

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko–biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Daniela Urbanová

Role MDR transportérů v rezistenci biofilmů u kvasinek
Role of MDR transporters in yeast biofilm resistance

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 05. 2012

Podpis

Děkuji paní profesorce RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za vedení mé bakalářské práce a cenné rady.
Děkuji paní doktorce RNDr. Libuši Váchové, CSc. za mnohé rady a konzultace při vypracování práce.

Obsah

Seznam užitých zkratk.....	2
Abstrakt.....	3
1 Úvod.....	4
2 MDR proteiny.....	5
2.1 ABC-transportní proteiny.....	5
2.1.1 Struktura ABC-transportních proteinů.....	6
2.1.2 Mechanismus transportu toxických látek.....	6
2.1.3 Zástupci ABC transportérů.....	7
2.2 MFS-transportní proteiny.....	11
2.2.1 Struktura MFS-transportních proteinů.....	12
2.2.2 Mechanismus transportu toxických látek.....	13
2.2.3 Zástupci MFS transportérů.....	13
3 Biofilm.....	14
3.1 Vznik biofilmu.....	14
3.2 Architektura biofilmu.....	16
3.3 Mezibuněčná signalizace.....	18
3.4 Mechanismy rezistence biofilmů vyjma MDR transportérů.....	19
3.5 Role biofilmů v pathogenezi.....	20
4 Role MDR transportérů v rezistenci biofilmů a kolonií.....	21
4.1 MDR transportéry ovlivňující rezistenci biofilmů a kolonií.....	21
4.1.1 MDR transportéry Cdr1p a Cdr2p kvasinky <i>C. albicans</i>	21
4.1.2 MDR transportér Mdr1p kvasinky <i>C. albicans</i>	23
4.1.3 MDR transportér Pdr16p kvasinky <i>C. albicans</i>	24
4.1.4 MDR transportéry kvasinky <i>S. cerevisiae</i>	26
4.2 Rezistence v průběhu vývoje biofilmu.....	28
4.3 Lokalizace MDR transportérů v koloniích.....	30
5 Závěr.....	31
6 Seznam použité literatury.....	32

Seznam užitých zkratk:

ABC	ATP-binding cassette	ATP-vázající kazeta
ATP	adenosin triphosphate	adenosin trifosfát
cAMP	cyclic adenosin monophosphate	cyklický adenosin monofosfát
CDR	Candida drug resistance	Candida rezistence k toxickým látkám
ECM	extracellular material	mezibuněčná hmota
GPI	glycosyl phosphatidylinositol	glykosyl fosfatidylinositol
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogeny aktivovaná protein kináza
MDR	multidrug resistance	mnohočetná léková rezistence
MFS	major facilitator superfamily	nadrodina hlavních zprostředkovatelů
NBD	nucleotide-binding domain	nukleotid-vazebná doména
PDR	pleiotropic drug resistance	pleiotropní rezistence k toxickým látkám
PKA	protein kinase A	protein kináza A
TMD	transmembrane domain	transmembránová doména
TMS	transmembrane segment	transmembránový segment

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na transportéry mnohočetné lékové rezistence (MDR) a jejich roli v rezistenci biofilmů kvasinek k toxickým látkám. Biofilmy jsou strukturovaná mikrobiální společenstva produkující extracelulární matrix a projevující odlišné vlastnosti ve srovnání s individuálními buňkami, mimo jiné z hlediska odolnosti k antimikrobiálním látkám. MDR pumpy přispívají k vyšší rezistenci biofilmů pouze v počátečních fázích jejich vývoje, později jsou nahrazeny mnoha jinými mechanismy. Nejvýznamnějšími MDR přenašeči kvasinky *Candida albicans* jsou Cdr1p, Cdr2p a Mdr1p. Cdr1p a Cdr2p způsobují rezistenci k azolům – flukonazolu, ketokonazolu a itraconazolu, které byly dříve hojně používané jako léčiva proti kvasinkovým onemocněním. Mdr1p rovněž přispívá k rezistenci k flukonazolu. Rezistence k léčivům působí značné problémy v terapii kvasinkových onemocnění, proto je porozumění mechanismům, které odolnost kvasinkových společenstev způsobují, velmi důležité.

Klíčová slova: rezistence, MDR transportéry, *Candida albicans*, biofilmy

Abstract

This work is focused on multidrug resistance transporters (MDR) and their role in the drug resistance of yeast biofilms. Biofilms are structured microbial communities that are markedly different from planktonic cells. Biofilm cells produce extracellular matrix and display other typical characteristics related to their enormous resistance to antimicrobial agents. MDR pumps contribute to higher resistance of biofilms only during early phases of biofilm development; later, MDR pumps are substituted by many other mechanisms. Cdr1p, Cdr2p and Mdr1p are the most important MDR transporters of *Candida albicans*. Cdr1p and Cdr2p cause resistance to azoles – fluconazole, ketoconazole and itraconazole, which have been widely used as drugs against yeast infections. Mdr1p contributes also to the resistance to fluconazole. Drug resistance causes considerable problems in the treatment of fungal infections. For this reason, it is so important to understand drug-resistance mechanisms of yeast communities.

Keywords: resistance, MDR transporters, *Candida albicans*, biofilms

1 Úvod

Kvasinky jsou mikroskopické eukaryotní organismy, bez kterých si už život v naší civilizaci nedovedeme představit. Využíváme je v pekařství, vinařství, pivovarnictví, mlékařství, ale také při tvorbě biodegradovatelných plastů nebo ve zdravotnictví a biotechnologiích jako producenty heterologních proteinů. Naneštěstí kvasinky nejen člověku pomáhají, ale často mu mohou i škodit. Existuje několik desítek druhů potenciálně patogenních kvasinek. Nejvýznamnější patogeni patří do rodů *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassesia* a *Trichosporon*. Většinou působí kožní onemocnění, ale mohou se dostat i dovnitř těla, kde napadají orgány a mohou způsobit sepsi, která v těžkých případech může končit smrtí.

Důležitým faktorem virulence je mimo jiné tvorba biofilmu. Biofilmy jsou strukturovaná mikrobiální společenstva připevněná k podkladu. Většina buněk biofilmu je zapuštěná v extracelulární matrix, tvořené různými polymerními látkami, a fenotypicky se výrazně liší od planktonních buněk téhož mikroorganismu (Douglas, 2003). Jednou z důležitých fenotypových změn je zvýšení odolnosti k antimikrobiálním látkám, čímž se biofilmy stávají značně rezistentní k mnoha běžně používaným léčivům, zvláště azolům. Takto vzniklé odolnosti se říká fenomén mnohočetné lékové rezistence.

Jeden z mnoha mechanismů přispívajících ke vzniku tohoto fenoménu je nadprodukce membránových transportérů odstraňujících toxické látky ven z buňky. Přenašeče tohoto typu se řadí do skupiny nazývané transportéry mnohočetné lékové rezistence, neboli MDR transportéry (Multidrug Resistance Transporters).

Cílem této práce je shrnout zatím zjištěné poznatky o roli MDR transportérů v rezistenci kvasinkových biofilmů. Pozornost je soustředěna zejména na otázky, které ze známých MDR přenašečů odstraňují z buněk léčiva a přispívají tak k rezistenci kvasinek, v jaké fázi vývoje biofilmu je rezistence způsobena právě činností těchto transportérů a kde jsou v biofilmu transportéry lokalizované.

Studium role MDR transportérů přispívá k pochopení mechanismů způsobujících rezistenci k léčivům, tj. odolnosti, která způsobuje velké problémy při léčbě kvasinkových onemocnění. Na základě těchto znalostí mohou být vytvořeny nové terapeutické postupy pro léčbu různých kvasinkových onemocnění.

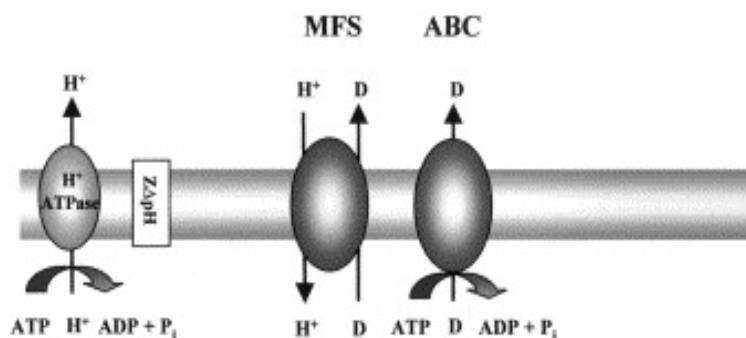
Tato práce je zaměřena převážně na transportéry kvasinky *Candida albicans*, která je velmi rozšířeným patogenem a způsobuje řadu onemocnění. Dále je pozornost věnována kvasince

Saccharomyces cerevisiae, která sice není častým patogenem (i když počet kmenů potenciálně vyvolávajících infekci se v posledních letech zvyšuje), ale je oblíbeným modelovým organismem, a proto je na ní prováděno i mnoho pokusů týkajících se této problematiky.

2 MDR proteiny

Proteiny mnohočetné lékové rezistence MDR (Multidrug Resistance proteins) jsou membránové přenašeče, které svou funkcí přispívají ke vzniku fenoménu mnohočetné lékové rezistence (MDR fenomén), který se projevuje odolností buněk k širokému spektru strukturně a funkčně nepříbuzných toxických látek a způsobuje tak velké problémy nejen ve zdravotnictví (*Sá-Correia a Tenreiro, 2002*).

MDR přenašeče patří do dvou proteinových nadrodin. První je ABC-transportní proteinová nadrodina (ATP-binding cassette) obsahující ATP-vazebnou kazetu, jejíž přenašeče jsou schopné transportovat malé molekuly i makromolekuly ven z buňky pomocí energie z hydrolýzy ATP. Druhou nadrodinou jsou MFS-transportéry (Major Facilitator Superfamily), které k odstraňování toxických látek využívají proton-motivní sílu generovanou ATPázami přítomnými na membráně a transportujícími ionty H^+ z buňky. Pumpy tedy přenášejí toxické látky ven z buňky pomocí antiportu s ionty H^+ (viz obr. 1) (*Sá-Correia a Tenreiro, 2002*).



