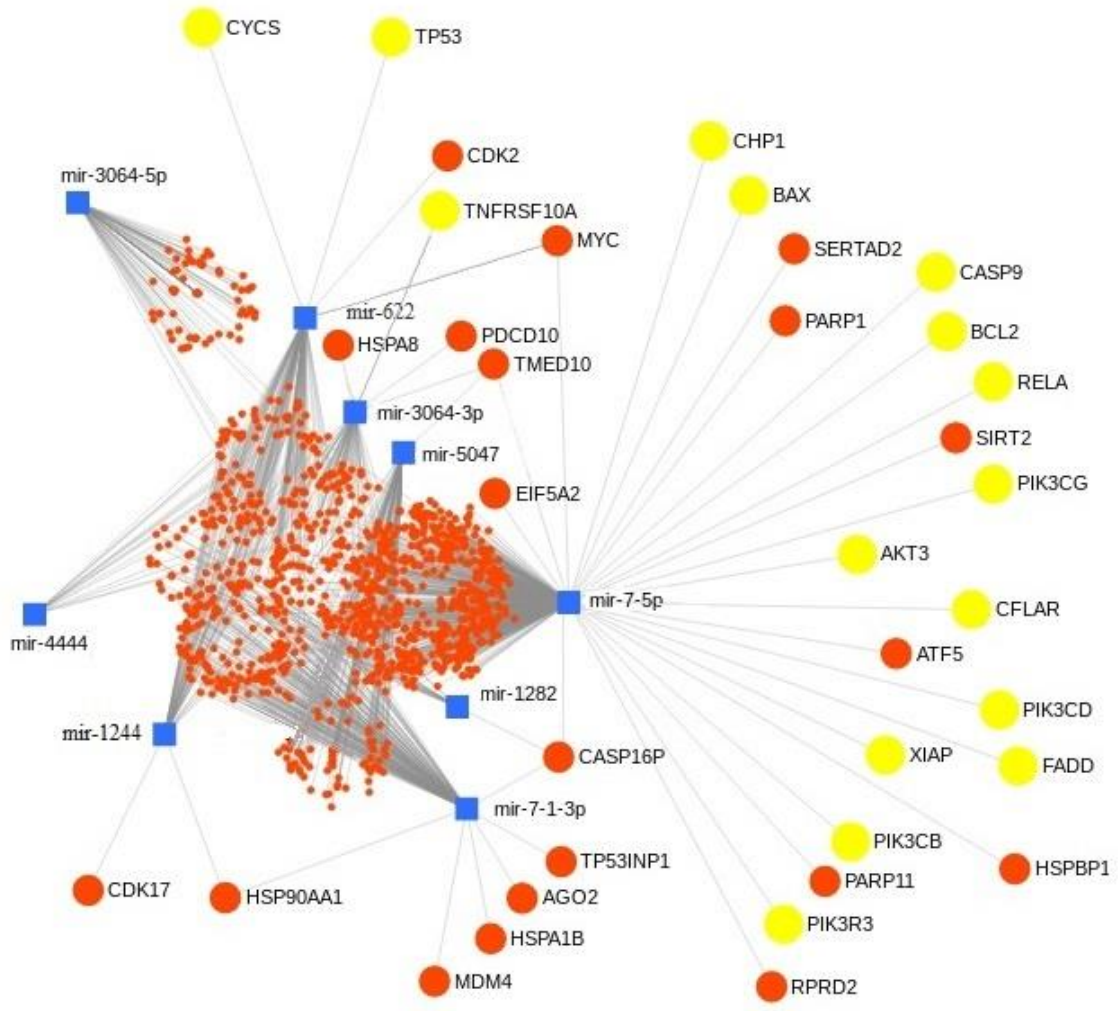
Figure 4: Gene ontology of the 10 key genes of apoptosis in Scorpion of *A. Crassicauda*

گزارش شده که میکروRNA mir-7-1-3p با مهار برخی ژن‌های هدف موجب القای آپوپتوزیس می‌گردد (Chakrabarti et al. 2016). در مطالعه‌ای بیان میکروRNA mir-7-1-3p در سلول‌های سرطانی حنجره بررسی شد و مشخص شد که بیان این میکرو RNA در سلول‌های سرطانی نسبت به نرمال تفاوت معنی‌داری را نشان داده

است (Li et al. 2016). همچنین در پژوهشی Yang و همکاران (۲۰۰۹) نقش میکروRNA mir-7 و ژن‌های p53، پروتئین شوک حرارتی (HSP60, HSP70) و caspases را در آپوپتوزیس بررسی کردند (Yang et al. 2009).

