

REGLAREA DIMORFISMULUI PRIN MOLECULE QUORUM SENSING LA SPECIA CANDIDA ALBICANS

Dimorphism regulation through quorum sensing molecules in Candida albicans species

Asist. Univ. Dr. Elena Rusu, Șef Lucr. Dr. Cristina Daniela Cristescu

Facultatea de Medicină, Universitatea „Titu Maiorescu”, București

REZUMAT

Speciile genului *Candida* sunt fungi dimorfi oportuniști care se găsesc la nivelul mucoaselor gazdei și cauzează apariția bolilor superficiale și sistemice. *Candida albicans* a fost prima specie de drojdii la care a fost identificat sistemul quorum sensing (QS). Această specie are capacitatea de a-și modifica morfologia din celule de drojdie în hife, iar acesta este cel mai important factor de virulență. *C. albicans* manifestă câteva fenomene care depind de densitate. Densitatea celulară controlează modificările morfologice între forma celulară de drojdie și forma filamentoasă. La densități celulare crescute celula de *Candida* este sub formă de drojdie, iar la densități celulare scăzute celula de drojdie dezvoltă tub de germinație. Acumularea farnesolului blochează tranziția de la drojdie la hifă la densități celulare crescute, iar adăugarea de farnesol exogen inhibă formarea tubilor germinativi. Această moleculă inhibă formarea tubilor germinativi, dar nu previne elongarea hifelor. O altă moleculă, tirosolul, accelerează procesul de formare a tubilor germinativi. Morfogeneza speciei *C. albicans* este controlată în funcție de condițiile de mediu, pozitiv și negativ, prin acțiunea tirosolului respectiv a farnesolului. Controlul reciproc al formării tubilor germinativi prin farnesol și tirosol reflectă o structură complexă a reglării metabolice care stimulează sinteza acestor molecule reglatoare.

Cuvinte cheie: Candida, quorum sensing, farnesol

ABSTRACT

The species of *Candida* genus are opportunistic dimorphic fungus that inhabits various host mucosal site and cause both superficial and serious systemic diseases. *Candida albicans* was the first fungal pathogen shown to exhibit quorum sensing. This species has the ability to switch from yeast morphology to hyphal morphology and this is to be a major determinant of virulence. *C. albicans* display several density-dependent phenomena. Cell density controls the morphological switch between the cellular yeast form and the filamentous hyphal form: at high cell densities *Candida* cell is in the yeast form and at low cell densities the yeast-form cell develops a germ tube. The accumulation of farnesol blocks the transition from yeast to hypha at high cell densities, and exogenously added farnesol inhibits germ tubes formation. This molecule blocks germ tubes formation but does not prevent the elongation of existing germ tubes. Another quorum sensing molecule, tyrosol, accelerates the process of germ tube's formation. The morphogenesis of *C. albicans* species is under complex positive and negative control by environmental conditions. The reciprocal control of germ-tube formation by farnesol and tyrosol must reflect a complex structure of metabolic regulation that stimulates the synthesis of these regulatory molecules.

Key words: Candida, quorum sensing, farnesol

INTRODUCERE

Specia *Candida albicans* este un fung dimorf care are capacitatea de a adopta un spectru de

morfologii; de aceea ea este considerată un organism „polimorfic” sau „pleomorfic”. *Candida albicans* se poate reproduce prin înmugurire, sub formă de celule de drojdie (blastospori sau blastoconidia). În

Adresă de corespondență:

Asist. Univ. Ddr. Elena Rusu, Facultatea de Medicină, Universitatea „Titu Maiorescu”, Str. Gheorghe Petrașcu nr. 67A, București
e-mail: elenarusu98@yahoo.com

anumite condiții de creștere, *C. albicans* poate forma și chlamidospori, care au forma circulară și un perete celular subțire. Aceste tranziții morfologice reprezintă răspunsul celulelor de drojdie la modificările condițiilor de mediu și îi permit să se adapteze la diferite nișe biologice. Capacitatea acestei specii de a adopta morfologii diferite este esențială pentru diseminarea infecției.