Obr. 1: MDR transportéry: transportér závislý na proton-motivní síle z MFS nadrodiny a pumpa odstraňující z buněk toxické látky z ABC nadrodiny. Transmembránový elektrochemický protonový gradient je generován ATPázou, která přenáší H^+ a je přítomná na membráně. D – drug – toxická látka. Převzato z *Sá-Correia a Tenreiro, (2002)*.

2.1 ABC-transportní proteiny

ABC-transportní proteiny jsou velikou nadrodinou obsahující více než 3000 členů nacházejících se na všech úrovních organismů od bakterií až po člověka. Většina zástupců

této skupiny patří mezi membránové proteiny a má stejnou molekulární architekturu a doménovou organizaci. Přesto plní v buňce velmi odlišné funkce. Uplatňují se například při udržování funkčnosti mitochondrií, dozrávání cytosolických Fe/S proteinů, vylučování feromonů, biogenezi peroxisomů, stresové odpovědi, homeostázi lipidové dvojvrstvy a jako membránové přenašeče. Asi nejvýznamnější funkcí v souvislosti s patogenezi je detoxifikace buněk odstraňováním toxických látek, které jsou strukturně i funkčně zcela nepříbuzné, čímž vzniká fenomén mnohočetné lékové rezistence (*Jungwirth a Kuchler, 2006*).

ABC proteiny *Saccharomyces cerevisiae* se dělí do pěti podrodin – PDR (pleiotropic drug resistance), MRP/CFTR (multidrug resistance protein/cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), MDR (multidrug resistance), ALDp (adrenoleukodystrophy protein) a YEF3/RLI (yeast elongation factor 3/RNase-L inhibitor) podrodina (*Jungwirth a Kuchler, 2006*).

2.1.1 Struktura ABC-transportních proteinů

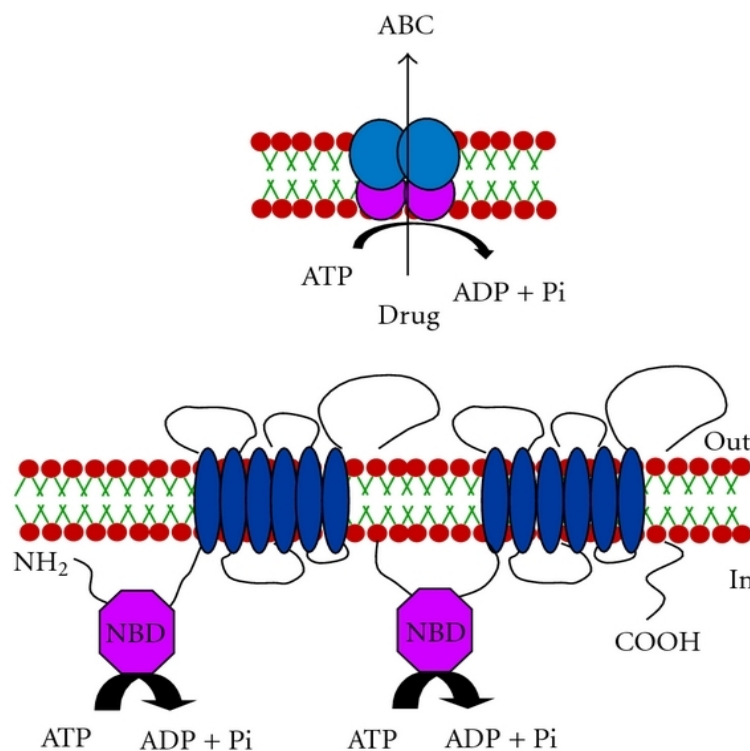
ABC proteiny jsou strukturně definované přítomností nejméně jedné nukleotid-vazebné domény (NBD – nucleotide-binding domain). Tyto domény jsou složeny z α -helixů a β -listů, které spolu tvoří Rossmanův ohyb. Nachází se zde vysoce konzervovaný ATP-vazebný motiv, který je nezbytný pro funkci proteinu, protože váže ATP, jehož hydrolyza dodává celému proteinu energii. NBDs jsou lokalizované na cytoplazmatické straně membrány. Kromě těchto domén ABC proteiny obsahují také transmembránové domény (TMDs – transmembrane domains). Jedna TMD je většinou tvořena α -helixy šesti transmembránových segmentů (TMS – transmembrane-spanning segments). Většina ABC proteinů je tvořena dvěma homologními částmi, z nichž každá je složena z jedné hydrofilní, cytoplazmatické NBD a jedné membránové TMD složeny z šesti TMS. Jejich topologie tedy je (NBD-TMD)₂ (viz obr. 2) (*Prasad et al., 2006*).

2.1.2 Mechanismus transportu toxických látek

Uvažovaný mechanismus transportu látek začíná vstupem substrátu do přenašeče na místo, které má k této látce vysokou afinitu. Poté dojde ke změně konformace přenašeče a to buď vazbou ATP anebo jeho hydrolyzou, čímž vznikne vazebná kapsa otevřená na druhou stranu membrány, která má k přenášené látce nízkou afinitu a dojde tudíž k jejímu uvolnění (příklad konformačních změn konkrétního ABC proteinu je na obr. 3). Tomuto modelu se říká

„mechanismus dvouválcového motoru“, díky koexistenci místa s malou a s velkou afinitou k substrátu v každém čase transportního cyklu a díky ATP hydrolyze na NBDs, která poskytuje energii pro vstup látky do místa s vysokou afinitou a její uvolnění na opačné straně membrány (Seeger a van Veen, 2009).

Otázkou zůstává, jak může jeden transportér přenášet tak širokou škálu strukturně a funkčně nepříbuzných substrátů. Zatím bylo zjištěno, že většina proteinů má zřejmě větší počet vazebných míst pro různé substráty. K rozeznání substrátu a k jeho přenosu přispívají jak TMDs, které se v jednotlivých proteinech poměrně dost liší, tak NBDs, které jsou naopak velmi konzervované napříč celou podrodinou (Sipos a Kuchler, 2006).

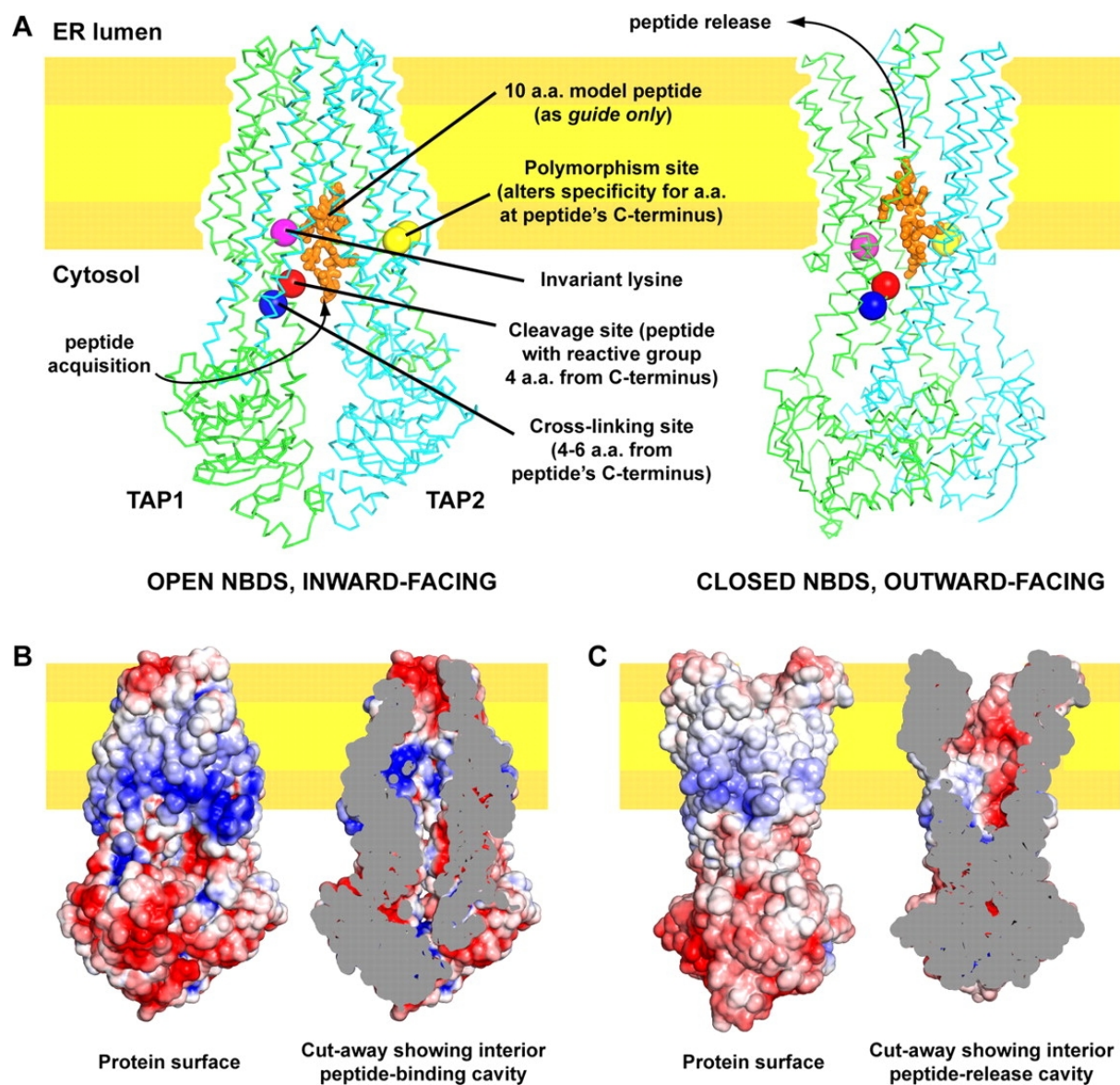


Obr. 2: Nákres ABC transportéru *Candidy*. Topologie je (NBD-TMS)₂. NBDs jsou zodpovědné za hydrolyzu ATP. Převzato z Prasad et al., (2011).

2.1.3 Zástupci ABC transportérů

Většina ABC transportérů jsou membránové proteiny. V buňkách jsou umístěny na plazmatické membráně, membráně vakuol, mitochondrií a peroxisomů. Všechny ABC přenašeče podrodiny PDR (kromě jednoho zástupce) u *S. cerevisiae* jsou umístěny na plazmatické membráně buněk, kde fungují jako první linie obrany proti toxickým látkám.

