

Candida albicans ve Quorum-Sensing Molekülleri

Özlem Abacı*, Alev Haliki Uztan

Özet

C. albicans hücreleri de diğer mikroorganizmalar gibi üretmiş oldukları sinyal molekülleri ile birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir yoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeterli yoğunluğa ulaştıklarında ise virulans faktörlerine ait genlerin ekspresyonları tetiklenmektedir. Böylelikle, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak başarılı bir şekilde infeksiyon başlamaktadır. Bu makalede *C. albicans* tarafından üretilen ve hücrenin maya formu ve hif formu arasında dönüşümü sağlayan farnesol ve tyrosol molekülleri tartışılacaktır.

Giriş

Çoğu fungal patojende olduğu gibi *C. albicans* dimorfik yani maya ve hifsel form arasında geri dönüşümlü olarak geçiş yapabilme yeteneğindedir. Bu morfolojik değişim çeşitli koşullara bağlı olarak sırası ile maya (blastospor), çimlenme (germ) tüpü, yalancı hif ve gerçek hif oluşumunu kapsamaktadır (1). Hif oluşumu 37 °C'de nötral pH ve serum varlığında uyarılmaktadır. Bu koşullar konak koşullarını taklit etmektedir. Çimlenme tüpü olarak adlandırılan yeni oluşan hif formlarının adhezyonlarının maya formuna göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Makrofajlar tarafından tutulan maya hücreleri hif oluşturarak makrofaji lizis etmektedirler. Bu fagolizozom içinde oluşan proteinazın mikrobisidal oksijen radikallerinin oluşumunu sağlayan proteince saldırmamasından ileri gelmektedir (2). *C. albicans* hifal gelişimi virulans faktörlerinin ekspresyonu ile aynı zamanda gerçekleşir. Adhezinler; Als (agglutinin-like sequence), Hwp1 (Hyphal Wall Protein), Int1 (İntegrin) ve Salgısal Aspartik Proteazlar (Sap 4-6) gibi virulans faktörleri hif formu tarafından üretilmektedir (Hypha-coregulated genler) (3-5).

C. albicans için hücreler $\geq 10^6$ hücre/ml olduğu zaman tomurcuklanan maya olarak, $< 10^6$ hücre/ml olarak inoküle edildiği zaman misel olarak gelişim göstermektedir. İnokulum boyut etkisi olarak bilinen bu durum dimorfik funguslarda en önemli fenomendir. Funguslardaki inokulum boyut etkisi quorum-sensing olarak bilinmektedir ve hücre dışı hücre yoğunluk bağımlı sinyaller quorum-sensing molekülleri adlandırılmaktadır (QSMs) (6, 7).

* 1) Dr., 2) Yrd. Doç. Dr. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AbD, İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: ozlemabaci@yahoo.com

Funguslarda Quorum-Sensing çalışmaları oldukça yenidir. Bir insan patojeni olan *C. albicans*'ın hücre morfolojisinin farnesol tarafından kontrol edildiği ilk kez 2001 yılında tanımlanmıştır ve farnesol ökaryotlarda keşfedilen ilk quorum-sensing molekülüdür (8). *C. albicans*'ta kültür ortamında biriken farnesol dimorfizmi kontrol etmektedir. Birçok fungusta gözlenen bu dimorfik özellik bitki ve hayvanlar için patojenite göstermektedir (9). Bu ekstrasellüler molekülün oldukça termostabil olduğu, 23- 43 °C aralığında maya hücre miktarı ile doğru orantılı miktarlarda üretildiği, farklı *C. albicans* strainleri üzerinde etkili olduğu ve besiyeri bileşimi ve yapısından etkilenmediği saptanmıştır (1-hidroksi-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatriene; C₁₅H₂₆O, moleküler ağırlığı. 222,37) (6).