میکروRNA miR-622 نیز اثر تنظیم کنندگی بر ژن‌های CDK2، CYCS، MYC و TP53 را نشان داده که نقش آن در تنظیم آپوپتوزیس، با مطالعات پیشین همخوانی دارد. گزارش شده که، بیان میکروRNA miR-622 به‌طور معنی‌داری تکثیر و تشکیل کلونی را کاهش داده و باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌شود. در مطالعه‌ای اثر بیان بیش از حد miR-622 بر تومورهای سلول‌های سرطانی بررسی شد و روشن شد که این میکروRNA رشد تومورهای سلول‌های سرطانی را به تاخیر انداخت (Zhang et al. 2015; Song et al. 2015). در پژوهش دیگری نقش میکروRNA miR-622 در نوعی سرطان مجاری صفراوی بررسی شد. در این تحقیق آمده که بیان بیش از حد miR-622 در سلول‌های سرطانی با کاهش تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم ارتباط دارد، در حالی که مهار miR-622 نتیجه معکوس داشت. مطابق با نتایج این تحقیق، این محققین مشخص کردند که C-Myc به عنوان ژن هدف miR-622 شناخته شده است. علاوه بر این، بیان بیش از حد c-Myc می‌تواند اثرات miR-622 را در تکثیر، مهاجرت و تهاجمی شدن سلول‌های سرطانی تقویت کند (Wu et al. 2019). در مطالعه دیگری اثر miR-622 در تمایز سلول‌ها در شرایط in vitro و in vivo در سرطان معده انسان بررسی شد و گزارش شده که miR-622 نقش خود را به‌عنوان مهارکننده رشد و سرکوب‌گر تومور، از طریق مسیر سیگنالینگ p53 ایفا می‌کند که با یافته‌های این پژوهش نیز مطابقت دارد (Kim et al. 2014).

نتیجه‌گیری: رخداد مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوزیس به‌عنوان روش حفاظت شده تحت کنترل ژن‌ها قرار دارد و چنانچه از تنظیم خارج شود بیماری‌های گوناگونی از جمله سرطان را موجب می‌شود. آپوپتوزیس فرآیندی است که به شدت کنترل می‌شود و هرگونه اختلال در تنظیم آن ممکن است منجر به فرار از مرگ سلولی برنامه ریزی شده گردد. در مسیر آپوپتوز، مولکول‌های فراوانی مانند میکروRNAها درگیر هستند. میکروRNAها (miRNA) ، RNAهای غیر کدکننده کوچک با طول حدود ۱۸ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند که موجب سرکوب بیان ژن می‌گردند. اخیرا کشف شده که آن‌ها در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند ر شد، تمایز و مرگ سلولی نقش دارند. در این مطالعه به شنا سایی ژن‌های کلیدی درگیر در م سیر آپوپتوزیس در عقرب پرداخته شد و ژن‌های Akt1، bsk و Jra، Dronc و rl به‌عنوان ژن‌های کلیدی معرفی شدند. علاوه بر آن میکروRNA های همولوگ عقرب شناسایی شدند و نقش آن‌ها در مسیر آپوپتوزیس بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که میکروRNAهای mir-7-5p و mir-7-1-3p در تنظیم بسیاری از ژن‌های مسیر آپوپتوزیس نقش اساسی ایفا می‌کنند و می‌توان برای کنترل بیان ژن‌ها از این میکروRNAها کمک گرفت.



شکل ۵. شبکه برهمکنش پروتئین- میکروRNA. ژن‌های کلیدی موثر در این شبکه با رنگ زرد مشخص شده است.

Figure 5. Protein-microRNA interaction network. The key genes involved in this network are marked in yellow.

جدول ۳. لیست میکرو RNAهای شناسایی شده و ژن‌های هدف پیش‌بینی شده آن‌ها.

Table 3. List of identified microRNAs and their predicted target genes

ID	mir-7-5p	mir-7-1-3p	mir-622	mir-5047	mir-3064-3p	mir-1282	mir-1244
Accession	MIMAT0000252	MIMAT0004553	MIMAT0003291	MIMAT0020541	MIMAT0019865	MIMAT0005940	MIMAT0005896
Target	AKT3, ATF5, BAX, BCL2 CASP16P,CA SP9 CDC37, CFLAR CHP1, EIF5A2 FADD, HSPBP1 MYC, PARP1 PARP11, PIK3CB PIK3CD,PIK 3CG PIK3R3, RELA RPRD2, SIRT2 TMED10, XIAP	AGO2 CASP16P HSP90AA1 HSPA1B MDM4 TP53INP1	CDK2 CYCS MYC TP53	TMED10	HSPA8 PDCD10 TMED10 TNFRSF10A	CASP16P	CDK17 HSP90AA1

جدول ٤. تجزیه و تحلیل آماری شبکه برهمکنش پروتئین- میکرو RNA.

Table 4. Statistical analysis of protein-micro-RNA interaction network.

Id	Degree	Betweenness
mir-7-5p	578	506768.7
mir-7-1-3p	184	184951.1
mir-622	107	102678.9
mir-5047	89	84058.93
mir-3064-3p	69	68191.96
mir-1282	22	20918.72
mir-1244	59	56477.6

سپاسگزاری: حمایت مالی از این پژوهش توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران انجام شد. ما از موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی برای حمایت مالی طرح (۲-۸۳-۱۸-۹۶۰۳۵۴-۰۲۰) و از تمام همکاران محترم که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند قدردانی می‌کنیم.