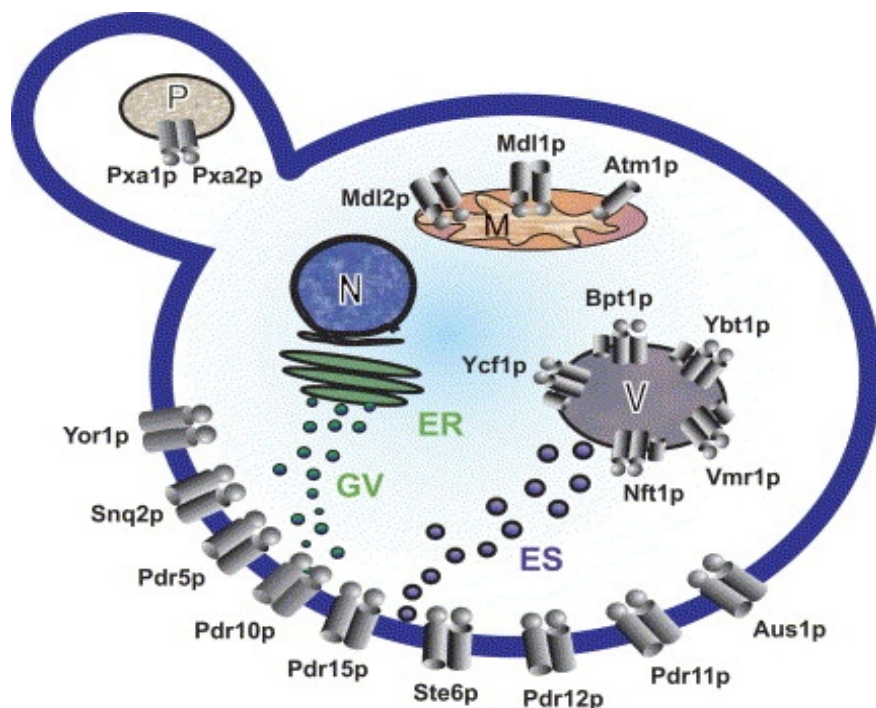
Nejprozkoumanějšími zástupci jsou Pdr5p a Snq2p, které přenášejí stovky strukturně a funkčně nepříbuzných látek a jejich nadprodukce vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence. Dalšími zástupci jsou například Pdr10p, Pdr12p, Pdr15p, Aus1p a Pdr11p (Jungwirth a Kuchler, 2006).



Obr. 3: Model ABC transportéru TAP (Transporter associated with Antigen Processing). A) Jsou označena 4 místa v blízkosti navázaného peptidu, která ho ovlivňují. B) C) Elektrostatické potenciály přenašeče jsou barevně vyznačeny: modrá – kladný, červená – záporný, bílá – nenabitý. Převzato z Procko *et al.*, (2009).

Další linie obrany u *S. cerevisiae* je uvnitř buňky na tonoplastech, kde jsou přenašeče převážně z MRP/CFTR podrodiny, které rovněž přispívají k detoxifikaci buněk přenosem toxických látek do vakuol. Je to například Ycf1p, který přenáší těžké kovy, konjugáty glutathion-S, volný glutathion a červený pigment. Jeho homologem je Bpt1p. Na vnitřní mitochondriální membráně jsou umístěny tři ABC proteiny – Atm1p, Mdl1p a Mdl2p. Atm1p exportuje Fe/S klastry z mitochondrií do cytosolu. Mdl1p zase přenáší do cytosolu mitochondriální peptidy a možná hraje roli také v regulaci odolnosti k oxidativnímu stresu. Funkce třetího proteinu není zatím známa. Na membránách peroxisomů se v *S. cerevisiae* nachází dva proteiny z ALDp podrodiny Pxa1p a Pxa2p, zajišťující import mastných kyselin s dlouhými řetězci pro β -oxidaci. Je možné, že fungují také jako acyl-CoA flipázy (Jungwirth a Kuchler, 2006).

Tabulka 1 shrnuje hlavní zástupce ABC proteinů v kvasince *S. cerevisiae* a na obrázku 4 je znázorněna jejich lokalizace v buňce.



Obr. 4: Membránová lokalizace ABC proteinů *S. cerevisiae*. Kresba znázorňuje umístění některých prozkoumaných přenašečů na buněčném povrchu, vakuole (V), mitochondrii (M) a peroxisomu (P). N – jádro, ER – endoplazmatické retikulum, GV – Golgiho vřetky, ES – endosomy. Převzato z Jungwirth a Kuchler, (2006)

ABC proteiny	Rodina	Délka	Topologie	Funkce	Substráty
<i>Plasmatická membrána</i>					
Pdr5p	PDR	1511	(NBD-TMS ₆) ₂	PDR, transport lipidů	Cykloheximid, azoly, mykotoxin
Snq2p	PDR	1501	(NBD-TMS ₆) ₂	PDR	Toxické látky, mutageny
Pdr12p	PDR	1511	(NBD-TMS ₆) ₂	Stresová odpověď na slabé kyseliny	Slabé organické kyseliny
Pdr15p	PDR	1529	(NBD-TMS ₆) ₂	Obecná stresová odpověď	Toxické látky, herbicidy, 2,4-DCP
Aus1p	PDR	1394	(NBD-TMS ₆) ₂	Příjem sterolů	Steroly
Pdr11p	PDR	1411	(NBD-TMS ₆) ₂	Příjem sterolů	Steroly
Yor1p	MRP/CFTR	1477	NTE(TMS ₆ -NDB) ₂	PDR, transport lipidů	Oligomycin, fosfolipidy
Ste6p	MDR	1290	(TMS ₆ -NDB) ₂	Transport párovacích faktorů	a-faktor feromon
<i>Vakuola</i>					
Ycf1p	MRP/CFTR	1515	NTE(TMS ₆ -R-NDB) ₂	Detoxifikace buňky	GS-konjugáty, těžké kovy
Bpt1p	MRP/CFTR	1559	NTE(TMS ₆ -NDB) ₂	Detoxifikace buňky	Nekonj. bilirubin, kadmium, arsenáty
Ybt1p	MRP/CFTR	1661	NTE(TMS ₆ -NDB) ₂	neznámé	Žlučové kyseliny, taurocholát
<i>Mitochondrie</i>					
Atm1p	MDR	694	TMS ₆ -NDB	Přenos Fe(S)	Fe(S)-proteiny
Mdl1p	MDR	696	TMS ₆ -NDB	Odpověď na oxidativní stres	Peptidy
Mdl2p	MDR	820	TMS ₆ -NDB	neznámé	neznámé
<i>Peroxisomy</i>					
Pxa1p	ALDp	870	TMS ₆ -NDB	Transport mastných kyselin	LCFA
Pxa2p	ALDp	853	TMS ₆ -NDB	Transport mastných kyselin	LCFA

Tab.1: ABC proteiny kvasinky *S. cerevisiae*. NTE (N-terminal extension) prodloužení na N-konci; LCFA (long chain fatty acid) mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Převzato z *Jungwirth a Kuchler, (2006)*.

Pro klinickou praxi jsou významnější MDR transportéry kvasinek *Candida*, které přispívají k odolnosti buněk proti širokému spektru toxických látek a tím způsobují značný problém při léčbě kandidóz a jiných onemocnění, které tyto kvasinky způsobují. Nejrozšířenější a tudíž nejlépe prozkoumanou kvasinkou je *Candida albicans*. Hlavní ABC přenašeč, který přispívá k její rezistenci, je CaCdr1p lokalizovaný na plasmatické membráně. Nadprodukce tohoto proteinu vede k rezistenci buněk proti azolům – flukonazolu, mikonazolu, ketokonazolu a itrakonazolu. Dále zvyšuje odolnost k brefendinu A, ceruleninu, nigericinu a mnoha dalším

látkám (Niimi *et al.*, 2004). Další významní zástupci ABC transportérů kvasinek *Candida* jsou shrnuty v tabulce 2.

ABC transportéry		
Organismus	Název genu	Funkce/substrát
<i>Candida albicans</i>	<i>CaCDR1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky, přenašeč fosfolipidů
	<i>CaCDR2</i>	Pumpa vyhazující toxické látky, přenašeč fosfolipidů
	<i>CaCDR3</i>	Přenašeč fosfolipidů
	<i>CaCDR4</i>	Přenašeč fosfolipidů ?
	<i>CaCDR5</i>	Pumpa vyhazující toxické látky ?
	<i>HST6</i>	Transport a-faktoru, toxických látek ?
	<i>CaYOR1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky ?
<i>Candida glabrata</i>	<i>CaYCF1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky ?
	<i>CgCDR1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky
	<i>CgCDR2</i>	Pumpa vyhazující toxické látky
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>PDH1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky
	<i>CdCDR1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky ?
	<i>CdCDR2</i>	Pumpa vyhazující toxické látky ?
<i>Candida krusii</i>	<i>ABC1</i>	Pumpa vyhazující toxické látky
	<i>ABC2</i>	Pumpa vyhazující toxické látky
MFS transportéry		
<i>Candida albicans</i>	<i>CaMDR1/BEN</i>	Benomyl, metotrexát, sulfometuron metyl, NQO a flukonazol
	<i>FLU1</i>	Mykofenolová kyselina
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>CdMDR1</i>	Flukonazol, amorolfín, brefendin A, cerulenin, cykloheximid, flufenazin a NQO

Tab. 2: Pumpy odstraňující toxické látky z buněk kvasinek rodu *Candida*. NQO – nitroquinolin oxid. Převzato z Prasad *et al.*, (2006).

