مروری بر فرآیندهای وابسته به بیولوژی MicroRNA قارچ‌ها

فاطمه صادقی: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
فاطمه پیمایی: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
سلیمان خدری: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
راحله رودی: مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
شهلا رودبار محمدی: مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
***مریم رودباری**: گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). roudbari.mr@iums.ac

تاریخ دریافت: 96/12/13 تاریخ پذیرش: 97/2/9

چکیده

microRNA ها مولکول‌های کوچکی می‌باشند که ترجمه را مهار کرده یا سبب تخریب RNA پیامبر می‌شوند. فرایندهای وابسته به RNA جهت سنتز پروتئین‌های عملکردی و ساختاری سلول‌های یوکاریوتی ضروری می‌باشند. در یوکاریوت‌ها این پروسه با رونویسی از DNA در هسته آغاز و با ترجمه RNAپیامبر به پروتئین در سیتوپلاسم خاتمه پیدا می‌کند و در نهایت RNA پیامبر تخریب می‌شود. در فرایند پروتئین‌سازی مراحل مختلفی از جمله: پوشش '5، پلی‌آدنیلاسیون، پردازش، خروج هسته‌ای و انتقال سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد که تمام این مراحل تنظیم شده تا یک بیان مطلوب صورت گیرد. به دلیل اهمیت زیاد RNA درتنظیم سنتز پروتئین، واضح است که پاتوژنز قارچ‌ها به شدت به فرایندهای وابسته به RNA جهت کنترل عفونت متکی می‌باشد. RNA مداخله گر شامل RNA های دورشته ای کوچک در قارچ‌ها می‌باشد که یا توسط ژنوم اصلی قارچ یا طی فرایند ترجمه ایجاد می‌شوند و نقش کلیدی در خاموش سازی RNA دارد. مایکوویروس‌ها نیز دسته‌ای از RNAهای دورشته ای کوچک هستند که سبب تغییر عملکرد و حتی تغییرات فنوتایپیک در قارچ‌ها می‌گردند و در پاتوژنز قارچ نقش کلیدی دارند. مطالعات اخیر استفاده از واکسن‌های RNA را در درمان عفونت‌های قارچی موثر می‌دانند. هدف از این مطلعه مروری بررسی MicroRNA قارچی و نقش آن‌ها در بیماریزایی، تحریک سیستم ایمنی و همچنین تنظیم سنتز پروتیین می‌باشد. این مقاله مروری در سال 96 انجام شده و اطلاعات موجود در آن از پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر نظیر PubMed، Google Scholar و Web of Science جمع‌آوری گردیده است و بنا به اهمیت کلیدی انواع RNA در ساز و کارهای سلول‌های قارچی، به بررسی انواع RNA و عملکرد آن‌ها و همچنین بررسی اینکه این مولکول‌ها چطور می‌توانند به عنوان یک ابزار مفید در مطالعات قارچ شناسی به ویژه ایمونوتراپی عفونت‌های قارچی مورد استفاده قرار گیرند پرداخته است.

کلیدواژه‌ها: MicroRNA، RNA مداخله گر، فرآیندهای وابسته به خاموشی ژن، بیولوژی RNA

مقدمه

مولکول RNA به دلیل داشتن جفت بازهای گوانین، آدنین، اوراسیل قادر به برقراری واکنش‌های درون‌مولکولی و بین‌مولکولی مختلفی می‌باشد که یک مزیت عمده برای آن محسوب می‌شود و بدین‌جهت کاربردهای متعددی را برای آن محقق می‌سازد (1). به دلیل اهمیت محوری RNA در تنظیم سنتز پروتئین، پاتوژن‌های قارچی تا حد زیادی متکی به فرآیندهای وابسته به RNA جهت اعمال بیماری‌زایی خود می‌باشند. شایان‌ذکر است که پروتئین‌های متصل شونده به RNA فاکتورهای کلیدی در عملکرد RNA محسوب می‌شوند. در مورد قارچ بیماریزای کاندیدا (Candida) یک نوعی از این پروتئین‌ها بنام She3 در انتقال RNA پیامبر (RNA(mRNA) Mesenger) وابسته به اکتین در طول عفونت کاندیدا آلبیکنس (Candida albicans) نقش مهمی دارد. نقل و انتقال RNAپیامبر در طول مدت عفونت اولیه بسیار حیاتی و مهم است (2). MicroRNA ها، این عوامل مهار و یا تخریب RNA پیامبر، در سلول‌های یوکاریوتیک ازجمله قارچ‌ها عمدتاً به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند: RNA های مداخله‌گر کوتاه (SiRNAs)، میکرو RNAها (miRNAs) و RNA های واکنش‌دهنده با پروتئین (Piwi-interaction RNAs(piRNAs)) (3). این مطالعه باهدف بررسی

بیولـوژی MicroRNA در قـارچهـا و نقـش آن در فعالیت‌هایی نظیـر پـاتوژنز، تحریـک سیسـتم ایمنـی و تنظیم سنتز پروتئین (طی فرآیند خاموشی ژن در سطح ترجمه و یا پس از ترجمه) انجام شده است.

بیولوژی RNA در قارچ‌ها (Biologyin RNA Fungi)

فرآیندهای های وابسته به RNA بـرای سـنتز مـؤثر پروتئین‌های سلول بسـیار حـائز اهمیـت مـی‌باشـند.در یوکاریوت‌ها این فرآیندها با رونویسی ازDNA در هسته آغاز و با ترجمه RNA پیامبر به پروتئین در سیتوپلاسم خاتمه پیدا می‌کند و درنهایـت RNA پیـامبر تخریـب مـی‌شـود. در فراینـد پـروتئین‌سـازی مراحـل مختلفـی ازجملـــه، پوشـــش '5 (5'capping)، پـــردازش (Splicing)، پلی آدنیلاسـیون (poly adenylation)، خـــروج هســـته‌ای (Nuclear export) و انتقـــال سیتوپلاســـمی (Cytoplasmic transport) اتفـاق می افتد که تماماً بایستی کنترل و تنظیم گردد تـا یـک بیان به‌موقع صورت گیرد.

کنتـرل پـس از ترجمـه در سـطح پـردازش پلـی آدنیلاسیون، ترجمه و ثبـات ، ابزارهـای تنظیمـی مهـم برای پاتوژنز قارچهـا جهـت هماهنـگ کـردن عفونـت مـی‌باشـند. انتقـال RNA پیـامبر انـدوزومال در طـول میکروتوبـول‌هـا یـک جنبـه بـدیع از بیولـوژی RNA مـی‌باشـد و ایـن پروسـه پـس از نسـخه‌بـرداری (Posttranscriptional) به‌طور ویژه‌ای در طی عفونت اولیه با اهمیت می‌باشد. پروتئین‌های متصـل بـهRNA (RNA – binding proteins) بـه‌عنـوان فاکتورهـای کلیدی در هر مرحله از کنتـرل پـس از نسـخه بـرداری ضروری مـی باشـند. RNAهـای کوچـک فاکتورهـای اضافی (Additional) هستند کـه یـا ترجمـه را مهـار می‌کنند و یا قادرند تخریب RNAپیامبر را ارتقا دهنـد. به دلیـل اهمیـت مرکـزی و مهـم بیولـوژی RNA در تنظیم سـنتز پـروتئین،این چنـدان عجیـب نیسـت کـه پاتوژنز قارچ‌ها به شدت به پروسه‌های وابسته به RNA جهت کنترل عفونت متکی باشد (5).

RNA پیامبر توسط پروتئین‌های متصـل بـه RNA کنترل می‌شود. این پروتئین‌ها نقش حیاتی را در مراحل مختلف بین نسخه‌برداری و سنتز پروتئین ایفا مـی‌کنـد همانند پوشش '5 ، پردازش ، پلی آدنیلاسیون ، خروج هسته‌ای و انتقال سیتوپلاسمی، تخریب سیتوپلاسمی و هسته‌ای (Nuclear/Cytoplasmic degradation) و ترجمه. برخی ازRNA غیر کد شونده پلـی‌آدنیلـه شـده (polyadenilation Non-coding RNA) بایـد بـه سیتوپلاسم جایی که عملکردهایشان را انجام می‌دهنـد منتقل شوند.