Mosel ve ark. yapmış oldukları bir çalışmanın sonuçlarına göre; farnesol mayadan misel forma geçişi engellemesine rağmen, daha önceden oluşan hifin uzamasını engellemez. Bundan dolayı, farnesole hücrelerin cevap verebilmesi için sınırlı zamanı vardır. Hif indükleyici koşullara transfer edilen dinlenen hücreler farnesole hassastır (Farnesol 0.5saatte eklendiği zaman). Hif indükleyici koşullar altında kalınan süre arttıkça hifal büyümeye geçen hücre yüzdesi artar. ~60 dakikada bazı hücreler hifal gelişime geçerler ve farnesol hassas değildir. 90 dak. hemen hemen tüm hücreler hife dönüşür ve farnesole hassas değildir. Bir kez germ tüpü gözükteği zaman, hif oluşum ortamından tomurcuk indükleyen ortama geçiş maya oluşumunu sağlamaz. Farnesol mayadan misel forma geçişi engellemesine rağmen, daha önceden oluşan hifin uzamasını engellemez (10).

Candida Biyofilmi ve Farnesol

Kandidiyazis genellikle dental implantlar, yapay eklemler, merkezi sistem kataterleri gibi implante cerrahi aletlerin kullanımı ile ilgilidir. Bu aletler biyofilm gelişimi için substrat rolü oynamaktadır. Medikal ekipmanlar da biyofilm oluşumu *C. albicans* nedeni ile oluşan infeksiyonların ilerlemesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda Kandidiyazis gelişen katater kullanan 427 hastanın %41'inde ölüm saptanmıştır (11).

Biyofilm oluşumu protez ağrısının da gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Ve sağlıklı protez kullanan bireylerin %11-67'sini etkilemektedir (12).

Maya hücrelerince başlangıç kolonizasyonunu takiben 3-6 saat sonra germ tüpü oluşur. Yeterli germinasyon ile yapışan mayalar biyofilmin substrata kuvvetle bağlandığı basal tabakayı oluşturur. 48 saat sonra olgun bir biyofilm tipik olarak maya, misel ve pseudomisel içermektedir. Olgun bir *C. albicans* biyofilmi polisakkaritleri, karbonhidratları, proteinleri ve bilinmeyen komponentlerin oluşturduğu matriks içerisinde maya, hif ve pseudohifi içeren bir formdur (11-14).

Polimetilmethakrilat materyal üzerinde biyofilm oluşumu evreleri incelendiğinde;

1- Erken faz (0-11 saat) : Fungus hücrelerinin substrata adhezyonu

2- Orta faz (12-30 saat) : Maya formundan hif formuna geçiş (dimorfizm) ile matriks oluşumu

3- Olgun faz (31-72 saat) : Fungus hücreleri tamamen kalın bir ECM (hücre dışı materyal) ile kaplanmış olmak üzere 3 faz saptanmıştır (11).

Biyofilmde çoklu morfolojiye sahip hücrelerin varlığı farnesolün hücrel morfolojiyi düzenlemede ve olgun biyofilmin oluşumunda role sahip olduğunu göstermektedir.

Ramage ve ark. biyofilmde çoklu morfolojiye sahip hücrelere ve olgun biyofilm oluşumuna farnesolün etkisini incelemişler ve şu sonuçlara ulaşmışlardır.

1- Farnesol ile muamele edilmemiş kontrol biyofilmde temel olarak gerçek hif mevcuttur.

2- 3 ve 30 μM farnesol uygulandığı zaman biyofilm maya hücreleri, pseudohif ve gerçek hiften oluşmaktadır.

3- 300 μM farnesol ilave edildiğinde sınırlı biyofilm oluşumu vardır. Oluşan biyofilm maya hücreleri ve pseudohiften oluşmaktadır (15).

Farnesol konsantrasyonu bir kez artınca yeni üretilen maya hücrelerinde miselial gelişim gözlenmez, hücreler maya formunda olur. Bu mayalar da olgun biyofilmden uzaklaşır ve herhangi bir yerde yeni bir biyofilm oluşumunu başlatır. Olgun biyofilm süpernatantının planktonik *C. albicans*'in biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini gözlenmiştir. Farnesol veya diğer süpernatant faktörlerinin biyofilm içinde yerler veya kanallar açılmasına yardım ettiği, bunun da yüzeyde daha fazla kolonizasyonu engelleyerek besin alınımını ve atık ürün atılımını sağladığı hipotezidir (8).

Ramage ve ark. ayrıca, Farnesol ile muamele olmuş hücrelerin Northern blot analizini yapmak üzere hücreleri 24 ve 48 saat 30 μM farnesol ile muamele etmişlerdir. İzole edilen RNA, *HWP1* probe ile hibridize edilmiştir. Farnesol ile muamele olmuş hücrelerde *HWP1* mRNA ekspresyonunun farnesol ile muamele edilmemiş hücrelere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (15).