2.2 MFS-transportní proteiny

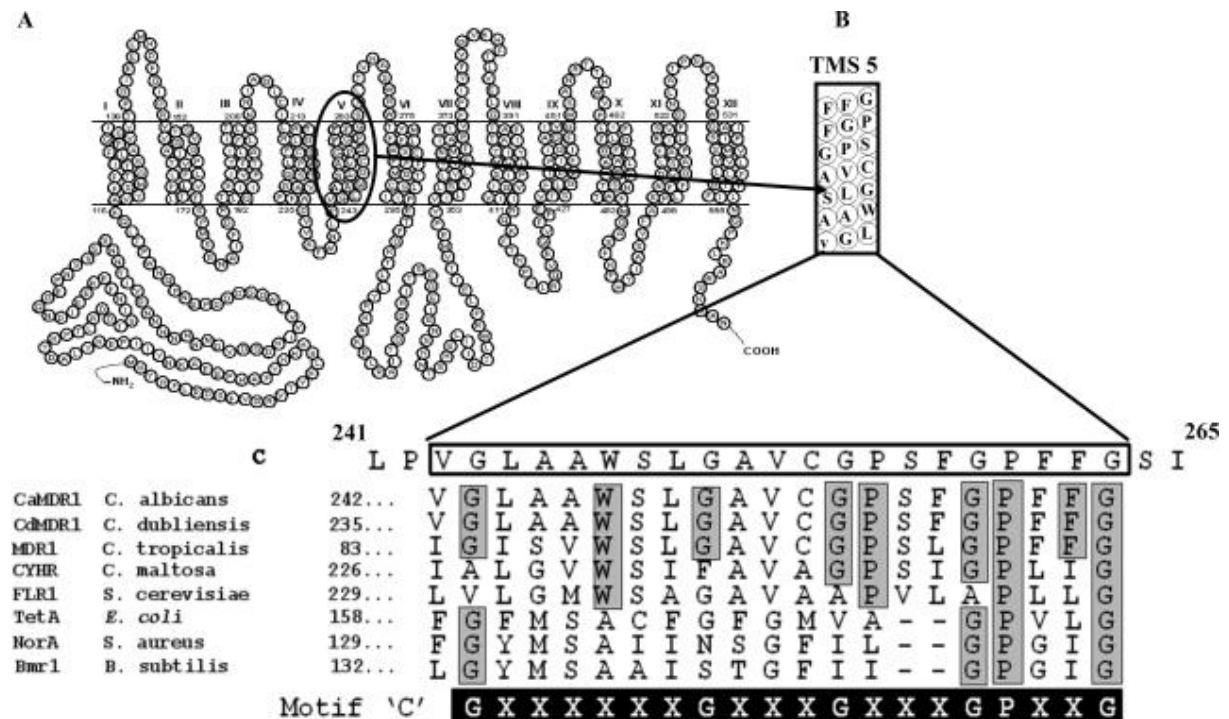
MFS přenašeče jsou největší známou nadrodinou sekundárních přenašečů a jsou přítomné prakticky ve všech známých kmenech organismů od bakterií a archeí až po vyšší eukaryota. V současnosti se dělí na 74 rodin, z nichž každá přenáší určitý typ substrátu, například monosacharidy, oligosacharidy, aminokyseliny, peptidy, vitamíny, kofaktory enzymů, nukleosidy, baze, anionty, kationty a pro tuto práci podstatné toxické látky. Některé rodiny zatím nejsou funkčně charakterizované (Reddy *et al.*, 2012).

Různé přenašeče transportují substrát uniportem, symportem nebo antiportem (Reddy *et*

al., 2012). Velká část MFS proteinů získává energii k tomuto přenosu ve formě elektrochemické proton-motivní síly, která se skládá z elektrického potenciálu a chemického protonového gradientu (Sá-Correia et al., 2009).

2.2.1 Struktura MFS-transportních proteinů

Velká část MFS proteinů se skládá z 12 nebo 14 transmembránových segmentů (TMS), tvořených α -helixy. TMSs jsou rozdělené do dvou skupin po šesti nebo sedmi a jsou oddělené velkou cytoplazmatickou smyčkou. Podle počtu TMSs se dělí do dvou rodin – rodina DHA1 (drug:H⁺ antiporter - toxická látka:H⁺ antiporter) s 12 TMSs a DHA2 se 14 předikovanými segmenty (Sá-Correia et al., 2009).



Obr. 5: A) Předpovězená topologie CaMdr1p s 12 TMSs. TMS 5 je zakroužkovaný. B) Předpokládaný TMS 5 je zvětšený, aby byly vidět aminokyseliny. C) Porovnání sekvence TMS 5 z *CaMDR1 C. albicans* s jinými houbovými a bakteriálními transportéry s konzervovaným antiporterovým motivem. Ukázána je sekvence mezi 243 a 263 aminokyselinou. Pro porovnání je napsán motiv „C“. X značí jakoukoli aminokyselinu. Převzato z Pasrija et al., (2007).

Nejvýznamnějším MFS transportérem, podílejícím se na vzniku mnohočetné lékové rezistence, je CaMdr1p. Tento přenašeč patří do DHA1 skupiny. Je to antiporter s typickým antiporterovým motivem $[G(X_6)G(X_3)GP(X_2)GP(X_2)G]$ v TMS 5, kde G znamená glycin, P

prolin a X jakoukoli aminokyselinu. Tento motiv je pro správnou funkci proteinu zcela nezbytný (viz obr. 5) (*Pasria et al., 2007*).

2.2.2 Mechanismus transportu toxických látek

Kvůli velké různorodosti aminokyselinových sekvencí jednotlivých proteinů této velké nadrodiny nejsou zatím prozkoumány jejich strukturně-funkční vztahy a neexistuje proto obecný model transportu látek. Nicméně N-terminální části přenašečů jsou více homologní než C-terminální, lze se proto domnívat, že C-konce proteinů slouží k rozeznání substrátu, kdežto N-konce k přenosu protonů (*Prasad et al., 2006*).

Mechanismus transportu nejvýznamnějšího MFS proteinu CaMdr1p je antiport toxické látky směrem ven s H^+ směrem dovnitř. Přenos látek je citlivý na pH, což potvrzuje, že pro transport je využíván elektrochemický gradient protonů. Jsou známy některé aminokyseliny nezbytné pro funkci tohoto proteinu (lokalizované zvláště v TMS 5), nicméně přesný mechanismus transportu zatím znám není (*Pasrija et al., 2007*).

2.2.3 Zástupci MFS transportérů

Většina MFS transportérů se nachází pravděpodobně na plazmatické membráně buněk. U kvasinky *S. cerevisiae* to jsou například Flr1p, způsobující rezistenci k flukonazolu, 4-NQO, cykloheximidu, ceruleninu a mnoha dalším. Dále Azr1p, jehož substráty jsou azoly a kyselina octová. Qdr1p přenašeč je pojmenovaný podle způsobované rezistence ke quanidinu, jeho substrátem je ale také ketokonazol. Aqr1p způsobuje rezistenci ke ketokonazolu (*Sá-Correia a Tenreiro, 2002*).

Uvnitř buňky *S. cerevisiae* se na membránách vakuol nacházejí produkty genů *TPO1*, *TPO2*, *TPO3* a *TPO4*, kódující transportéry polyaminů. *TPO1* a *TPO4* způsobují také rezistenci k cykloheximidu a quinidinu (*Sá-Correia a Tenreiro, 2002*).

Nejvýznamnějším přenašečem u kvasinky *Candida albicans* je *CaMDR1* (Candida Multidrug Resistance 1), lokalizovaný na plazmatické membráně. Nadprodukce tohoto proteinu vede k rezistenci buněk k azolům (např. flukonazolu), cykloheximidu, ceruleninu, methotrexátu, 4-NQO a dalším toxickým látkám (*Pasrija et al., 2007*). Dalším důležitým transportérem je Flu1p způsobující rezistenci k flukonazolu, cykloheximidu a mykofenolové kyselině (*Calabrese et al., 2000*) (viz tabulka 2).

3 Biofilm

V přírodním prostředí existují mikroorganismy převážně ve formě biofilmů. Jako planktonní nebo volně plovoucí buňky se vyskytují velmi zřídka. Biofilmy jsou přisedlá mikrobiální společenstva, jejichž buňky jsou nevratně připevněny k povrchu nebo přichycené k okolním buňkám a jsou obalené do matrix extracelulárních polymerů, které samy vyprodukovaly. Buňky v biofilmu projevují odlišný fenotyp než individuální buňky, pokud jde o růstovou rychlost a transkripci genů (*Donlan a Costerton, 2002*). Podstatné je, že jsou značně méně citlivé k antimikrobiálním látkám (*Douglas, 2003*).

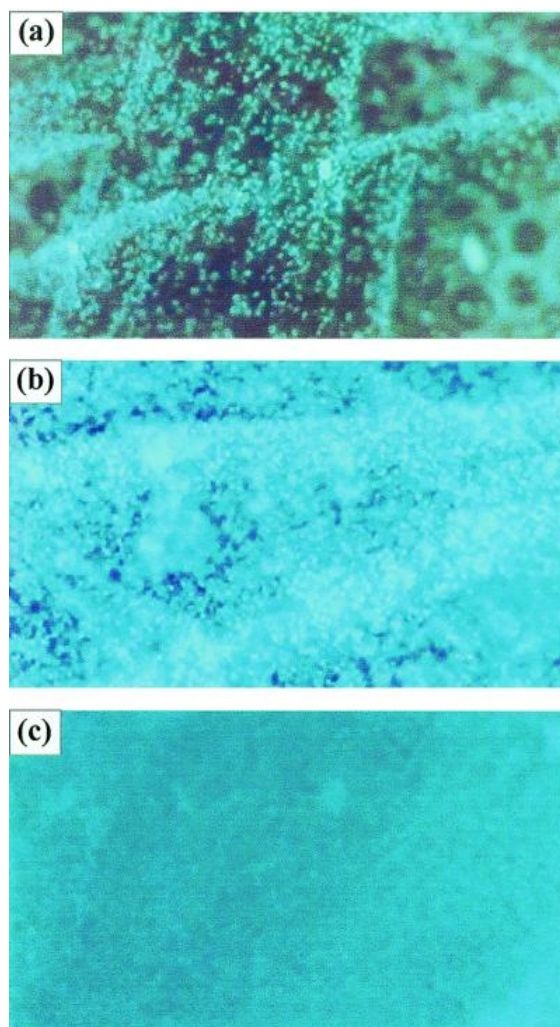
3.1 Vznik biofilmu

Biofilm kvasinky *C. albicans* prochází během svého vývoje třemi fázemi - časnou (0. až 11. hodina), střední (12. až 30. hodina) a maturační (38. až 72. hodina) fází. Vývoj začíná přichycením individuálních buněk na povrch substrátu. Mezi třetí a čtvrtou hodinou se začínají objevovat první mikrokolonie a metabolická aktivita buněk značně stoupá. Začátek střední vývojové fáze je charakterizován produkcí extracelulární matrix tvořené převážně polysacharidy podobnými těm z buněčné stěny. Ve fluorescenčním mikroskopu se jeví jako mlhavý film pokrývající mikrokolonie. Během maturační fáze extracelulární materiál stále přibývá, až je celá kolonie dokonale pokryta. Biofilm je pak tvořen buňkami kvasinkové, hyfální i pseudohyfální formy a extracelulárním materiálem (viz obr. 6) (*Chandra et al., 2001*).