پـروتئین‌هـای متصـل بـهRNA یـک کمـپلکس ریبونوکلئوپروتئینی (RNPs)را تشـکیل مـی‌دهنـد کـه شبکه RNA پیچیـده (networks Intricate RNA) در داخل سلول را کنترل می‌نماید (6).

RNA مداخلـــه‌گـــر (RNA interference (RNAi)

یـک مکانیسـم محافظـت‌شـده خـاموش‌کننـده ژن (Conserved eukaryotic gene silencing) در یوکاریوت‌ها می‌باشد. MicroRNA های غیرکدشونده (non-coding RNAs)، حدود بیست تا سی نوکلئوتید به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های پروسه‌های سـلولی (توسـعه و تکـوین (Development)، ثبـات (RNA stability) RNA، پردازش (Processing)، دفـاع میزبـان (Host defense)، تفکیـــک کرومـــوزومی (Chromosome segregation)، نســـخه‌بـــرداری (Transcription)و ترجمه (Translation) فعالیـت مـی‌کننـد (3). درواقـع تنظیم بیان ژن و بروز تغییرات مؤثر و گسترده در بیـان محصـول نهـایی ژن نقـش بـارز ایـن تـوالی‌هـای تک‌رشته‌ای به شدت محافظت‌شده می‌باشد (4).

خاموشـی ژن بـه‌واسـطه MicroRNA بـه روش‌های مختلف نیازمند Argonaute

protein بـــه‌عنـــوان جـــز مرکـــزی کمـــپلکس خـاموش‌کننـده القـاء شـده توسـط RNA ((RISC) RNA-induced silencing complex) مـی‌باشـد (3).

تاریخچه و نقش RNA مداخله‌گر در قارچ‌ها

پـس از کشـف RNA مداخلـه‌گـر در سـال1998 تلاش‌هایی جهت به کار بـردن ایـن تکنولـوژی بـرای کنترل بیان ژن در یک واریته از گونـه قـارچی صـورت گرفت. مهار بیان ژن توسط یک پلاسمید حاوی RNA دو رشته‌ای (dsRNA) و یا یک سیستم مرتبط با بیـان RNA دو رشته‌ای، در بسیاری از گونه‌هـای قـارچی در

شاخه‌های مختلف نظیر آسکومایکوتا (Ascomycota)، بازیدیومایکوتا (Basidiomycota)، زایگومایکوتا (Zygomycota) و همینطور در اامایکوتای شبه قارچ (Fungus like oomycota) نشان داده شده است. حضور اجزای پروتئینی خاموشی ژن نظیر دایسر (Dicer) در پدیده خاموشی ژن در آسپرژیلوس نیدولانس (Aspergillus nidulans) مگناپورته اوریزه آ (Magnaporthe oryzae) و نوروسپورا کراسا (Neurospora crassa) و پیدایش MicroRNA مداخله‌گر(SiRNA)در آسپرژیلوس نیدولانس، موکور سیرسینلوئیدس (Mucor circinelloides)، نوروسپورا کراسا و شیزوساکارو مایسس پومبه (Schizosaccharomyces pombe) به اثبات رسیده، بنابراین به نظر می‌رسد که اساس خاموشی ژن برای بیشتر گونه‌های قارچی حفاظت شده است (7).

سلسه قارچ‌ها متشکل از یک گروه بزرگ و متنوع از یوکاریوت ها می‌باشد که شامل بیش از یک میلیون گونه با تنوع بی‌شماری از نظر اکولوژی، مرفولوژی و سیکل زندگی می‌باشد. مطالعاتی که بر روی قارچ رشته‌ایی نوروسپورا کراسا و مخمر شیزوساکارومایسس پومبه انجام شده اجزای RNA مداخله‌گر و شناخت عملکردهای آن در یوکاریوت ها را آشکار می سازد. از زمانی که سه جز مرکزی RNA مداخله‌گر (آرگونئات، دایسر و RNA پلیمراز وابسته به RNA) در گونه‌های مختلف قارچی شناسایی شده، محققین بر این باورند که جد مشترک قارچ‌ها دارای یک مسیر RNA مداخله‌گر عملکردی (Functional RNAi Pathway) می‌باشد. در این مسیر در ابتدا یک RNA غیر طبیعی (Aberrant RNA) شناخته شد و توسط RNA پلیمرازهای وابسته به RNA به RNA دو رشته‌ای تبدیل شد، در نتیجه توسط دایسر به RNA مداخله‌گر کوچک پردازش گردید و توسط پروتئین‌های آرگونئات حمل شد. این مسیراجدادی در طی تکامل قارچی سازگاری های بسیاری را متحمل شده است، به‌عنوان مثال در مخمرهای جوانه زن، RNA پلیمراز وابسته به RNA عمدتاً ناپدید شده است. مخمر های جوانه زن یا دارای RNA های مداخله‌گرغیر متعارف (Noncanonical RNAi) هستند و یا فاقد مسیر RNA مداخله‌گر می‌باشند، در حالیکه RNA مداخله‌گر به‌طور گسترده ایی در قارچ‌های رشته‌ای وجود دارد اما دارای عملکردهای متعددی می‌باشد. در نوروسپورا کراسا عملکرد MicroRNA های مداخله‌گر و RNA های شبه میکروRNA (milRNAs) در دفاع ژنومی و تنظیم ژنی می‌باشد.حضورو عملکرد مؤثر RNA مداخله‌گر در نوروسپورا در مراحل جنسی و رویشی، این ارگانیسم را به یک نمونه مناسب جهت بررسی و مطالعه مسیرهای RNA مداخله‌گر قارچی تبدیل کرده است (3).

اشکال مختلف RNA مداخله‌گر قارچی

الف) MicroRNA های غیر کد شونده (Small Non-coding RNAs): RNA های کوچک 19 و 25 نوکلئوتیدی هستندکه ازRNA های دو رشته‌ای ویا سنجاق سری پس ازقطعه قطعه شدن توسط دایسر یا نوکلئازهای شبه دایسر بوجود می‌آیند. این قطعات کوچک نوکلئوتیدی عوامل اولیه در خاموشی ژن به‌واسطهRNA (silencing RNA) هستندو به‌عنوان مولکول های غیر کد شونده با نقش بالقوه و ذاتی در تخریب RNA یا مهارترجمه تعریف می‌شوند که شناسایی RNA های هدف توسط Argonaute protein ، خاموشی ژن در سطح ترجمه و یا پس از ترجمه را میانجی‌گری می‌کنند.

به نظر می‌رسد که مسیرهای این RNAهای کوچک که مسیرهای مداخله RNA یا مسیرهای خاموشی RNA نامیده می‌شود، به دلیل توانایی در مهار ویا تنظیم بیان ژن، موجب مکانیسم های دفاعی برعلیه RNA های ویروسی، عناصر قابل انتقال و علاوه برآن تکوین وتوسعه کنترل بیان ژن می‌گردند. این MicroRNA های غیر کد شونده دربسیاری از ارگانیسم های زنده در روند تکوین و ترجمه نقش مهمی را ایفا می‌کنند.

حضور RNA های مداخله‌گرو پروسه‌های وابسته به آنها در گونه‌های مختلف قارچی نظیر نوروسپورا کراسا که یک آسکومیست ساپروفیت می‌باشد مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

محققین دریافته اند که قارچ پاتوژن گیاهی بوتریتیس سینره (Botrytis cinerea) با انتقال MicroRNA های قارچی به داخل گیاه میزبان قادر است به واسطه RNA میزبان برمکانیسم خاموشی ژن مسلط شده و ژن های ایمنی میزبان را سرکوب نماید.