DIMORFISMUL

Unul dintre cei mai importanți factori de virulență ai speciei *Candida albicans* este reprezentat de dimorfismul acesteia, de abilitatea acestei specii de a crește sub diferite forme morfologice. *Candida albicans* se dezvoltă sub formă de celule de drojdie înmugurite sau sub formă de hife filamentoase – lanțuri lungi de celule fără constricție septală, sau pseudohife – celule alungite cu constricție septală. Deoarece lanțurile au formă asemănătoare, hifele și pseudohifele sunt confundate adesea în literatura de specialitate. Termenul general de „formă filamentoasă” se referă la ambele morfologii. Producerea de tubi germinativi rezultă din conversia la faza filamentoasă hifală, numită și formă de miceliu (1). Formarea pseudohifei are loc în timpul diviziunii celulare, când celulele de drojdie se dezvoltă prin înmugurire și se lungesc fără să se separe de celulele adiacente (Fig. 1).

Un factor esențial al dimorfismului este capacitatea acestei specii de a supraviețui ca o specie comensală la nivelul diferitelor situsuri anatomice. Din această cauză specia *Candida albicans* are capacitatea de a-și adapta tipul de creștere și dezvoltare ca răspuns la diferite condiții fiziologice ale gazdei. *Candida albicans* dezvoltă o multitudine de meca-

nisme ca răspuns la aceste condiții, reacții care sunt activate și coordonate de modificările apărute în fiziologia și morfologia celulei, precum și de aderența la celulele gazdei (2).

Factorii chimici sau de mediu care influențează interconversia de la forma de drojdie la forma hifală sunt: temperatura, pH-ul, prezența serului, nivelul glucozei, substraturile pe bază de azot, nivelul CO₂, prezența metalelor tranzitionale, agenții chelatori precum și densitatea celulară inițială (mărimea inoculului).

Temperatura – forma de hifă se dezvoltă la o temperatură apropiată de temperatura corpului uman (37-38°C). La temperaturi mai mici, specia *C. albicans* se dezvoltă sub formă de celule de drojdie.

pH-ul – în condiții optime (37°C) procesul de filamentație este favorizat de valori ale pH-ului apropiate de pH-ul neutru. La pH < 6 dezvoltarea hifelor este foarte redusă, iar la pH = 4 este predominantă creșterea sub formă de celule de drojdie (3). Din această cauză mecanismul de reglare a valorii pH-ului controlează dimorfismul și adaptarea acestei specii la zone anatomice cu valori diferite de pH în care are loc infectarea țesuturilor gazdei.

Ioni metalici – tranziția de la forma de drojdie la forma de hifă este inhibată de prezența unor ioni metalici în mediul de cultura: Co²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ și Se²⁺ (4).

QUORUM SENSING

În 1994 a fost identificată o formă de reglare la nivelul populației microbiene. Acest mod de reglare individuală populațională a fost denumită **quorum**

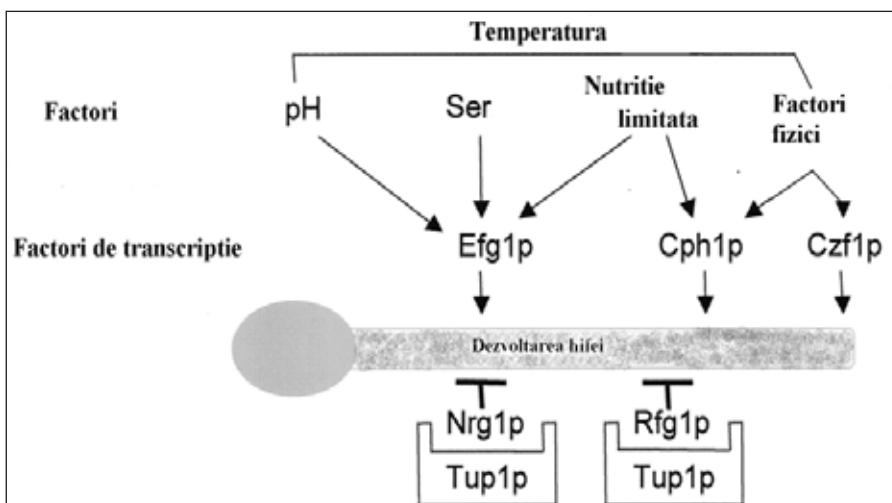


FIGURA 1. Factori care influențează dezvoltarea hifei la specia *C. albicans*

sensing (la bacterii). Răspândirea acestui fenomen și a tipurilor diferite de quorum sensing indică faptul că reglarea în funcție de densitatea celulară este un proces foarte important pentru supraviețuirea microorganismelor patogene la nivelul diferitelor nișe ecologice (5).