Fyzický kontakt buňky s podkladem iniciuje změny vedoucí k vývoji biofilmu zřejmě aktivací MAP kinázy Mkc1. Potvrzuje to akumulace aktivní formy této kinázy v buňkách, které rostou na podkladu. *mkc1Δ* mutant projevuje defekt v dvou na kontaktu závislých odpovědích – invazivním hyfálním růstu a tvorbě biofilmu. (*Kumamoto, 2005*). Mkc1 kináza je součástí dráhy integrity buněčné stěny (*Navarro-García et al., 1995*), která detekuje kontakt buňky s podkladem či s jinou buňkou, a to zřejmě vnímáním mechanického narušení buněčné stěny a plazmatické membrány (*Kumamoto, 2005*).

Jakmile buňka rozezná kontakt s pevným povrchem, je nutné, aby se na něj přichytila. Adheziny, které poutají bazální vrstvu buněk biofilmu k podkladu, nejsou známy. Ví se však, že tato adherence je negativně regulována proteinem buněčné stěny Ywp1p. Tento protein je k buněčné stěně vázán GPI kotvou a jeho struktura je velmi podobná strukturám známých adhezínů (*Granger et al., 2005*). Zdá se tedy, že by k inhibici adheze mohlo docházet vazbou

Ywp1 na ligandy adhezínů na téže buňce (Nobile a Mitchell, 2006).



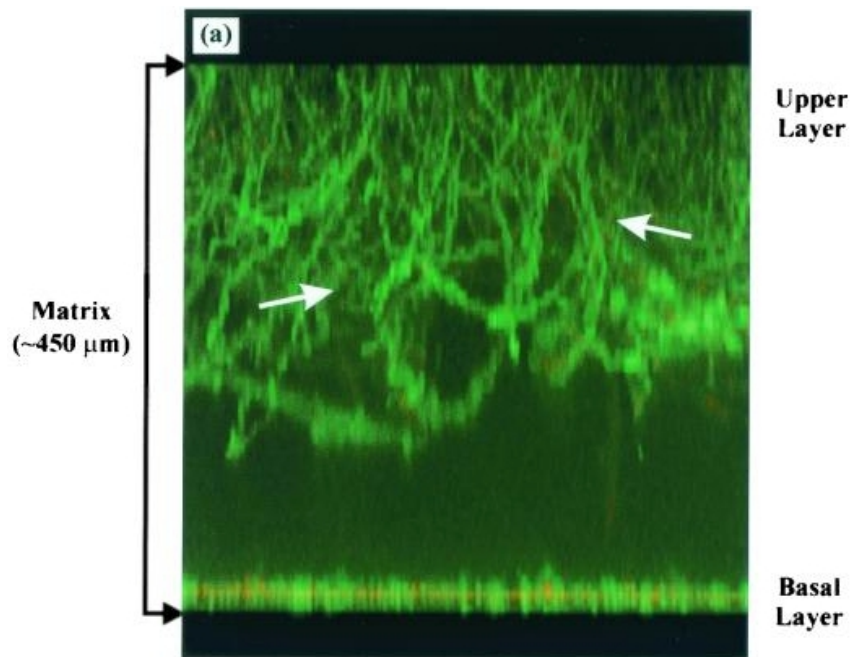
Obr. 6: Obrázky z fluorescenčního mikroskopu ukazující tři fáze vývoje biofilmu na polymethylmetakrylových prouzcích. (a) časná, (b) střední a (c) maturační fáze. Zvětšení, x10. Převzato z Chandra et al., (2001).

Většinu ostatních mezibuněčných kontaktů i kontaktů buněk se substrátem zajišťují adheziny z genové rodiny ALS (agglutinin-like sequence). Jsou to proteiny vázané glykosyl fosfatidylinositolovou kotvou (GPI kotva) k buněčné stěně. Als3p je povrchový glykoprotein, jehož gen je upregulován během hyfální morfogeneze (Hoyer et al., 1998). Další adhezin nacházející se specificky na povrchu hyf je Hwp1p, jehož exprese je rovněž indukována během hyfální morfogeneze (Staab et al., 1996). V průběhu formování biofilmu *in vitro* je zvýšena také exprese *ALS1* a dalších genů z této rodiny (Chandra et al., 2001; García-Sánchez et al., 2004). Také Eap1p hraje roli v adhezi a je nezbytný pro tvorbu biofilmu *in vivo*, kdy je jeho exprese minimálně dvojnásobná oproti planktonním buňkám (Li et al.,

2007). Několik dalších adhezínů bylo identifikováno mezi geny, jejichž exprese je řízena transkripčním faktorem Bcr1. Jsou to například produkty genů *HYR1*, *RBT5* a *CHT2* (Nobile a Mitchell, 2005).

3.2 Architektura biofilmu

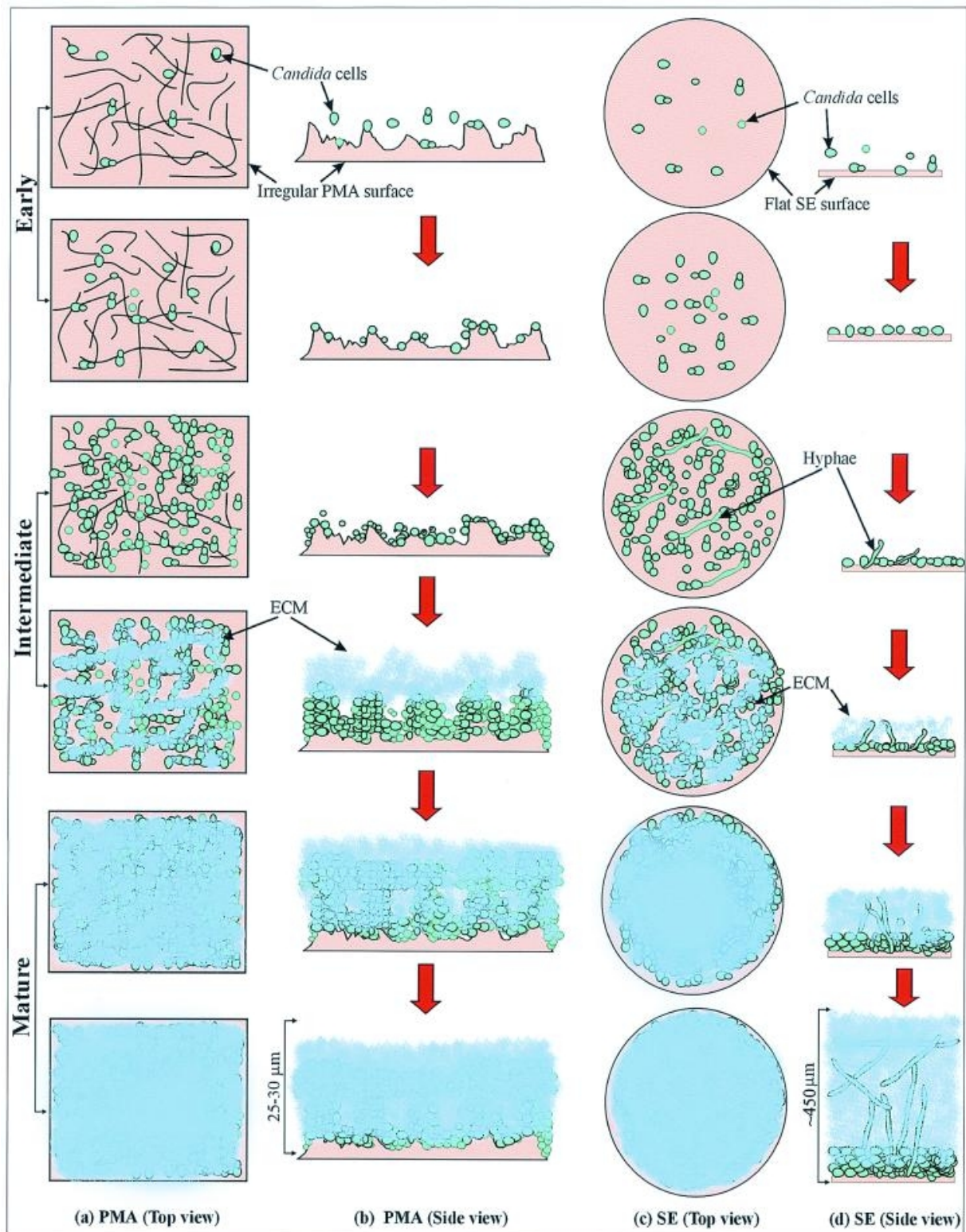
Maturovaný biofilm má poměrně heterogenní strukturu. Je zde úzká oblast obsahující metabolicky aktivní buňky a silná vrstva extracelulárního materiálu. Tvorba a architektura biofilmu se na hladkém a na nerovném povrchu poněkud liší. Na hladkém silikonovém elastomeru je biofilm tvořen dvěma strukturami. Spodní uniformní vrstva je tvořena blastosporami a v maturační fázi dosahuje tloušťky 10 až 12 μm . Nazývá se bazální vrstva a váže celý biofilm k podkladu. Nad touto vrstvou je asi 450 μm silný matrix tvořený extracelulárním materiálem a hyfální složkou (viz obr. 7 a 8) (Chandra *et al.*, 2001).



Obr. 7: Obrázek 3-D rekonstruovaný z obrázků z konfokálního skenovacího laserového mikroskopu. Maturovaný biofilm *C. albicans* na silikonovém elastomeru. Je zde vidět bazální vrstva z blastospor a horní vrstva obsahující hyfální složku. Extracelulární matrix je barven ConA vázajícím se na polysacharidy, proto se jeví zeleně. Zvětšení, x20. Převzato z Chandra *et al.*, (2001).