یک شکل خاص RNA کوچک در این قارچ پاتوژن، ژن های میزبان را مورد هدف قرارمی‌دهد ومطالعات بیشتر نشان داده که این ژنها در طی عفونت سرکوب می‌شوند. درپر سلولی ها یک زیر مجموعه ازاین مولکول ها به داخل میکرو وزیکول‌ها یا اگزوزوم هایی که به فضای خارجی ترشح می‌گردند رانده می شوند، یک مکانیسم مشابه می‌تواند منجر به حرکت MicroRNAها از قارچ‌های رشته‌ای به داخل سلول‌های میزبان گردد. باتوجه به این یافته ها نقش گسترده RNA های کوتاه درون زاد قارچی (Fungal RNAs Endogenous short) درپروسه‌های ویرولانس و پروسه‌های تکوینی درقارچ‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این RNA ها همچنین قادر به تنظیم وکنترل خاموشی ژن در سطح رونویسی از طریق یک مسیر متیلاسیون DNA وابسته به RNA (RdDM)) RNA-dependent DNA methylation Pathway) می‌باشند. مطالعاتی که بر روی قارچ پاتوژن انسانی کریپتوکوکوس نئوفورمنس (*Cryptococcus neoformans*) انجام شده تنوع مسیرهای RNA مداخله‌گر را در قارچ‌ها نشان می دهد (6). این RNAهای کوچک 20 تا 30 نوکلئوتیدی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. آنها بطور گسترده‌ای در پروسه‌های بیولوژی مختلف دخیل هستند (8). نقش و هدف MicroRNA ها در قارچهای رشته ای بیشتر ناشناخته می باشد تا به امروز بیشتر اطلاعات در رابطه با RNAهای کوچک در قارچهای رشته‌ای از مطالعات بر روی یک گروه محدود از قارچ‌ها نظیر نوروسپورا کراسا به دست آمده اند. اهداف و نقش RNAهای کوچک (Small RNAs) شناخته شده در قارچهای رشته ای به ویژه در نوروسپورا کراسا هنوز بطور کامل مشخص نیست. درسایرگونه‌های قارچی ازجمله قارچهای پاتوژن گیاهی، خاموشی ژن وابسته به RNAهای کوچک هنوز درمرحله جستجوی آغازینش می‌باشد. این RNAهای کوچک متحرک بوده و قادرند درآسپرژیلوس نیدولانس در طی اسپورزایی جذب شده و منجر به خاموشی RNA (silencing RNA) گردند. هر چند چنین مطالعاتی محدود باقی مانده، این یافته‌ها بطور قطعی استفاده از مولکول های مصنوعی را به‌عنوان یک وسیله مؤثر برای مطالعه RNA silencing در شرایط طبیعی (in vivo) پیشنهاد می نماید که به وضوح نقش و اهداف RNA های کوچک قارچی را در رشد و تکوین و توسعه و بیماریزایی روشن می نماید.

آسپرژیلوس فومیگاتوس یک قارچ رشته‌ای پاتوژن می‌باشد که در مقایسه با سایر قارچهای کپکی عفونت‌های بیشتری را در سطح جهانی ایجاد می‌کند. مطالعاتی که بر روی RNA های کوچک غیرکدشونده این قارچ‌ها تحت شرایط مختلف و متنوع انجام شده و تولید کتابخانه های cDNA از گونه‌های RNA کوچک جدا شده، تعداد بسیاری ncRNA در ژنوم قارچی تشخیص داده شده است. این ncRNA ها به RNA های نوکلئولارکوچک (Small nucleolar RNAs(SnoRNAs)) و RNAهای هسته‌ای کوچک ((Small nuclear RNAs (SnRNAs) طبقه بندی شده اند؛ بنابراین ncRNA ها تحت تاثیر مراحل تکوینی (Developmental stages) قارچ‌ها و شرایط محیطی قرار می گیرند. مقایسه ژنومی نشان داده است که حضور snoRNA ها در آسپرژیلوس فومیگاتوس در بین استرین‌های قارچی حفاظت شده است. این مطالعه همچنین تعدادی ترادف های tRNA نیمه تمام (tRNA sequences Partial) در داخل کتابخانه cDNA را که با نیمه های '5 و یا '3 مولکولهای tRNA مطابقت دارد آشکار نموده است. این tRNA های نیمه تمام به نظر می رسد که توسط شکافت یا گسستگی اندونوکلئولیتیک در داخل لوپ آنتی کدن ایجاد شده اند. گزارش شده که این tRNA های نیمه تمام از سنتز پروتئین جلوگیری می‌کنند هر چند برای پی بردن به عملکرد دقیق آنها نیاز به مطالعات بیشتری است (9). عملکردهای ژن های Non-coding نظیر ژنهای tRNA در کاندیدا آلبیکنس بطور وسیعی نادیده گرفته شده است هر چند در بسیاری از موارد دریافتند که آنها نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کنند. از آنجائیکه عملکرد tRNA بعنوان مولکول آداپتور در انتقال اطلاعات ژنتیکی از RNA پیامبر به ترادف پروتئینی می‌باشد کاملاً مشخص است که یک نقش حیاتی و مؤثر را در سنتز پروتئین بازی می‌کنند (10).

اخیرا خاموشی ژنی القایی میزبانی ((HIGS) host-induced gene silencing) به‌عنوان یک استراتژی امیدبخش جهت کنترل بیماریهای قارچی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعات بیان مولکول های

dsRNA درگیاهانی که مورد تهاجم ارگانیسم قارچی قرار می گیرند منجر به RNA silencing و در نتیجه محدود کردن عفونت قارچی می‌گردد.

علاوه بر این RNA های کوچک، یکسری از RNA های غیرکدشونده طویل (LncRNA) که معمولاً بیش از 200 نوکلئوتید طول دارند در داخل سلول‌های یوکاریوتی حضور دارند اما هنوز مشخص نشده است که آیا آنها تولیدات یا محصولات غیر ضروری هستند یا نقش تنظیمی در سلول ایفا می‌کنند. شواهدبسیار به یک نقش تنظیمی برای این نوع از RNAهای غیرکدشونده اشاره می کند. یک مطالعه اخیر بر روی کریپتو کوکوس نئوفورمنس حضور و دخالت LncRNA را در تبدیل فرم مخمر به هایف در طی کلنیزاسیون میزبانی (Host colonization) در کنترل بیان ژن ZNF2 که یک کلید تنظیم کننده (Regulator Key) می‌باشد تشخیص داده است (6).

RNAهای کوچک واکنش‌دهنده با پروتئین QDE-2 (qiRNA) گروهی دیگر از RNAهای کوچک می‌باشند که تا کنون تنها درنوروسپورا کراسا شناسایی شده و از تخریب DNA تولید می گردند این مولکولهای حیاتی خاموشی ژن را با استفاده از ترجمه پروتئین مهار کننده میانجی گری می‌کنند. از دیگر RNAهای کوچک غیر کدشونده که در نوروسپورا کراساشناسایی شده قطعات RNA مشتق شده از RNA انتقال دهنده (tRFs) و همچنین RNAهای غیروابسته به دایسر (disiRNAs) می‌باشند.

ب) RNA های کوتاه درون زاد (esRNA) Endogenous short RNAs): RNAهای کوتاه درون زاد که در میسلیوم موکور سیرسینلوئیدس کشف شد، بیشترین گروهی است که از اگزون ها (Exonic-siRNA)منشاءگرفته و توسط RNAپلیمراز 1 وابسته به RNA و شبه دایسر2 (DCL2) (Dicer like 2 تولید می شود.آنها مسئول حذف نسخه های RNA پیامبر از ژن های کدکننده پروتئین می‌باشد. این RNA های کوتاه درون زاد از ترانسپوزون ها ومناطق داخل ژنی تولید می‌شوند و علاوه بر آن برای تولیدشان نیاز به Rdp1 پروتئین و شبه دایسر 2 دارند.