Candida albicans a fost prima specie de drojdie la care a fost identificat sistemul quorum sensing (QS). Moleculile care induc semnale extracelulare și sunt dependente de densitatea celulară sunt numite **moleculă quorum sensing** (QSM) (6). Capacitatea acestei specii de a adopta morfologii diferite este esențială pentru diseminarea infecției. Este cunoscut faptul că formarea hifelor este inhibată de o densitate celulară ridicată și de creșterea culturilor celulare în faza staționară. Celulele speciei *Candida albicans* se dezvoltă sub formă de drojdie când mărimea inoculului are o densitate celulară $\geq 10^6$ celule/ml și sub formă filamentoasă când este $\leq 10^6$ celule/ml. S-ar părea că efectul mărimii inoculului este un fenomen general întâlnit la speciile de fungii care prezintă dimorfism (7).

În 2001, două grupuri independente de cercetători au realizat identificarea unui factor ce inhibă dezvoltarea hifală la specia *C. albicans* (6). Această substanță extracelulară era **farnesolul** și a fost denumită „**molecula quorum sensing**“. Farnesolul este responsabil de efectul mărimii inoculului la această specie. QS este un fenomen bine-cunoscut la procariote, dar la eucariote este abia la început. Farnesolul este o moleculă extracelulară sintetizată în timpul creșterii celulare la temperaturi între 23-43°C, iar concentrația lui este proporțională cu UFC/ml (unități formatoare de colonii/ml). El există în 4 forme izomere, dar numai unul dintre izomeri are activitate de QSM. Hornby și colaboratorii săi au testat capacitatea de filamentație a speciei *C. albicans* utilizând trei tipuri de substanțe ce induc aceasta tranziție: L-prolina, GlcNAc (N-acetilglucozamina) și serul. Ei au constatat că farnesolul previne conversia de la forma de drojdie la cea de hifă, rezultând o dezvoltare a celulelor de drojdie înmugurite fără să afecteze însă rata de creștere, chiar și la concentrații ale farnesolului mai mici de 300 μ M. Pentru reducerea formării tubilor germinativi cu aproximativ 50% este suficientă o concentrație de 1-2 μ M a farnesolului. Testele de filamentație în prezența serului necesită o concentrație mai crescută de farnesol (150-200 μ M). Această creștere a concentrației farnesolului este pusă pe seama capacității albuminei de a lega

compușii lipidici. Cu toate că farnesolul inhibă conversia drojdie-hifă, el nu inhibă elongarea hifelor existente deja în mediu (7,8).

Este posibil ca farnesolul să medieze interacțiuni ale fungilor cu mediul în care se găsesc datorită faptului că este moleculă extracelulară inductoare de QS. Studiul realizat de Hornby J. M. și colaboratorii săi este primul care evidențiază o moleculă inductoare a QS la eucariote. Cu toate că funcția acestei molecule inductoare QS este de inhibare a tranziției drojdie-hifă, *Candida albicans* poate sintetiza molecule inductoare QS în cantitate mai mare sau egală la temperaturi $\geq 37^\circ\text{C}$; *in vitro* celulele se dezvoltă sub formă de miceliu. Această producere continuă a moleculelor inductoare QS la temperaturi $\geq 37^\circ\text{C}$ explică:

- obținerea de densități celulare $\leq 10^6/\text{ml}$ la testarea formării tubilor germinativi la temperatura de 37°C ;
- formarea de molecule inductoare QS în corpul uman în timpul infecției produsă de specia *Candida albicans*;
- preîntâmpină modul discontinuu de creștere a tubilor germinativi și a hifelor doar la temperaturi $\geq 37^\circ\text{C}$, deoarece la temperatura de $35\text{-}36^\circ\text{C}$ nu se produc molecule inductoare QS.