Naproti tomu na nepravidelném podkladu polymethylmetakrylátu buňky nejdříve obalují povrchové nerovnosti, proto je bazální vrstva nerovnoměrně zvrásněná. Na ní pak přirůstají další vrstvy z buněk kvasinkového typu. Celá struktura je zanořena v extracelulárním

materiálu. Celková výška biofilmu je ale mnohem nižší než u předchozího typu, má pouze 25 až 30 μm . (viz obr. 8) (Chandra et al., 2001).



Obr. 8: Schématické znázornění vývoje biofilmu. Růst na PMA – polymethylmetakrylát a SE – silikonový elastomer. a) a c) ukazuje pohled shora, b) a d) pohled ze strany. ECM – extracelulární matrix. Převzato z Chandra et al., (2001).

Při analýze složení extracelulární matrix byly zatím identifikovány sacharidy, proteiny, hexosaminy, kyselina fosforečná a močová. Hlavní komponentou jsou sacharidy tvořící téměř 40 %, z toho 32 % připadá na glukosu, zbytek manose, galaktose a dalším minimálně dvěma neidentifikovaným cukrům. Dále je zde 5 % proteinů a asi 3 % hexosaminů (*Al-Fattani a Douglas, 2006*). Stále však zbývá asi polovina suché váhy biofilmu, jejíž složení se zatím nepodařilo objasnit.

3.3 Mezibuněčná signalizace

Jedním z komunikačních mechanismů mikroorganismů je quorum sensing, založený na sledování hustoty populace a na signalizačních molekulách. Těmito molekulami v kvasinkových biofilmech jsou farnesol a tyrosol. Farnesol je difuzibilní lipofilní molekula málo rozpustná ve vodě. Je produkována kontinuálně během růstu v množství zhruba odpovídajícím buněčné masě. Ve vyšší koncentraci inhibuje konverzi kvasinkového růstu na mycelární (hyfální) růst. Je také schopen změnit morfolologii buněk *C. albicans* z mycelia na aktivně pučící kvasinky (*Hornby et al., 2001*). To může být jedna ze strategií úniku z příliš početné populace. Buňka přejde na kvasinkovou formu a odpojí se od podkladu. Ve vysokých koncentracích dokáže farnesol dokonce zcela inhibovat vývoj biofilmu (*Ramage et al., 2002*). Tato jeho vlastnost by možná mohla být využitelná při léčbě kvasinkových infekcí (*Ramage et al., 2002b*).

Druhou signální molekulou je aromatický alkohol tyrosol. Tato molekula na rozdíl od farnesolu stimuluje hyfální růst během časně a střední fáze vývoje biofilmu. Pokud necháme biofilm růst v přítomnosti farnesolu i tyrosolu, bude po 48 hodinách obsahovat téměř výhradně kvasinkovou formu buněk, z čehož vyplývá, že farnesol hraje dominantní roli (*Chen et al., 2004; Alem et al., 2006*).

Ke komunikaci mezi buňkami slouží také párovací faktory, feromony. Buňky *C. albicans* existují ve dvou různých fenotypech – „white“ a „opaque“. „Opaque“ buňky se mohou párovat a produkují feromony. „White“ buňky naopak nejsou kompetentní k párování a feromony neprodukují (*Miller a Johnson, 2002*). Přesto mají na svém povrchu feromonové receptory. Ty se uplatňují v populaci, kde je málo „opaque“ buněk oproti „white“ typu. „Opaque“ buňky skrze produkci feromonů přimějí „white“ buňky, které feromony vnímají pomocí receptorů, aby se staly kohezivní a vytvořily biofilm, který následně slouží jako ochranné prostředí pro „opaque“ buňky k jejich chemotropismu během párovacího procesu

(Daniels et al., 2006).

Dalšími objevenými malými signálními molekulami přítomnými v supernatantu biofilmu jsou dodecanol, nerolidol, isoamyl alkohol a fenylethanol. Každá z těchto látek je schopna inhibovat hyfální růst a mohla by napomáhat k šíření biofilmu podporou tvorby kvasinkové formy buněk (Martins et al., 2007).

3.4 Mechanismy rezistence biofilmů vyjma MDR transportérů

Biofilmy *C. albicans* jsou mnohem více rezistentní k antimikrobiálním látkám oproti planktonním buňkám (Hawser a Douglas, 1995). Tato rezistence je způsobena mnoha různými mechanismy, jejichž význam se mění v průběhu vývoje biofilmu. Jedním z nich by mohla být produkce extracelulární matrix. V několika nezávislých výzkumech byla potvrzena souvislost mezi množstvím matrix a rezistencí. Například Al-Fattani a Douglas (Al-Fattani a Douglas, 2006) nechali růst biofilm *C. albicans* v proudícím médiu, ve kterém došlo k větší produkci matrix v porovnání s biofilmy ve statických podmínkách. Biofilmy z proudícího média pak byly výrazně odolnější k amphotericinu B oproti biofilmům ze statických podmínek. Na druhou stranu ale existuje mnohem více prací, které tuto souvislost popírají. Když například zkoumali rozdíl rezistencí k amphotericinu B, flucytosinu a flukonazolu biofilmů rostoucích staticky a rostoucích za jemného třesení (které produkují více matrix), neobjevili žádný výrazný rozdíl (Baillie a Douglas, 2000). Rovněž testy rezistence k azolům buněk resuspendovaných z biofilmu na volně plovoucí buňky (tzn. bez matrix) ukázaly, že i tyto buňky zůstávají velmi rezistentní (Ramage et al., 2001).

Jiné, novější práce ale ukazují, že mezibuněčná hmota by mohla poněkud brzdit pronikání toxických látek do biofilmů a kolonií (Váchová et al., 2011). Zdá se, že svou roli v rezistenci hraje také přítomnost a umístění β -1,3-glukanu v extracelulární matrix. Narušení genu glukan syntázy *FKSI* vede ke snížení odolnosti biofilmu k amphotericinu B, anidulafunginu a flucytosinu. Naopak při zvýšené expresi tohoto genu rezistence biofilmu k triazolům roste (Nett et al., 2010). Mezibuněčná hmota tedy zřejmě hraje v rezistenci biofilmů svou úlohu.

Hlavním regulátorem rezistence k azolům v maturovaném biofilmu je zřejmě MAP kináza Mkc1. Biofilmy tvořené buňkami s *mkc1* Δ mutací jsou velmi citlivé k flukonazolu, a to asi 130-krát více než rodičovské biofilmy. Tato mutace ale nijak zásadně neovlivňuje odolnost planktonních buněk k flukonazolu. (Kumamoto a Vines, 2005).

Heterogenita populace buněk v biofilmu *C. albicans* může také přispívat k jejich rezistenci.

V časně fázi vývoje biofilmu je výrazný rozdíl v odolnosti jednotlivých subpopulací buněk k chlorhexidin diglukonátu. Zatímco hyfy a pseudohyfy jsou poměrně citlivé, buňky kvasinkového typu této látky snadno odolávají (*Suci a Tyler, 2002*). V mladé kolonii *Saccharomyces cerevisiae* zase vstupuje vrchní vrstva buněk do stacionární fáze, čímž se stává odolnější k toxickým látkám a chrání tak buňky uvnitř kolonie, které zůstávají metabolicky aktivní a množí se (*Váchová et al., 2011*).

V maturovaném biofilmu existuje subpopulace buněk zvaná „persister cells“. Tyto trvalé buňky se neliší od ostatních buněk genotypově, nýbrž fenotypově výrazně větší odolností k toxickým látkám. Existují pouze v rámci biofilmu a jejich diferenciaci je vyvolána přisednutím buněk na podklad. Přítomnost těchto buněk vysvětluje dvoufázový smrtící model biofilmů antimikrobiálními látkami (*LaFleur et al., 2006*).

V *in vivo* systémech se často setkáváme s polymikrobiálními biofilmy, tvořenými buňkami *Candida* a bakterií. Při studiu biofilmů *C. albicans* a *Staphylococcus epidermalis* bylo nalezeno mnoho fyzických interakcí mezi buňkami těchto dvou organismů. Testy rezistence těchto smíšených biofilmů ukázaly, že kvasinkové buňky jsou schopny měnit aktivitu antibiotik a podobně bakterie mohou ovlivnit aktivitu antifungálních léčiv, což oboje vede ke zvýšení rezistence polymikrobiálních biofilmů (*Adam et al., 2002*). Z toho je patrné, že mechanismy rezistence k léčivům *in vivo* v klinické praxi jsou zřejmě mnohem komplikovanější než by se mohlo zdát z *in vitro* výzkumů (*Blankenship a Mitchell, 2006*).

3.5 Role biofilmů v pathogenezi

Pathogenní kvasinky z rodu *Candida* mohou způsobovat povrchová i vážná systémová onemocnění a jsou pokládány za hlavní příčinu nozokomiálních infekcí. Jsou oportunními patogeny, napadajícími imunosuprimované nebo jinak oslabené pacienty. Ve většině těchto infekcí jsou přítomny ve formě biofilmů (*Douglas, 2003*). Schopnost vytvářet biofilmy je tedy spojena s pathogenicitou a je považována za důležitý faktor virulence při kandidózách. Biofilm poskytuje buňkám ochranu od okolního prostředí, dostupnost živin, metabolickou kooperaci, možnost zisku nových genetických znaků a hlavně velkou odolnost k antimikrobiálním látkám (*Mohandas a Ballan, 2011*). Biofilmy lze často nalézt na implantátech, například na centrálních žilních katetrech, kontaktních čočkách, kardiostimulátorech, mechanických srdečních chlopních, močových katetrech a kloubních a hlasivkových protézách (*Donlan, 2001*).

Dalšími faktory virulence, které *Candidy* uschopňují ke kolonizaci, invazi a pathogenezi jsou produkce fosfolipáz a kyselých proteináz. Proteinázy zřejmě usnadňují kolonizaci a pronikání do hostitelské tkáně a únik imunitnímu systému. Pro invazi do hostitelských buněk je nutná penetrace a narušení jejich vnějšího obalu. K tomu slouží fosfolipázy, které poškozují jejich cytoplazmatické membrány. (Mohandas a Ballan, 2011).