ج)MicroRNA های مداخله‌گر: مولکولهای طویلی هستند (21 تا 24 نوکلئوتیدی) که ازمولکولهای پیشرویdsRNA ایجاد می‌شوند و در بسیاری ازیوکاریوت ها ازجمله قارچ ها وجود دارند. درجوانه های مخمر ساکارومایسس کاستلی (Saccharomyces castellii) و کاندیدا آلبیکنس این RNAهای کوچک تعدادزیادی اشکال ژنتیکی ازجمله چارچوب خوانش باز (frame (ORF) Open reading)، tRNA , rRNA ، Repative elements وغیره را ایجادمی‌کنند. اگزپورتین 5 (Exportin 5) پروتئینی است که منجر به انتقال مقادیر بیشماری ازRNAهای کوچک از هسته به سیتوپلاسم می‌شود. بیشترگونه‌های قارچی ازجمله کریپتوکوکوس نئوفورمنس و نئوسپورا کراسا دارای 1 یا 2 ژن می‌باشند که این پروتئین انتقال دهنده را کد می‌کنند در حالی که اسپوروتریکس شنکئی (Sporothrix schenckii) و آرترودرما اوتائه (Arthroderma otae) فاقد آن می‌باشند. miRNAs شناخته شده ترین کلاسsmall RNAها در یو کاریوت ها می‌باشند گر چه تا به امروزتلاش ها جهت تشخیص miRNA استاندارد و متعارف در قارچها به نتیجه نرسیده است (11). جایی که دستآوردهای اخیر برای بیشتر قارچها کافی نیست دو روش اول بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد (3) (جدول 1).

کاربرد RNA مداخله‌گر در قارچها

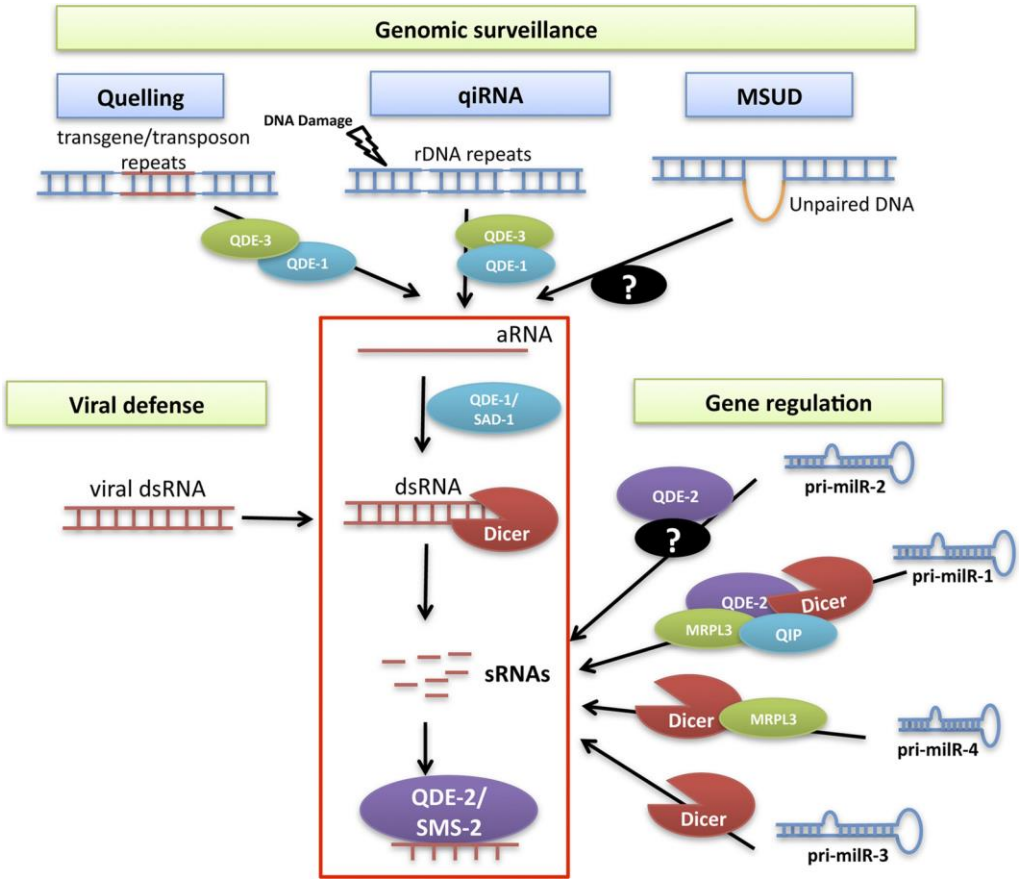
جدول 1- انواع مختلف RNA مداخله گر در قارچ ها را نشان می‌دهد.

انواع MicroRNA	قارچ‌های مورد بررسی
MicroRNAهای غیرکدشونده Small Non-coding RNAs	نوروسپورا کراسا، بوتریتیس‌سینره کریپتوکوکوس‌نئوفورمنس آسپرژیلوس نیدولانس آسپرژیلوس فومیگاتوس
RNAهای کوتاه درون زاد Endogenous short RNAs (esRNA)	موکور سیرسینلوئیدس
MicroRNAهای مداخله گر Small interfering RNAs (siRNAs)	مخمر ساکارومایسس کاستلی مخمر کاندیدا آلبیکنس کریپتوکوکوس نئوفورمنس نئوسپورا کراسا
RNA های طویل غیرکدشونده (LncRNAs)	کریپتوکوکوس نئوفورمنس

RNA مداخله‌گر یک اثر خاموشی ژن مؤثر را اعمال میکند. از آنجایی که خاموشی وابسته به RNA مداخله‌گر ساختمان ژنومیک ژن های هدف را تغییر نمی دهد به‌عنوان یک جایگزین مناسب ، ژن را غیر فعال(knock out) ساخته و در مطالعه عملکرد ژنها بسیار سودمند می‌باشد ، به خصوص زمانی که یک ژن برای بقا سلول ضروری می‌باشد. علاوه براین پروسه‌های مرتبط با RNA مداخله‌گر به‌عنوان ابزارهایی در بیوتکنولوژی جهت تسهیل تولید متابولیت های قارچی خاص توسط متوقف کردن بیان آنزیم های مورد نیاز جهت سنتز محصولات نهایی) مورد استفاده قرار گیرند. سه روش شناخته شده که می تواند منجر به خاموشی ژن وابسته به RNA مداخله‌گر در قارچها گردد شامل: بیان یک RNA سنجاق سری (RNA Hairpin) از یک ترانس ژن (یک ژن اگزوژن)، تولید RNA دو رشته‌ای توسط رونویسی متقاطع (Convergent transcription) از یک ترانس ژن و ورود RNA مداخله‌گر کوچک و RNA دو رشته‌ای به‌طور مستقیم به داخل سلول قارچی می‌باشد (3).

الف) سیستم دفاعی ژنومی در نوروسپورا کراسا: RNA مداخله‌گر یک مکانیسم دفاعی میزبان بر علیه ویروسها و ترانسپوزون ها می‌باشد. قارچ رشته‌ای نوروسپورا کراسا دارای مکانیسم‌های متعددی جهت دفاع برعلیه تهاجم ویروس ها و ترانسپوزون ها می‌باشد. برای مقابله با عفونت ویروسی، قارچ یک مکانیسم ضد ویروسی مؤثر را اعمال می نماید. dsRNA یک مداخله کننده تکثیر RNA ویروسی دربسیاری از ویروس ها می تواند خاموشی ژن وابسته به RNA مداخله گر را در استرین های آزمایشگاهی نوروسپورا کراسا اعمال کند. علاوه بر این بیان dsRNA در این ارگانیسم یک برنامه رونویسی فعال dsRNA را که بیان تمام ژنهای اصلی RNA مداخله‌گر، ازجمله پروتئین‌های آرگونئات، دایسر و QDE-2 را فعال می‌کند راه اندازی می‌نماید. القاء این ژنها توسطdsRNA نشان می‌دهد کهRNA مداخله‌گر یک بخشی از پاسخ دفاعی باستانی محافظت شده به عفونت ویروسی

ب) RNA مداخله‌گر و دفاع ویروسی در کریفونکتریا پارازیتیکا (*parasitica Cryphonectria*) و آسپرژیلوس نیدولانس: نقش RNA مداخله‌گر قارچی در دفاع ویروسی نخستین بار در قارچ رشته‌ای آسکومایست کریفونکتریا پا رازیتیکا کشف شد. ناس (Nuss) و همکارش دریافتند که ویروس CHV1 (cryphonectria hypovirus) ویرولانس میزبان قارچی را توسط بیان P29 (یک پروتئین شبه پاپائین) کاهش می دهد. حضورP29 ، خاموشی ژن وابسته به RNA را دراین ارگانیسم قارچی سرکوب می‌کند(3).