***C. albicans*'ta Tyrosol Etkisi**

C. albicans farklı yoğunluk bağımlı feromonlar gösterir. En fazla dikkat çeken QS davranışlarından birisi hücreler taze ortam ile dilue edildikleri zaman hücrelerin gösterdikleri oldukça uzun lag fazıdır. Dilüsyon artıça eksponansiyel fazın başlaması uzun sürer. Bunun nedeni hücre solüsyonuna taze ortam eklendiğinde hücrelerin farklılaşması sırasında ortama salınan otoindükleyici moleküllerin seyrelmesidir. Bu şekilde bu bileşikler kritik konsantrasyonun altına düşmektedir.

Tyrosol düşük hücre yoğunluğunda hücre büyümesini ve germ tüpü oluşumunu indükler. Maya formundan filamentöz forma dönüşümü hızlandırır.

Hücre yoğunluğunun *C. albicans* gelişimi üzerine etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada; 1 gecelik sentetik minimal ortamda kültüre edilmiş *C. albicans* kültürü üzerine dilue ortam ilave edilmiştir.

Tyrosol varlığında ve yokluğunda *C. albicans* hücrelerinde germ tüpü oluşumu incelenmiş ve tyrosol varlığında 1. saatte hücrelerin %55'nin ve 2. saatte %80'nin germ tüpü oluşturduğu gözlenmiştir (16)

***C. albicans*'ın yer aldığı karışık enfeksiyonlar**

Herhangi vücut bölgesinde herhangi bir türün kolonizasyonu onun konak ile etkileşime girme yeteneği ve diğer mikroorganizmalar ile yarışabilme yeteneğine bağlıdır. Kompleks substratların kodedegrasyonu veya büyüme faktörlerinin birlikte kullanılması veya antibiyotik ve hücre dışı enzimler ile oluşan antogonistik ilişkiden kaçınma gibi sinerjistik etkileşim organizmanın mikrobiyal komünitede hayatta kalmasını sağlamaktadır.

C. albicans dimorfik bir fungus ve *P. aeruginosa* bu iki fırsatçı patojen insan konukçuda farklı bölgelerde enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalar *P. aeruginosa* varlığının *C. albicans* gelişimini sınırladığını göstermektedir. Ve antibiyotik tedavisinin arkasından *P. aeruginosa*'nın zayıflatılması ile *C. albicans* popülasyonunda artış söz konusudur.

Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* N-3-oxo-C12 homoserin lactone (3OC12HSL) hücre-hücre iletişimde rolü olan molekülün 200 µm konsantrasyonda *C. albicans* büyüme oranı değiştirmeksizin hif oluşumunu tamamen baskıladı. pH=7'de 2,5mM N-asetilglukozamin içeren filament indükleyici yeast-nitrojen base ortamında *C. albicans* SC5314 kültürü mikroskopik olarak değerlendirildiğinde dominat olarak filamentler saptanmıştır. Ancak aynı koşullarda *P. aeruginosa* ile büyütüldüğünde fungal hücrelerin çoğunun maya formunda olduğu gözlenmiştir. Faz-kontrast ve epifluoresan mikroskopu ile canlı/ölü (live/dead) boyama sistemi ile değerlendirildiğinde filamentlerin ölü maya hücrelerinin canlı olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada N-3-oxo-C12 homoserin lactone (3OC12HSL) varlığında *C. albicans*'ta hif spesifik genler (*HWP1*, *ECE1* ve *SAP5*) ve maya spesifik (*RBE1*, *YWP1* ve *RHD1*) ekspresyonu incelenmiştir. Sonuçta N-3-oxo-C12 homoserin lactone *HWP1*, *ECE1* ve *SAP5* genlerinin ekspresyonlarını filament indükleyici ortam olmasına rağmen düşürmüştür (17).

Bu *C. albicans* morfolojisini çalışmak için şans yaratmaktadır. Maya ile filament formu arasındaki geçiş ile ilgili çok fazla bilgi mevcut değildir. Fakat bu geçişi anlayabilmek ilerde yeni antifungallerin geliştirilmesini sağlayacaktır.