4 Role MDR transportérů v rezistenci biofilmů a kolonií

MDR transportéry, podílející se na vzniku mnohočetné lékové rezistence, hrají důležitou roli v rezistenci biofilmů a kolonií k toxickým látkám. Význam jejich role se ale v průběhu vývoje biofilmu značně mění.

4.1 MDR transportéry ovlivňující rezistenci biofilmů a kolonií

Rezistence biofilmů k toxickým látkám zprostředkovaná MDR transportéry je indukována kontaktem buněk *Candida albicans* s podkladem. Tento impuls vyvolá zvýšení transkripce mnoha různých genů, z těch kódujících MDR transportéry jsou to převážně *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* geny. Jejich zvýšená exprese a s tím spojená rezistence buněk se objevují už po dvou hodinách od adheze, tedy v době, kdy ještě není vytvořen strukturovaný biofilm ani mezibuněčná hmota (Mateus et al., 2004). Buňky tohoto časného biofilmu se tudíž liší od planktonních buněk pouze změnou expresí genů a zvýšení jejich rezistence je způsobeno pouze přítomností produktů těchto genů. Proto lze pokusy, které zkoumají funkce MDR pump v buňkách pomocí nadprodukce těchto proteinů, vztáhnout také na buňky časného biofilmu. Studium rezistence *C. albicans* je prováděno také na klinických izolátech, které často tvoří v napadeném organismu biofilmy. Vyznačují se rovněž zvýšenou expresí MDR pump, můžeme proto také výsledky těchto studií s určitou rezervou aplikovat na chování MDR pump v časných biofilmech. Ve vyzrálých biofilmech již MDR pumpy nehrají v rezistenci významnou roli, což je podrobně diskutováno v další kapitole.

4.1.1 MDR transportéry Cdr1p a Cdr2p kvasinky *C. albicans*

Nejvýznamnějšími MDR transportéry, které způsobují mnohočetnou lékovou rezistenci u kvasinky *Candida albicans*, jsou produkty *CDR1* a *CDR2* genů. Většina klinických izolátů, vykazujících rezistenci k azolům, má zvýšenou transkripci těchto genů (Holmes et al., 2008).

Gen *CDR1* kóduje membránovou pumpu, která patří do ABC proteinové nadrodiny. Gen

CDR1 je schopen funkčně komplementovat funkci transportéru Pdr5p u nulového mutanta *pdr5Δ Saccharomyces cerevisiae*. *pdr5Δ* mutant měl zvýšenou citlivost k cykloheximidu a chloramfenikolu. Po vložení *CDR1* genu se kvasinka stala velmi rezistentní k cykloheximidu a chloramfenikolu, ale také k mikonazolu. Naopak se u nově vzniklého kmene překvapivě zvýšila citlivost k oligomycinu, nystatinu a 2,4 - dinitrofenolu (Prasad *et al.*, 1995).

Nadprodukce Cdr1p zvyšuje odolnost buněk také k azolům, a to flukonazolu, ketokonazolu a itrakonazolu. Pokud byl gen *CDR1* vnesen do genomu *Saccharomyces cerevisiae* do kmene s deletovanými geny pro sedm hlavních ABC transporterů, a to pod kontrolu promotoru genu *PDR5*, byl vzniklý kmen k azolům velmi rezistentní. Naopak kmen bez vloženého genu *CDR1* byl k těmto látkám velmi citlivý (Nakamura *et al.*, 2001).

Studium některých klinických izolátů *C. albicans* naznačuje, že Cdr1p je hlavním transportérem zodpovědným za rezistenci buněk k azolům, kdežto transportér Cdr2p hraje pouze vedlejší roli v rezistenci k těmto látkám. Kmen 5674 je rezistentní k mnoha azolovým derivátům díky silné, mutací způsobené hyperaktivaci transkripčního faktoru Tac1, ovlivňujícího expresi *CDR1* a *CDR2* genů. Delece genu *CDR1* v tomto kmeni má za následek významné snížení rezistence k flukonazolu, ketokonazolu a itrakonazolu a to 6-, 4- a 8-krát. Naopak delece genu *CDR2* má mnohem menší efekt. Rezistence k flukonazolu a ketokonazolu se sníží jen 1,5-krát, rezistence k itrakonazolu se nezmění vůbec (Tsao *et al.*, 2009).

Tento předpoklad potvrzují také výsledky dalších autorů. Buňky kmene s delecí genu *CDR2* adherované k povrchu, tedy ve fázi časného biofilmu, nemají nijak změněnou schopnost bránit se vystavení flukonazolu. Naopak adherované buňky kmenů s delecí *MDR1* nebo *CDR1* jsou k flukonazolu mnohem více citlivé. Funkční *CDR2* gen tedy přispívá k rezistenci mnohem méně než *CDR1* a *MDR1* geny (Mateus *et al.*, 2004).

Některé pokusy ale přesto ukazují, že *CDR2* hraje v rezistenci k azolům důležitou roli. Při analýze kmenů *C. albicans* z klinických izolátů (orofaryngeální kandidózy), citlivých k azolům, nebyla detekována metodou Northern blot žádná mRNA *CDR2*. Pokud ale byl zkoumán kmen z izolátů rezistentní k azolům (ketokonazol, itrakonazol, nokodazol, flukonazol...), byla zjištěna zvýšená hladina mRNA nejen genu *CDR1*, ale také *CDR2*. Zvýšená exprese genu *CDR2* byla pozorována také u kmenů původně citlivých k flukonazolu díky delecí genu *CDR1*, u kterých došlo ke spontánní reverzi vnímavosti k azolům na úroveň

divokých kmenů. Další dílčí pokus ukázal, že delece genu *CDR1* vede k vysoké citlivosti k azolům. Pokud je deletován i gen *CDR2*, tato citlivost se ještě dále zvýší (*Sanglard et al., 1997*).

Z těchto výsledků lze dojít k závěru, že Cdr1p pumpa hraje hlavní roli v rezistenci časných kolonií k flukonazolu. Vedlejší, nicméně nezanedbatelnou úlohu, má pak Cdr2p pumpa (*Holmes et al., 2008*).

Přestože *CDR1* a *CDR2* geny jsou homologní a jejich proteinové produkty mají podobnou strukturu, liší se v substrátové specificitě. Exprese *CDR2* genu v buňce *S. cerevisiae* má za následek rezistenci k toxické látce FK520 a diamidům, ale zvýšenou citlivost k peroxidu vodíku. Naopak produkce Cdr1p v *S. cerevisiae* může za citlivost k FK520, ale nemá vliv na toleranci buněk k oxidativním složkám ani k diamidům (*Gauthier et al., 2003*).

Produkt genu *CDR2* možná také přispívá k rezistenci kolonií k echinokandinům. Kolonie kmenů, které nadprodukují Cdr2p pumpu, vykazují zvýšenou odolnost k působení kaspofunginu, který se řadí mezi echinokandiny. Také kmeny se zvýšenou expresí genu *CDR1* mají větší rezistenci k těmto látkám, ale méně než kmeny se zvýšenou expresí *CDR2* (*Schuetzer-Muehlbauer et al., 2003*). Naopak Niimi a spolupracovníci (*Niimi et al., 2006*) tvrdí, že *CDR1*, *CDR2* ani *MDR1* geny nemají zásadní podíl na rezistenci k echinokandinům. Tito autoři zkoumali rezistenci klinických izolátů se zvýšenou expresí genů pro tyto pumpy odstraňující toxické látky. Kaspofungin a mikafungin (patřící rovněž mezi echinokandiny) ale inhibovaly růst kolonií těchto kmenů.

Další gen s vysokou homologií ke genům *CDR1* a *CDR2* je *CDR3* gen. Přesto vypadá, že se jeho produkt patrně nijak nepodílí na rezistenci buněk ani kolonií k toxickým látkám. Porušení obou alel *CDR3* nemá za následek zvýšení citlivosti k flukonazolu a podobně ani nadprodukce tohoto genu nezvyšuje odolnost k flukonazolu ani cycloheximidu, což jsou substráty Cdr1 a Cdr2 pump (*Balan et al., 1997*).

4.1.2 MDR transportér Mdr1p kvasinky *C. albicans*

K rezistenci buněk k flukonazolu přispívá také Mdr1p pumpa. Klinické izoláty *C. albicans*, které vykazují nadprodukcii tohoto proteinu, jsou totiž rezistentní k flukonazolu. Narušení obou alel genu *MDR1* v tomto izolátu snížilo jeho odolnost k této látce (*Wirsching*

et al., 2000). Dokonce se zdá, že Mdr1p hraje hlavní roli v rezistenci přisedlých buněk k flukonazolu. Kmen s deletovaným genem *MDR1* (ale funkčním Cdr1p) je k flukonazolu citlivější než kmen s delecí genu *CDR1* a funkčním transportérem Mdr1p. Přesto je u rodičovského (nemutovaného) kmene po adhezi buněk k podkladu nejvyšší exprese genu *CDR1*. Exprese genu *MDR1* je také zvýšená, ale ne tolik. Vyšší produkce Cdr1p oproti Mdr1p zřejmě souvisí s jejich specifitou. Zatímco Mdr1p je vysoce specializovaný transportér flukonazolu, Cdr1p má menší substrátovou specifitu a jeho nadprodukce by proto mohla poskytovat buňce obecnější obranný mechanismus (*Mateus et al., 2004*).

Nicméně tuto domněnku nepotvrzuje studium klinických izolátů *C. albicans* rezistentních k flukonazolu s mutací v *ERG11* genu. Geny *CDR1* a *CDR2* byly více přepisované ve všech izolátech, ale pouze v několika z nich byla zvýšená také exprese genu *MDR1*, přestože všechny izoláty byly k flukonazolu rezistentní (*Chen et al., 2010*). Ke stejným výsledkům došli také White a spolupracovníci při analýze jiných klinických izolátů. Rezistence jednotlivých izolátů přesně korelovala s expresí *CDR1* a *CDR2* genu, ale jen v některých případech také s expresí *MDR1* (*White et al., 2002*). Podobně také zesílená transkripce genu *MDR1* v laboratorním kmenu CAI4 jen nepatrně zvýšila rezistenci tohoto kmene k flukonazolu. Nicméně byla dostatečná ke zvýšení odolnosti buněk k ceruleninu a brefeldinu A, což naznačuje, že Mdr1p pumpa má také široké spektrum substrátů (*Hiller et al., 2006*). Ze všech těchto pokusů vyplývá, že na rezistenci k flukonazolu a dalším toxickým látkám se patrně podílí více faktorů a v každém izolátu je působena trochu jinými mechanismy.