شکل 1- مسیرهای بایوژنز sRNA و عملکردهای RNA مداخله گر در نوروسپورا (3)

طی مطالعاتی که در سال 1979 توسط آناگنوستاکیس و دای (Anagnostakis & Day) انجام گرفت کاهش پاتوژنیسیته قارچ پاتوژن گیاهی کریفونکتریا پارازیتیکا درحضور مایکوویروس CHV1اعلام گردید (12).

آسپرژیلوس نیدولانس نیز دارای یک مسیر RNA مداخله‌گر می‌باشد که از نظر عملکردی کامل در طی این فرایند یک دایسر و یک آرگونئات پروتئین بیان می‌شود که هر دوی آنها برای خاموشی ژن ضروری می‌باشند.با آلوده شدن آسپرژیلوس نیدولانس توسط dsRNA ویروسی، فعالیت RNA مداخله‌گر مهار می‌شود و این نشان می دهد که مهار کننده RNA مداخله‌گر توسط dsRNA ویروسی رمزگشایی می‌شود (3).

ج) RNA های دو رشته‌ای ویروسی و قارچها و نقش آنها در درمان عفونت قارچی: dsRNA های ویروسی (مایکوویروس ها) به‌طور طبیعی مو جب آلودگی در قارچها شده و در ارگانیسم قارچی تکثیر پیدا می‌کنند. آنها در تمام گروه های بزرگ قارچی پراکنده می‌باشند. نمونه های بی شماری از dsRNA های ویروسی موجود است که موجب تغییردر میزان رشد و تغییر در فنوتایپ میزبان ازجمله فاکتورهای هایپوویرولانس می گردند. هایپوویرولانس در قارچها توسط کاهش کونیدی زایی, کاهش پیگمانتاسیون و کاهش میزان رشد تشخیص داده می‌شود (13). در آسپرژیلوس فومیگاتوس که یک پاتوژن قارچی فرصت طلب می‌باشد آلودگی با dsRNA ویروسی موجب کاهش ویرولانس می گردد. به همین دلیل dsRNA ویروسی (مایکوویروس‌ها) از نظر فرض علمی می توانند به‌عنوان ابزارهای درمانی با عفونت‌های قارچی مبارزه کنند درواقع این کاهش ویرولانس ناشی ازحضور dsRNA های ویروسی، منجر به طرح فرضیه ای می‌شود که dsRNA های ویروسی، می توانند به‌عنوان "عوامل کنترل کننده بیولوژیکی" در عفونت های قارچی انسانی ایفای نقش کنند. dsRNA های ویروسی در استرین‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس به یک پروتئین سطحی سلولی (Cell surface type- CSP protein) خاص و یا یک تایپ آمیزشی (Mating

type) معین وابسته نمی‌باشند. این یک یافته ارزشمند است که قبل از اینکه از dsRNA های ویروسی به‌عنوان یک ابزار درمانی برای آسپرژیلوس مهاجم استفاده شود، این اجزا ژنتیکی باید قادر باشند تمامی ایزوله های آسپرژیلوس فومیگاتوس را آلوده کنند (14).

dsRNAهای ویروسی، همچنین قادرند هایپرویرولانس را که توسط افزایش تولید اسپور (Sporulation)، افزایش تهاجم وافزایش رشد تشخیص داده می‌شود، در میزبان قارچی ایجاد کنند. آلودگی آسپرژیلوس فومیگاتوس توسط dsRNA ویروسی منجر به تغییرات فنوتایپی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی وهمینطور کاهش رشد قارچ می گردد. همچنین تغییرات فنوتایپی نظیرتغییردر میزان رشد و پیگمانتاسیون در آسپرژیلوس می تواند ازخاموشی ژن به‌واسطه RNAهای دو رشته‌ای ویروسی (RNA silencing dsRNA) ناشی شود. پتانسیل dsRNA های ویروسی در تنظیم پاتوژنیسیته میزبانان قارچی شان امکان دارد یک جایگزین درمانی مهم و قابل توجهی را در مرحله اولیه عفونت قارچی انسانی فراهم سازد (13). قارچ‌های پاتوژن گیاهی بطور گسترده ای شامل عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی متشکل از RNA دو رشته‌ای می‌باشند طبیعت عفونی RNA دو رشته‌ای در قارچ هاآشکار شده است و در مواردی اندک فنوتایپ قارچی در اثر عفونت تغییر می‌کند بنا براین کاهش ویرولانس در کریفونکتریا پارازیتیکاو فنوتایپهای کشنده ساکارومایسس سرویسیه (Sacharomyces cerevisiae) و یوستیلاگو مایدیس (Ustilago maydis) مستقیما از عفونت قارچی توسط اجزای ژنتیکی dsRNA ایجاد شده اند. هرچند ارتباط عفونت dsRNA با ویژگی‌های فنوتایپی در تعدادی از قارچها کمتر مشخص شده و یا ناشناخته می‌باشد. با توجه به گزارشات آغازین توسط آدلر (Adler) و مکنیز (Mackenize) در سال 1972 از پارتیکل های شبه ویروسی (VLP) در یک ایزوله آسپرژیلوس فلاووس که آفلاتوکسین تولید نکرد و فقدان ویریون ها در یک ایزوله دیگر که آفلاتوکسین تولید نمود،dsRNA ویروسی به‌طور مکرر به‌عنوان یک عامل فرضی (Putative cause) در ایزوله های آسپرژیلوس فلاووس که آفلاتوکسین تولید نمی‌کنند معرفی شده است. اشمیت (Schmidt) و همکاران در سال 1986 دریافتند که برخی از ایزوله های آسپرژیلوس فلاووس (NRRL5565) آفلاتوکسین تولید نمی‌کنند و دارای یک ژنوم ویروسی dsRNA می‌باشند که از نظر اندازه با RNAهایی که محققین در پنی سیلیوم کرایزوژنوم (Penicillium chrysogenum) پیدا کرده بودند شباهت داشتند. پس از حذف این dsRNA دریافتند که توانایی تولید آفلاتوکسین در نهایت مرتبط به dsRNA نمی‌باشد اما آزمایشات بعدی بر روی همین ایزوله های قارچی پاسخگوی یک ارتباط غیر مستقیم بین عفونت زایی قارچ با dsRNA(6 kbp) و فقدان تولید آفلاتوکسین بود (15). از آن جاییکه درآزمایشات انجام شده بر روی قارچ نکتریا رادیسیکولا (Nectria radicicola) استرین های آلوده با dsRNA ویروسی، پس از درمان به‌طور کامل فنوتیپ های مرتبط با ویرولانس را از دست دادند، پس نتیجه گرفته شد که dsRNA ویروسی (6 kbp) ویرولانس قارچ را در این ارگانیسم تنظیم می‌کند (16).

نقش RNA در تحریک سیستم ایمنی و بیماریزایی

شواهد کلینیکی و داده های بالینی نشان می‌دهند که RNA قارچی قادر به تحریک هردو سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بوده و می تواند باعث تحریک تولید سایتوکاین های مهم و اولیه ازجمله تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF-α)، اینترلوکین 23 (IL-23) و IL-12p70، که نقش اصلی را در دفاع ضد قارچ در سیستم ایمنی ایفا می‌کنند، شود.