Unele studii au arătat că farnesolul inhibă creșterea celulelor speciei *C. albicans* și promovează apoptoza prin inducerea caspazelor, producerea radicalilor liberi ai oxigenului și distrugerea integrității mitocondriei (9). Mitocondria are un rol foarte important în necroza și apoptoza celulară, iar creșterea permeabilității membranei mitocondriale este considerată un semnal cheie în apoptoză. În acest sens, s-a observat în prezența farnesolului, o modificare a unor proteine implicate în lanțul transportor de electroni.

SINTEZA FARNESOLULUI

Farnesolul este sintetizat pe o cale alternativă a biosintezei sterolilor, cale mediată de farnezilpirofosfat (FPP). FPP reprezintă un punct important în metabolismul lipidic (Fig. 2). Extractele celulare de *Candida albicans* convertesc [^3H]FPP în [^3H] farnesol. Specia *Saccharomyces cerevisiae* conține două enzime pirofosfat fosfataze importante, *Lpp 1p* și *Dpp 1p*. Omologii lor la specia *Candida albicans* sunt *Dpp 2* și *Dpp 1* (7). Producerea farnesolului este crescută în prezența medicamentelor

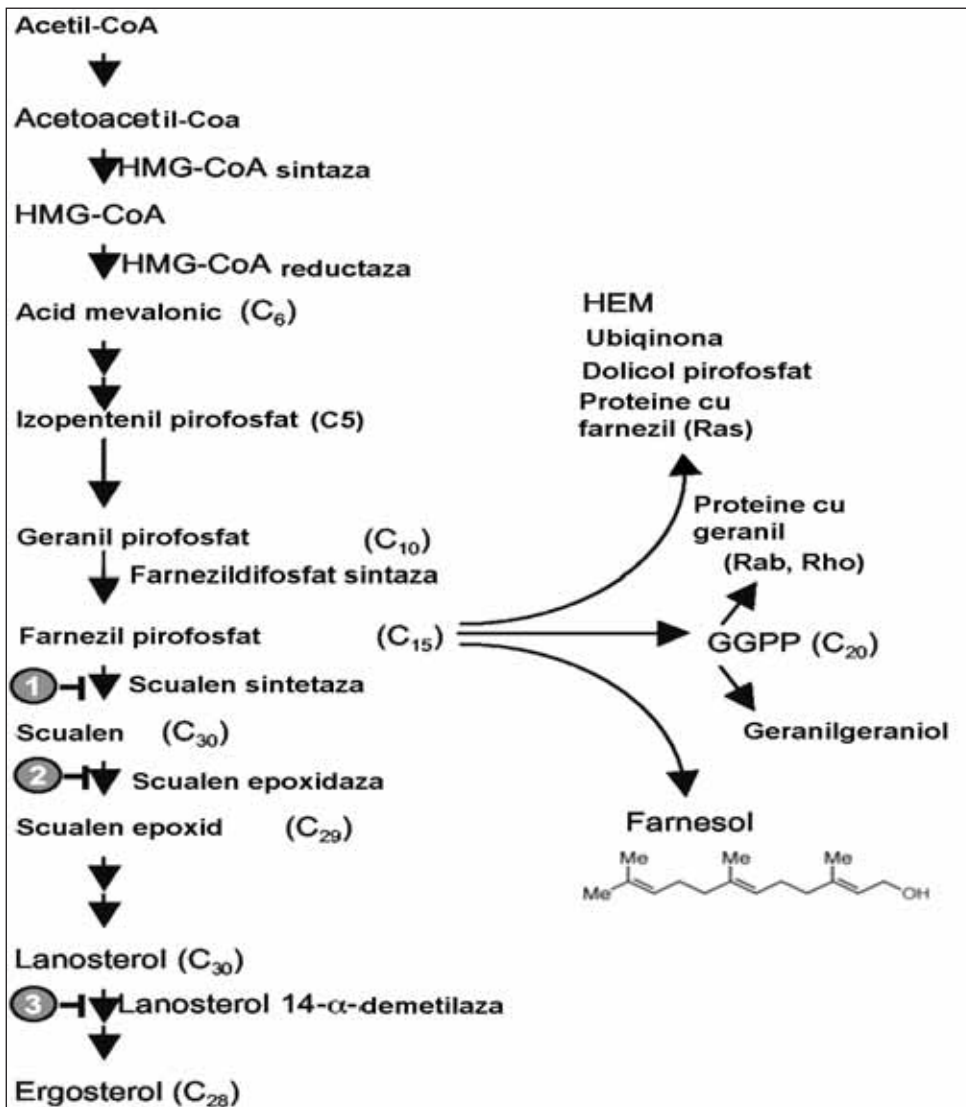


FIGURA 2. Sinteza farnesolului

care blochează biosinteza sterolilor fungici. În prezența acidului B zaragozic, fluconazolului, clotrimazolului, ketoconazolului și miconazolului, nivelul farnesolului este crescut de 8, 10, 45, 45 și respectiv 44 de ori (pentru o concentrație de 0,5-1 μM). Producerea și concentrația farnesolului este direct proporțională cu concentrația medicamentului utilizat (10). Acidul zaragozic inhibă squalen sintetaza, în timp ce azolii inhibă lanosterol 14α-demetilaza, enzima cheie în biosinteza ergosterolului. Din figura 2 se observă inhibiția enzimelor:

- acidul zaragozic inhibă squalen sintetaza;
- terbinafina inhibă squalen epoxidaza;
- fluconazolul inhibă lanosterol 14α-demetilaza.

Acumularea farnesolului în celulă blochează tranziția morfologică de la forma de drojdie la cea de hifă la densități celulare crescute (11), iar adăugarea de farnesol exogen inhibă formarea tubilor germinativi în prezența serului, a prolinei și a

GlcNAc. Farnesolul inhibă apariția tubilor germinativi, formarea biofilmului fungic și stimulează activitatea antimicrobiană, rezistența la medicamente și rezistența la stresul oxidativ.