Funguslar Arasındaki Antagonizmde Farnesol Rol Oynayabilir

E. nidulans ve *Trichopyton rubrum* *C. albicans* ile birlikte büyütüldüğünde veya *C. albicans*'ın filtre edilmiş harcanmış ortamında büyütüldüğünde gelişme göstermemiştir.

Westwater ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmanın sonuçlarına göre; *C. albicans* birlikte ürettiği *Enterococcus faecalis* gibi bazı bakterilerin ve konağın fagositlerinin ürettikleri hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi oksidatif streslerden de farnesol aracılığı ile korunmaktadır. *C. albicans* memeli konaktaki fungal yarışmacıları elemine etmek için farnesol kullanmaktadır. Bu hipotez neden klinik lezyonlardan genellikle *C. albicans*'ın saf kültür olarak izole edildiğini açıklamaktadır (18)

Sonuç olarak, *C. albicans* infeksiyonları temelde organizmanın maya formundan hif formuna geçiş yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; *C. albicans* ile enfekteli dokularda, özellikle dokunun derin bölgelerinde hifler mevcuttur. Fare enfeksiyon modellerinde hif oluşturma yeteneği, değiştirilmiş veya zayıflatılmış *C. albicans* mutantların kullanıldığında hifal büyüme ile *Candida* kaynaklı konukçu ölümleri arasında korelasyon gösterilmiştir. *C. albicans* hücre adhezinleri ve virulans ile ilgili gen ürünleri fungusun hifal formunda daha fazla eksprese edilmektedir.

Kaynaklar

- 1- Molero G., Diez-Orejas R., Navarro-Garcia F., Monteoliva L., Gil C., Sanchez-Perez M., Nombela C., 1998, *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity, Internatl. Microbiol, Vol. 1, 95-106.
- 2- Matthews, R., Burnie, J., 1998, The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: applications in prevention and treatment, Bull Ins. Pasteur, Vol.96, 249-256.
- 3- Hube B. and Naglik J., 2001, *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family, Microbiology, 147, 1997-2005.
- 4- Dhillon N.K., Sharma S., Khuller G.K., 2003, Signaling Through Protein Kinases and Transcriptional Regulators in *Candida albicans*, Critical Reviews in Microbiology, 29, 259-275.
- 5- Kumamoto C.A., Vences M.D., 2005, Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence, Cellular Microbiology, 7, 1546-1554.
- 6- Nickerson, K.W., Atkin, A.L., Hornby, J.M., 2006, Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond, Applied and Environmental Microbiology, 72, 3805-3813.
- 7- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K. W., 2001, Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol, Applied and Environmental Microbiology, 67, 2982- 2992.
- 8- Hogan, D.A., 2006, Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi, Eukaryotic Cell, 5, 613-619.
- 9- Sprague, G.F., Stephen C. Winans, S.C., 2006, Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast, *Genes Dev.* 2006 20: 1045-1049
- 10- Mosel, D. D., Dumitru, R., Hornby, J. M., Audrey L. Atkin, A. L., Nickerson, K.W., 2005, Farnesol Concentrations Required To Block Germ Tube Formation in *Candida albicans* in the Presence and Absence of Serum, Applied And Environmental Microbiology, 71: 4938-4940.
- 11- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A., 2001, Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance, Journal of Bacteriology, 183, 5385-5394.

- 12- Kojic, E.M., Darouiche, O.R., 2004, *Candida* Infections of Medical Devices, *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 255-267.
- 13- Ramage G., Saville S.P., Thomas D.R., Lopez- Ribot J.L., 2005, *Candida* Biofilms: an Update, *Eukaryotic Cell*, 4, 633- 638.
- 14- Lobile, C.J., Mitchell, A.P., 2006, Genetics and Genomics of *Candida albicans* biofilm formation, *Cellular Microbiology*, 8, 1382-1391.
- 15- Ramage G., Saville, S.P., Wickes, B.L., Lopez-Ribot., 2002, Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5459-5463.
- 16- Chen, H., Fujita, Q., Feng, J.C., Fink, G.R., 2004, Tyrosol is a quorum sensing molecule in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 5048-5052.
- 17- Hogan, D.A., Vik A., Kolter, R., 2004, A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology, *Molecular Microbiology*, 54, 1212-1223.
- 18- Westwater, C., Balish, E., Schofield, D.A., 2005, *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell* , 4: 1654-1661.