مطالعات انجام شده برروی سلول‌های بنیادی مشتق از دندرتیک سل ها درشرایط آزمایشگاهی (BMDCs) bone marrow-derived in vitro-differentiated dendritic) نشان می‌دهد که RNA های قارچی قادر به القاء ترشح اینترلوکین 12 (IL-12)، اینترلوکین 23 و تومور نکروز فاکتور آلفا در این سلول ها می‌باشد. TLR7 (Toll like receptor7) میل ترکیبی بالایی در عفونت های قارچی با RNA تک رشته در سلول‌های بنیادی مشتق از دندرتیک سل ها دارد. با بررسی مکانیزم فعال سازی سیستم ایمنی توسط RNA کاندیدا البیکنس، داده ها حضورحداقل دو مکانیزم مختلف سلولی که منجر به تولید دو مجموعه متفاوت عوامل دفاعی پس از تشخیص قارچ توسط سیستم

ایمنی را نشان می دهد اولین مکانیزم شامل القای تولید اینترلوکین 23، تومور نکروز فاکتور آلفا توسط RNA قارچی، باهمکاری گیرنده های سیستم ایمنی واقع در سطح سلول میزبان و دومین مکانیسم شامل القای تولید اینترلوکین 12 توسط RNA قارچی می‌باشد (17). در مطالعه ایی نقش TLR7 به صورت القای اینترفرون بتا (IFNβ) در سلول‌های دندرتیک در پاسخ به عفونت های کاندیدایی مورد بررسی قرار گرفته است علاوه بر این نشان داده شده که هم DNA و هم RNA در این فرآیند توسط سلول‌های ایمنی شناسایی و تشخیص داده می‌شود، شایان‌ذکر است که القای اینترفرون بتا برای کنترل رشد قارچی و فعالیت های ضد التهابی ضروری است (19و 18) ج.TLR7 نقش مهمی را در پاسخ های سلولهای دندرتیک به RNA_s قارچ کاندیدا گلابراتا (*Candida glabrata*) ایفاء می‌کند، همچنین نقش محوری و مهمی را در سیگنالینگ و تولید اینترفرون بتا در پاسخ به شناسایی و تشخیص عفونتهای قارچی ناشی از کاندیدا گلابراتا ایفاء می‌کند. در کاندیدا آلبیکنس نشان داده است که TLR7 در تولید IL12P70 نقش داشته و یک عامل مهم و ضروری در مقاومت در برابر کاندیدیازیس سیستمیک می‌باشد، انواع متنوع لنفوسیت های تی کمک کننده (T-helper cells) با ترشح سایتوکاین های مختلف مانند (IL-21 و ...) نقش مهم و حیاتی را در عفونت های انگلی و همچنین در عفونت های کاندیدایی (RNA تک‌رشته‌ایی (ssRNA) کاندیدا آلبیکنس با القاء و ایجاد پاسخ‌های ایمنی در این سلول) بازی می‌کند (20-23).

مثال دیگر در ارتباط با فعال سازی سیستم ایمنی توسط RNA قارچی، در آسپرژیلوس فومیگاتوس نشان داده شده که DNA یا RNA قارچ سبب تحریک دندرتیک سل های پلاسماسایتوئید (plasmacytoid dendritic cells(PDC) شده و این سلولها در پاسخ مقدار زیادی اینترفرون نوع یک (IFN I) ترشح می‌کنند، در شرایط آزمایشگاهی با بررسی موشهای فاقد سلول‌های دندرتیک پلاسماسایتوئید مشاهده شد که این موش‌ها بیش از حد مستعد ابتلاء به آسپرژیلوزیس مهاجم هستند و نقش مهم ضد قارچی این سلول کشف شده است (24). همچنین در موشهای دچار عفونت تجربی ریوی دیده است که RNA قارچی آسپرژیلوس سلولهای اپیتلیال ریه را بوسیله گیرنده شبه تول-3 (TLR3) تحریک نموده و همچنین مسیرهای فسفوریلاسیون عوامل تنظیم کننده رونویسی اینترفرون (interferon regulatory transcription factor) IRF3 را نیز به راه می‌اندازد (25). TLR3 یک نقش کلیدی در تنظیم التهاب، ایمنی ذاتی در مسیرسیستم تنفسی بدن و شناسایی RNA دو رشته‌ای (dsRNA) ایفاء می‌کند و سبب فعال سازی سلولهای لنفوسیتی +CD8 خاطره در سیستم ایمنی علیه قارچ می‌شود. TLR3 بر روی سلول‌های دندرتیک قرار دارد و به RNA قارچ حساس بوده و به آن متصل می‌شود سپس این مجموعه به مولکول های پروتئینی غشایی MHC I، سلولهای +TCD8 متصل و سبب فعال شدن آن می‌شوند. همچنین سبب راه اندازی پاسخ های خاطره ای ضد قارچی در سیستم ایمنی میشود و بنابر این جای تعجب نیست افرادی که دچار کمبود و یا نقص در TLR3هستند، حساسیت بیشتری نسبت به آسپرژیلوزیس از خود نشان میدهند (26). TLR3 به‌عنوان یک گیرنده کمکی در پاسخ به RNA تک‌رشته‌ای قارچی منجر به فعال سازی سلول‌های اپیتلیال ریه و سبب آغاز پاسخ سیستم ایمنی می‌شود (27). تشخیص DNA قارچی توسط TLR(برای مثال دخالت TLR در تشخیص کاندیدا آلبیکنس) مورد بررسی های متعدد قرار گرفته است، ولی در هیچ مطالعه ایی نقش احتمالی سیستم های تشخیصی RNA (شامل TLR3.7.8) در پاسخ میزبان علیه کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار نگرفته است (28). بررسی ها نشان داده است قبل از این که کاندیدا آلبیکنس فاگوسیت شود، توسط سلول‌های دندرتیک آنتی ژن های آن پردازش می‌شود و از طرفی تحریک یا پالس این سلول ها باعث القای ایمنی محافظتی در برابر کاندیدا آلبیکنس می‌شود (29). یکی دیگر از مکانیسم های دفاعی سیستم ایمنی تولید اینترفرون آلفا / بتا (FNα/β) بوسیله مکانیسم‌های درون سلولی تشخیصی DNA و RNA به ترتیب توسط TLR9 و TLR7 در کاندیدا و ساکارومایسس مشاهده شده است. سیگنالینگ تولید IFNα/β برای حفاظت از میزبان در مدل موشی در برابر کاندیدیازیس سیستمیک بسیار مهم و ضروری است، از طرفی القای پاسخ IFNβ نیازمند TLR9، TLR7، MYD88، فاکتورهای رونویسی از

خـــانواده IRF (regulatory factors interferon) است. از نظر توانایی القاء تولید اینترفرون بتا در کاندیـدا RNA هماننـد DNA بصـورت قـوی و بـالقوه عمـل می‌کند اما توانایی آن به‌طور قابل ملاحظه ای از RNA باکتریال کمتر است (30). از دیگـر کاربردهـای RNA قارچی میتوان به یک روش ساده، ارزان و خاص جهـت تشـخیص زود هنگـام آسـپرژیلوزیس سیسـتمیک در بیماران در معرض خطر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) دو مرحله ایی در نمونـه هـای خـون و برونکوآلوئلار لاواژ نام برد (31).