Tirosolul este a doua moleculă QS identificată la specia *Candida albicans*. El este un derivat al tirozinei, iar denumirea științifică este 2-[4-hidroxifenil]etanol. Asemănător cu farnesolul, acest compus se obține în mediul de creștere continuu, în timpul creșterii celulelor. El are proprietăți care duc la diminuarea fazei de lag, care se înregistrează atunci când culturile celulare diluate sunt lăsate peste noapte în mediu de cultură proaspăt (12). S-a constatat experimental că tirosolul accelerează formarea tubilor de germinație. De aceea, procesul de morfogenează al speciei *C. albicans* este reglat pozitiv și negativ prin acțiunea tirosolului, respectiv a farnesolului. Alcolii aromatici feniletanol și triptofitol au fost identificați ca molecule QS la specia *Saccharomyces cerevisiae* (13). Acești compuși

care sunt produși și de specia *C. albicans* stimulează procesul de creștere al pseudohifelor la specia *S. cerevisiae* la concentrații scăzute, în timp ce tirosolul nu înregistrează nici un fel de efect.

BIOFILMUL ȘI MOLECULELE QUORUM SENSING

Multe microorganisme patogene au capacitatea de a forma un biofilm *in vivo* în funcție de factorii favorizanți. Biofilmul reprezintă o structură care se atașează la diferite materiale sintetice. El este definit ca o populație microbială care se găsește atașată la o anumită suprafață și este încadrată într-un matrix extracelular. Marea majoritate a infecțiilor microbiene implică și formarea acestui biofilm microbial (14). Protezele dentare, ortopedice, dispozitivele cardiovasculare, cateterile urinare, implanturile, tuburile traheale sunt doar câteva dintre dispozitivele sintetice care favorizează colonizarea și formarea biofilmului de către speciile genului *Candida*. Biofilmul se dezvoltă atunci când microorganismul aderă la o astfel de suprafață și produce polimeri extracelulari ce formează un matrix extracelular. Acest matrix facilitează adeziunea biofilmului la dispozitivul implantat. În interiorul biofilmului microorganismele au un comportament diferit față de cele care se găsesc libere și sunt mult mai rezistente la tratamentele specifice (15).