منابع

احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

References

Abdel-Rahman MA, Quintero-Hernandez V, Possani LD (2013) Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion Scorpio maurus palmatus (Arachnida: Scorpionidae). Toxicon 74, 193-207.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.

Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. Nucleic Acids Res 33, 2697-2706.

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-355.

Bader GD, Hogue CW (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. BMC Bioinformatics 4, 2.

Bucaretchi F, Fernandes LC, Fernandes CB, et al. (2014) Clinical consequences of Tityus bahiensis and Tityus serrulatus scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. Toxicon 89, 17-25.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna 10, 1957-1966.

Chakrabarti M, Ray SK (2016) Anti-tumor activities of luteolin and silibinin in glioblastoma cells: overexpression of miR-7-1-3p augmented luteolin and silibinin to inhibit autophagy and induce apoptosis in glioblastoma in vivo. Apoptosis 21, 312-328.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. Genes & development 13, 2905-2927.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature 432, 231-235.

Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, et al. (2003) DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. Genome biology 4, 1-11.

Förstemann K, Tomari Y, Du T, et al. (2005) Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. PLoS Biol 3, e236.

Green BD, Jabbour AM, Sandow JJ, et al. (2013) Akt1 is the principal Akt isoform regulating apoptosis in limiting cytokine concentrations. Cell Death & Differentiation 20, 1341-1349.

Gregory RI, Shiekhattar R (2005) MicroRNA biogenesis and cancer. Cancer research 65, 3509-3512.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, et al. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic acids research 34, D140-D144.

Hu C, Zhu S ,Wang J, et al. (2019) Schistosoma japonicum MiRNA-7-5p inhibits the growth and migration of hepatoma cells via cross-species regulation of S-phase kinase-associated protein 2. Frontiers in oncology 9, 175.

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, et al. (2008) microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. Cancer research 68, 3566-3572.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 26, 239-257.

Kim AH, Khursigara G, Sun X, et al. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. Molecular and cellular biology 21, 893-901.

Kim Y-W, Kim EY, Jeon D, et al. (2014) Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. Drug design, development and therapy 8, 293.

Knight SW, Bass BL (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans. Science 293, 2269-2271.

Li JZ-H, Gao W, Lei W-B, et al. (2016) MicroRNA 744-3p promotes MMP-9-mediated metastasis by simultaneously suppressing PDCD4 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma. Oncotarget 7, 58218.

Liu M-L, Zhang Q, Yuan X, et al. (2018) Long noncoding RNA RP4 functions as a competing endogenous RNA through miR-7-5p sponge activity in colorectal cancer. World journal of gastroenterology 24, 1004.

Lohse M, Bolger AM, Nagel A, et al. (2012) RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. Nucleic acids research 40, W622-W627.

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Med Biol Res 50, e6177.

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (in Persian).

Rendón-Anaya M, Delaye L, Possani LD, Herrera-Estrella A (2012) Global transcriptome analysis of the scorpion Centruroides noxius: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. PloS one 7, e43331.

Shi Y, Luo X, Li P, et al. (2015) miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGγ. Cancer letters 358, 27-36.

Song W-H, Feng X-J, Gong S-J, et al. (2015) microRNA-622 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. Cancer biology & therapy 16, 1754-1763.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50.

Visalli M, Bartolotta M, Polito F, et al. (2018) miRNA expression profiling regulates necroptotic cell death in hepatocellular carcinoma. International Journal of Oncology 53, 771-780.

Wu Y-F, Li Z-R, Cheng Z-Q, et al. (2017) Decrease of miR-622 expression promoted the proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma cells by targeting regulation of c-Myc. Biomedicine & Pharmacotherapy 96, 7-13.

Xu M, Mo Y-Y (2012) The AKT-associated microRNAs. Cellular and molecular life sciences 69, 3601-3612.

Yang BF, Lu YJ, Wang ZG (2009) MicroRNAs and apoptosis: implications in the molecular therapy of human disease. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 36, 951-960.

Yin CY, Kong W, Jiang J, et al. (2019) miR-7-5p inhibits cell migration and invasion in glioblastoma through targeting SATB1. Oncology letters 17, 1819-1825.

Zhang R, Luo H, Wang S, et al. (2015) MiR-622 suppresses proliferation, invasion and migration by directly targeting activating transcription factor 2 in glioma cells. Journal of neuro-oncology 121, 63-72.

Zheng Y, Nie P, Xu S (2020) Long noncoding RNA CASC21 exerts an oncogenic role in colorectal cancer through regulating miR-7-5p/YAP1 axis. Biomedicine & Pharmacotherapy 121, 109628.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500