RNA قارچی و واکسیناسیون

مطالعات نشان داده است نـه تنهـا مخمـر هـا بلکـه RNA مخمر نیز می تواند یک عامل کارآمـد تحریـک کننده ی بلوغ سلول‌هـای دنـدرتیک، تولیـد IL_12 و القای پاسخ های اختصاصی آنتی ژن محافظتی نسـبت به کاندیدا محسوب شود. سلول‌های دنـدرتیک انسـانی می‌توانند عوامل قارچی را پردازش نمـوده و علـی رغـم ایجاد پاسخ ایمنـی اختصاصـی سـبب تقویـت مکـانیزم دفاعی نیز می‌شوند، این فرایند نشان می دهد کـه ایـن سلول ها می توانند به‌عنوان واکسن های مؤثر بر علیـه عفونت های قارچی عمل نماینـد (32). یکـی دیگـر از عوامل تحریک کننده سیستم ایمنـی و گزینـه مناسـب جهـت واکسیناسـیون، وزیکـول هـای خـارج سـلولی (Extracellular vesicles) می‌باشند این وزیکـول‌هـا حامل پروتئین ها، رنگدانه ها، پلی سـاکاریدها و RNA قارچی هستند. این اجزاء بـه‌عنـوان عوامـل بیمـاریزایی شناخته می‌شوند، اما هنوز منشاء پیدایش انها مشـخص نشده است. وزیکول هـای حـاوی RNA در قارچهـای ساکارومایســـس ســـروزیه، کاندیـــدا آلبیکـــنس، کریپتوکوکـــوس نئوفـــورمنس، پاراکوکســـیدیوئیدس برازیلینسـیس (*Paracoccidioides brasiliensis*) حامـل ($sRNA_s$، tRNA، RNA هـای بـالغ و RNA های غیر کد گذاری) می‌باشند و در انتقال آن ها نقـش داشته و از هیدرولیز آن ها توسـط آنـزیم هـا ی خـارج سلولی جلوگیری می‌کننـد. گرچـه اطلاعـات انـدکی در زمینـه ایـن مولکـول هـا و عملکـرد RNA در ایـن وزیکول‌ها در قـارچهـا وجـود دارد، در کریپتوکوکـوس نئوفـــــورمنس جهـــــش در ژن (Sec6 RNA interference)، باعث انباشته شـدن سـطوح برخـی از عوامل بیمـاریزا مثـل آنهـایی کـه در لاکـاز و اوره آز و ترشح پلی ساکاریدها دخالت دارند بـه‌طـور معنـی داری کاهش می یابد در نتیجه بیمـاریزایی ان تضـعیف مـی گردد (33).

بحث و نتیجه‌گیری

مکانیسم محافظت‌شده خاموشی ژن در یوکاریوت‌هـا بخصوص قارچ‌ها با حضور MicroRNAها که در واقع تنظیم کننده های فرایندهای سلولی از قبیـل توسـعه و تکوین، ثبات RNA، دفاع میزبان و .... می‌باشند بسـیار مورد توجه محققین قـرار گرفتـه اسـت. از آنجـایی‌کـه RNA در تنظیم سنتز پـروتئین نقـش مهمـی را ایفـا می‌کند پاتوژنز ارگانیسم های قـارچی بـه پروسـه‌هـای وابسته به این مولکول زیسـتی جهـت کنتـرل عفونـت متکی می‌باشد و درواقع اهمیت آن جهت بـه کـاربردن روشی مؤثر برای کنترل ژن در سلول‌هـای یوکـاریوتی خصوصاً واریته‌های مختلف قارچی می‌باشد (5و 3). بـه این صورت که در گونـه‌هـای مختلـف قـارچی از ایـن مکانیسم (به‌طور مصنوعی) جهت مهار بیان ژن استفاده می‌شود. در مطالعات انجام شده پیدایش MicroRNA مداخلـــه‌گـــر در آســـپرژیلوس نیـــدولانس، موکـــور سیرسیلوئیدس، نوروسپورا کراسا و شیزوساکارومایسـس پومبه به اثبات رسیده است که بیانگر این اصل می‌باشد کـه ایـن مکانیسـم بـرای بیشـتر گونـه‌هـای قـارچی محافظت‌شده می‌باشد (7).

با توجـه بـه مطالعـاتی کـه بـر روی قـارچ رشـته‌ای نوروسپورا کراسـا و مخمـر شیزوساکارومایسـس پومبـه انجام گرفته اجزاء RNA مداخله‌گر و شناخت این اجزاء در گونه‌های قـارچی آشـکار شـده اسـت. بـا توجـه بـه شناسایی سه جزء مرکزی RNA مداخله‌گر (آرگونئـات، دایسر و RNA پلی مراز وابسته به RNA) ایـن نتیجـه گیری انجام شده که جد مشترک قـارچهـا یـک مسـیر مداخله‌گر عملکردی را دارا مـی‌باشـند کـه ایـن مسـیر اجدادی در طی تکامل قارچی دستخوش سازگاری های بسیار بوده است (3). بـه‌عنـوان مثـال در مخمـر هـای جوانه زن RNA پلـی مـراز وابسـته RNA بـه ناپدیـد گشـته، ایـن مخمرهـا معمـولا یـا فاقدمسـیر RNA مداخله‌گر هسـتند و یـا دارای RNA هـای مداخلـه‌گـر غیرمتعارف می‌باشند در صورتیکه در قارچهای رشـته‌ای این مکانیسم به‌طور کامل موجود است.

شایان‌ذکر است که حضور عملکرد مؤثر و گسترده RNA مداخله‌گردر نوروسپورا کراسا در دفاع ژنومی و تنظیم ژنی (در مراحل جنسی و رویشی) این ارگانیسم را به یک نمونه مناسب جهت مطالعه مسیرهای RNA مداخله‌گر تبدیل نموده است (3).

در قارچ پاتوژن گیاهی بوتریتیس سینره آ ارگانیسم قارچی با تزریق RNA های کوچک قارچی به داخل گیاه میزبان و با استفاده از خاموشی ژن به‌واسطه RNA ژن های ایمنی سلول میزبان راسرکوب می‌کند این مطلب بیانگر نقش گسترده RNAهای کوتاه درون زاد قارچی در ویرولانس و فرآیندهای تکوینی در قارچها می‌باشد. پدیده خاموشی ژن به‌واسطه MicroRNA در آسپرژیلوس نیدولانس در رشد، تکوین و توسعه و پاتوژنز ارگانیسم دخیل می‌باشد (9). علاوه بر این با توجه به مطالعاتی که بر روی قارچ پاتوژن انسانی کریپتوکوکوس نئوفورمنس انجام شده تنوع مسیرهای RNAمداخله‌گردر قارچها آشکارگردیده است (6).

با استفاده از مکانیسم خاموشی ژن به‌واسطه RNA واهمیت خاص RNA مداخله‌گر در قارچها پدیده خاموشی ژنی القایی میزبانی جهت کنترل بیماری های قارچی بسیار مورد توجه قرار گرفته است، بطوریکه بیان مولکول‌های dsRNA در گیاهانی که مورد تهاجم ارگانیسم قارچی قرار گرفته اند منجر به خاموشی ژن وابسته به RNA (RNA silencing) و در نهایت محدود کردن عفونت قارچی می‌گردد (6).

خاموشی ژن وابسته به RNA در dsRNA های ویروسی (مایکوویروس‌ها) آلوده کننده ارگانیسم‌های قارچی نظیر آسپرژیلوس فومیگاتوس در میزبان قارچی ویروس مثال دیگری از حضور و عملکرد با اهمیت این مکانیسم در طبیعت می‌باشد که منجر به تغییراتی در میزان رشد و فنوتایپ میزبان قارچی نظیر هایپوویرولانس می گردد. کاهش ویرولانس ناشی از حضور dsRNA های ویروسی این فرضیه را که این عوامل ویروسی قادر به کنترل بیولوژیکی در عفونت های قارچی انسانی می‌باشند را مطرح می‌سازد (14و 13).

درمجموع داده‌های به دست آمده اشاره به اهمیت دفاع ضدقارچی سیستم ایمنی ازمسیرهای مختلف دارد برای مثال RNA مخمر قادر به تحریک سلول‌های دندریتیک برای افزایش تولید IL-12 است (17).

همچنین مطالعات بیشتری برای توصیف جزئیات بیشتر در ارتباط با فعالیت تحریک کنندگی RNA قارچی و نقش بالقوه آن در القای پاسخ‌های ایمنی میزبان ازجمله تولید سایتوکاین‌های التهابی نیاز است (30). RNA مداخله‌گر در سال‌های اخیر توجه قابل ملاحظه‌ای را به‌عنوان روشی برای بازداری بیان ژن‌های اختصاصی به خود معطوف داشته بنابراین یک ابزار بالقوه جهت شناسایی و معتبر سازی اهداف دارویی است (7).