La pacienții care prezintă infecții cu specia *C. albicans* apare de cele mai multe ori rezistența acestei specii la medicamentele antifungice, în special la fluconazol. De asemenea, la pacienții cu afecțiuni care duc la scăderea sistemului imunitar, se dezvoltă frecvent biofilmul produs de această specie. S-a constatat că farnesolul are posibile pro-

prietăți antimicrobiene și poate interfera cu dezvoltarea rezistenței la fluconazol a biofilmului produs de specia *C. albicans*. Rezultatele au evidențiat o scădere a concentrației minime inhibitorii și dezvoltarea unui biofilm imatur din punct de vedere al structurii, la celulele tratate cu farnesol, indicând că această moleculă QS poate inhiba dezvoltarea rezistenței la fluconazol (16). De asemenea, farnesolul inhibă dezvoltarea tubilor germinativi și exprimarea unor gene care specifică morfologia speciei, exprimarea acestor gene fiind necesară pentru formarea unui biofilm matur (17). Farnesolul interferează la mai multe niveluri în formarea și dezvoltarea biofilmului, inclusiv în aderența celulelor la substrat, la nivelul arhitecturii biofilmului matur și la dispersarea celulelor din biofilm.

CONCLUZIE

Procesul de morfogeneză al speciei *C. albicans* este reglat pozitiv și negativ prin acțiunea tirosolului, respectiv a farnesolului. Farnesolul inhibă apariția tubilor germinativi, formarea biofilmului fungic și stimulează activitatea antimicrobială, rezistența la medicamente și rezistența la stresul oxidativ. Tirosolul scurtează faza de lag, stimulează filamentația în celulele de drojdie și forma de hifă în stadiul incipient al formării biofilmului. Controlul reciproc al formării tubilor germinativi prin farnesol și tirosol reflectă o structură complexă a reglării metabolice care stimulează sinteza acestor molecule reglatoare. Corelarea dimorfismului cu patogenitatea arată că interferența în modificările morfologice pot constitui o metodă pentru controlul patogenității.

BIBLIOGRAFIE

1. Chaffin W.L., Lopez-Ribot J.L., Casanova M., et al. – Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol. and Molec. Biol. Reviews.* 62 (1) 1998.
2. Biswas S., Van Dijck P., Datta A. – Environmental sensing and signal transduction pathways regulatig morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. and Molec. Reviews.* 2007. 71(2). 348-376.
3. Penalva M.A., Arst H.N.Jr. – Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Molec. Biology Reviews.* 2002. 6 (3). 426-446.
4. Harrison J.J., Ceri H., Yerly J., et al. – Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 20007. 73 (15). 4940-4949.
5. Hogan A.D. – Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing to fungi. *Eukaryotic Cell.* 2006. 5 (4). 613-619.
6. Hornby J.M., Jensen E.C., Liser A.D., et al. – Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. 67(7). 2982-2992.
7. Nickerson W.K., Atkin A.L., Hornby J.B. – Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72 (6). 3805-3813.
8. Mosel D.D., Dumutru R., Hornby J.M., et al. – Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. 71(8). 4938-4940
9. Shirliff M.E., Krom B.P., Meijering A.M., et al. – Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. 53(6). 2392-2401

10. **Hornby J.M., Nickerson K.W.** – Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azole antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. 48. 2305-2307
11. **Langford D.L., Hasim S., Nickerson K.W.** – Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. 54(2). 940-942
12. **Alem M.A.S., Oteef M.D.Y., Flower T.H., et al.** – Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell.* 2006. 5(10). 1770-1779.
13. **Chen H., Fink G.R.** – Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 2006. 20. 1150-1161.
14. **Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.** – Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999. 284. 1318-1322.
15. **Ramage G., Vande Walle K., Wickes B. L., et al.** – Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. 45(9). 2475-2479.
16. **Yu L., Wei X., Ma M., et al.** – Possible inhibitory molecular mechanism of fluconazole on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. 56(2). 770-775
17. **Deveau A., Hogan D.A.** – Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods Mol. Biol.* 2011. 692. 219-233