منابع

1.Corey DR. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? J Clin Invest; 2007.12: 3615-22.

2.Göhre V, Haag C, Feldbrügge M. RNA biology in fungal phytopathogens. Plos Pathog; 2013.10: e1003617.

3.Dang Y, Yang Q, Xue Z, Liu Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. Eukaryot Cell; 2011. 9:1148-55.

4.Khoshmirsafa M, Seif F, Mohsenzadegan M, Najafi M, Mokhtarian K, Shekarabi M. [Circulating microRNAs, valuable biomarkers in biological fluids]. Razi Journal of Medical Sciences 2017.24 (160); 22-36. (Persian)

5.Göhre V, Haag C, Feldbrügge M. RNA biology in fungal phytopathogens. PLoS Pathog; 2013.10: e1003617.

6.Sesma A. RNA metabolism and regulation of virulence programs in fungi. Semin Cell Dev Biol; 2016 .57:120-127.

7.Moazeni M, Nabili M, Badali H, Abastabar M. RNAi technology: A novel approach against fungal infections. Res Mol Med; 2014. 3:1-0.

8.Deng H, Liu Q, Cao W, Gui R, Ma C, Yi M, et al, editors. qiRNApredictor: A Novel Computational Program for the Prediction of qiRNAs in Neurospora crassa. Plos One; 2016. 7:e0159487.

9.Jöchl C, Rederstorff M, Hertel J, Stadler PF, Hofacker IL, Schrettl M, et al, editors. Small ncRNA transcriptome analysis from Aspergillus fumigatus suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. Nucleic Acids Res; 2008. 8:2677-89.

10. Fan J, Savard F, Wu M, Shen SH. A full complement of transfer RNA genes in the Candida albicans genome. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology; 2007.2: 915-25.

11. Nunes CC, Sailsbery JK, Dean RA. Characterization and application of small RNAs and RNA silencing mechanisms in fungi .Fungal Biol Rev; 2011. 4:172-80.

12.Ong JW, Li H, Sivasithamparam K, Dixon

KW, Jones MG, Wylie SJ. Novel and divergent viruses associated with Australian orchid-fungus symbioses. Virus Res; 2018. 244:276-83.

13.Özkan S, Coutts RH. Aspergillus fumigatus mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on Galleria mellonella. Fungal Genet Biol; 2015.76: 20-6.

14.Refos JM, Vonk AG, Eadie K, Lo-Ten-Foe JR, Verbrugh HA, van Diepeningen AD, et al, editors. Double-stranded RNA mycovirus infection of Aspergillus fumigatus is not dependent on the genetic make-up of the host. Plos One; 2013.10: e77381.

15.Elias KS, Cotty PJ. Incidence and stability of infection by double-stranded RNA genetic elements in Aspergillus section flavi and effects on aflatoxigenicity. Can J Bot; 1996. 5:716-25.

16.Ahn IP, Lee YH. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of Nectria radicicola. Mol Plant Microbe In; 2001.4: 496-507.

17. Biondo C, Malara A, Costa A, Signorino G, Cardile F, Midiri A, Galbo R, Papasergi S, Domina M, Pugliese M, Teti G. Recognition of fungal RNA by TLR7 has a nonredundant role in host defense against experimental candidiasis. Eur J Immunol; 2012.10: 2632-43.

18. Dalpke AH, Helm M. RNA mediated Toll-like receptor stimulation in health and disease. RNA BIOL; 2012.6: 828-42.

19.Mohsenzadegan M, Fayazi MR, Abdolmaleki M, Bakhshayesh M, Seif F, Mousavizadeh K. Direct immunomodulatory influence of IFN-β on human astrocytoma cells. Immunopharm Immunot; 2015.2:214-9

20. Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Lesiak-Markowicz I, Hildering KS, Glaser W, et al, editors. Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against Candida spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-β signaling. J Immunol; 2011.5: 3104-12.

21. Hajilooi M, Lotfi P, Seif F, Bazmani A, Momeni M, Ravary A, et al, editors.The Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 +49A/G Single Nucleotide Polymorphism Association With Visceral Leishmaniasis. Jundishapur J Microbiol; 2014.10: e12143.

22.Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. Cell Commun Signal; 2017.1:23.

23.Seif F, Khoshmirsafa M, Mousavi M, Beshkar P, Rafeian-Kopaei M, Bagheri N, et al, editors. Interleukin-21 receptor might be a novel therapeutic target for the treatment of rheumatoid arthritis. J Exp Clin Med; 2014.2: 57-61.

24. Ramirez-Ortiz ZG, Lee CK, Wang JP, Boon L, Specht CA, Levitz SM. A nonredundant role for plasmacytoid dendritic cells in host defense against the human fungal pathogen Aspergillus fumigatus. Cell Host Microbe; 2011.5:415-24.

25.Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, et al, editors.The Danger Signal S100B Integrates Pathogen–and Danger–Sensing Pathways to Restrain Inflammation. PLoS Pathog; 2011.3: e1001315.

26. Carvalho A, De Luca A, Bozza S, Cunha C, D'Angelo C, Moretti S, et al, editors. TLR3 essentially promotes protective class I–restricted memory CD8+ T-cell responses to Aspergillus fumigatus in hematopoietic transplanted patients. J Blood; 2012.4:967-77.

27.Beisswenger C, Hess C, Bals R. Aspergillus fumigatus conidia induce interferon-β signalling in respiratory epithelial cells. Eur Respir J; 2012.2:411-8.

28. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. Nat Rev Microbiol; 2008.1: 67-78.

29. Netea MG, Gijzen K, Coolen N, Verschueren I, Figdor C, Van der Meer JW, et al, editors. Human dendritic cells are less potent at killing Candida albicans than both monocytes and macrophages. Microbes Infect; 2004.11:985-9.

30. Biondo C, Signorino G, Costa A, Midiri A, Gerace E, Galbo R, et al, editors. Recognition of yeast nucleic acids triggers a host-protective type I interferon response. Eur J Immunol; 2011.7: 1969-79.

31. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mösch C, et al, editors.Specific detection of Aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. J Clin Microbiol; 1999.12: 3865-71.

32. Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Gaziano R, Pitzurra L, et al, editors.Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to Candida albicans in hematopoietic transplantation. J Immunol; 2002.6:2904-13.

33.Joffe LS, Nimrichter L, Rodrigues ML, Del Poeta M. Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. mSphere; 2016.4:e00099-16.

The biological processes related to MicroRNA in fungi; a comprehensive over view

Fatemeh Sadeghi, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Fatemeh Peymaei, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Soleiman Khedri, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Raheleh Roudi, Oncopathology Research Center, Iran University of Medical Sciences Tehran, Iran.
Shahla Roudbar Mohammadi, Oncopathology Research Center, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
***Maryam Roudbary**, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences Tehran, Iran. (*Corresponding author). roudbari.mr@iums.ac.ir

Abstract

RNA processing is essential factor for synthesis of functional and structural proteins in eukaryote cells. In eukaryote organisms it will be initiated with transcription of DNA in nucleolus and terminated to mRNA translation in cytoplasm, finally mRNA degraded. Protein synthesis followed as different steps, includes 5' capping, poly adenylating, processing and transferring from nucleolus to cytoplasm that all processing control and regulate MicroRNA are small molecules that could be inhibit the translation or degrade the mRNA. Due to the main biological role of RNA in regulation of protein synthesis, it is obvious that fungal pathogenesis is highly related to RNA. Interfrence RNAs (iRNA) are small double strand RNA in fungi that produced by fungal genome or during translation process and play a key role in RNA silencing. Mycovirus is small double strand RNA that led to phenotypic variation in fungi and has a critical role in fungal pathogenesis. The recent studies demonstrated the role of RNA in fungal infection treatment. In this review because of key role of various type of fungal RNA we will discuss our current understanding of the fungal RNA pathways and their functions as well as how RNA can be used as a tool in fungal research especially for immunotherapy of fungal infection.

Keywords: MicroRNA, Interfrence RNA, RNA Biology, Gene silencing related RNA