Cdr1p, Cdr2p a Mdr1p pumpy zvyšují odolnost buněk k flukonazolu tím, že snižují jeho koncentraci v buňce. Zprostředkovávají přesun flukonazolu do trans-Golgiho váčků, které následně svůj obsah odstraní exocytózou ven z buňky (*Basso et al., 2010*).

4.1.3 MDR transportér Pdr16p kvasinky *C. albicans*

Dalším z proteinů, přispívajících k rezistenci biofilmů *C. albicans* k azolům, je Pdr16p. Klinické izoláty rezistentní k azolům, vykazující nadprodukci Cdr1p a Cdr2p pump, mají často zvýšenou také expresi genu *PDR16*, kódujícího proteinový přenašeč fosfatidylinositolu (*Deken a Raymond, 2004*). Delecí obou alel genu *PDR16* v kmenech, jejichž nemutovaná forma je rezistentní k azolům a nadprodukuje Cdr1p, Cdr2p a Pdr16p proteiny, dojde k dvojnásobnému snížení rezistence oproti rodičovskému kmenu. Opětovné vložení *PDR16* genu do tohoto mutanta rezistenci obnoví. Pokud v kmenech citlivých na azoly zvýšíme

produkcí Pdr16p, sníží se jejich citlivost k těmto látkám na polovinu (Saidane et al., 2006).

PDR16 gen *C. albicans* je ortolog *PDR16* genu *Saccharomyces cerevisiae* patřícího do rodiny Sec14p. Delece genu *PDR16* v *S. cerevisiae* má za následek snížení rezistence k azolům a zároveň vyvolá významné změny zastoupení sterolů v plazmatické membráně. Proto se předpokládá, že produkt tohoto genu reguluje syntézu sterolů. Citlivost mutantů k azolům je zřejmě způsobena právě nevyváženou syntézou sterolů a tím způsobenými změnami vlastností membrány, i větším vstupem toxických látek do buňky (van den Hazel et al., 1999). Díky vysoké homologii genů *PDR16* *C. albicans* a *S. cerevisiae* lze předpokládat, že v *C. albicans* bude tento gen přispívat k rezistenci podobným způsobem, tedy regulací syntézy ergosterolu.

Snížením množství ergosterolu v membráně dojde k porušení interakce mezi ergosterolem a sfingolipidy, což vede k větší propustnosti membrány, k snížení aktivity pump a celkově k vyšší citlivosti buněk k toxickým látkám. Tato citlivost je zřejmě způsobena hlavně ovlivněním pump. Pouhé zvýšení propustnosti membrány o 12 % pomocí membránového fluidizeru benzyl alkoholu neovlivnilo citlivost k toxickým látkám. Naproti tomu aktivita hlavní MDR pumpy Cdr1p byla redukována na pouhých 50 % v kmenu se sníženým množstvím ergosterolu nebo sfingolipidu v membráně (Mukhopadhyay et al., 2004).

Hladina sterolů je přísně kontrolována také v membránách buněk tvořících biofilm a ovlivňuje jejich rezistenci k flukonazolu. Množství ergosterolu v membránách těchto buněk klesá o 41 % mezi časnou a střední fází vývoje biofilmu a o 50 % mezi časnou fází a fází zrání. Naproti tomu u planktonních buněk je redukce pouze 18 % mezi šestou a dvanáctou hodinou kultivace a později již je pokles v podstatě zanedbatelný. Také hladiny dalších sterolů se v průběhu vývoje biofilmu mění (Mukherjee et al., 2003). Je tedy možné, že Pdr16p ovlivňuje rezistenci biofilmů nejen během jejich vývoje, ale také ve zralých biofilmech.

Z těchto poznatků by snad šla vyslovit domněnka, že Pdr16p se podílí na rezistenci biofilmů k flukonazolu a to tím, že reguluje množství a zastoupení jednotlivých sterolů v plazmatické membráně. Chybná regulace vede ke změně této rovnováhy, která má za následek snížení aktivity Cdr1p pumpy, což vede k větší akumulaci toxických látek v buňce a následnému snížení rezistence biofilmu k této látce. Ve zralém biofilmu, kde už Cdr1p nehraje tak velkou roli, ovlivňuje Pdr16p stále zastoupení sterolů v membráně. Otázkou však zůstává, zda tato regulace stále nějak ovlivňuje rezistenci.

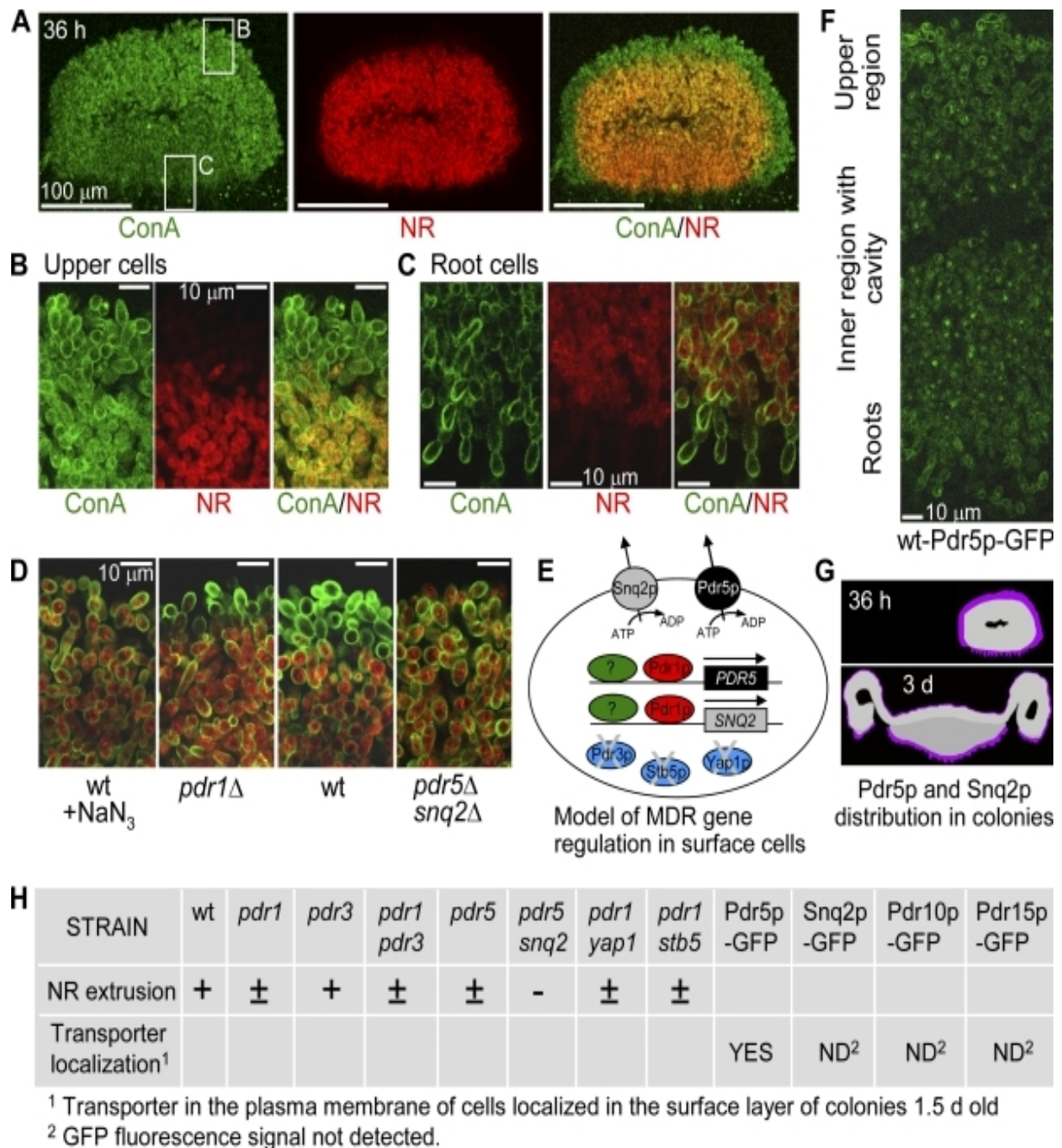
4.1.4 MDR transportéry kvasinky *S. cerevisiae*

V koloniích kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se na rezistenci k toxickým látkám podílejí převážně Pdr5p a Snq2p pumpy, které přispívají k ochraně povrchové vrstvy buněk v mladé kolonii divokého kmene *Saccharomyces cerevisiae* BR-F (Váchová *et al.*, 2011). Aktivita těchto pump byla v rámci kolonie sledována prostřednictvím barvení Nilskou červení (Nile red), barvivem, které se váže na tukové částičky, jako jsou granule a membrány, a červeně je barví (Greenspan a Fowler, 1985). Povrchovou vrstvu kolonie nelze tímto barvivem obarvit. Pokud se ale na kolonii působí formaldehydem, který buňky fixuje a permeabilizuje, nebo NaN₃, který blokuje tvorbu ATP v buňce, lze obarvit celou kolonii (viz obr. 9). Z těchto výsledků můžeme usoudit, že Nilská červeň je z nepoškozených buněk povrchové vrstvy aktivně transportována ven mechanismem využívajícím ATP. Takovým mechanismem mohou být právě MDR pumpy (Váchová *et al.*, 2011).

Testováním různých mutantů v MDR pumpách (*pdr5Δ*, *pdr10Δ*, *pdr15Δ*, *snq2Δ*) a jejich dvojnásobných a trojnásobných kombinací bylo zjištěno, že v koloniích jsou v povrchových vrstvách aktivní transportéry Pdr5p a Snq2p, které jsou odpovědné za odstraňování Nilské červeně. Syntéza Pdr5p a Snq2p transportérů v povrchových vrstvách kolonie je pod kontrolou transkripčního faktoru Pdr1p, neboť delece genu *PDR1* výrazně snižuje schopnost buněk povrchové vrstvy odstranit barvivo z buněk (Váchová *et al.*, 2011). Pdr1p je transkripční faktor, o kterém je známo, že ovlivňuje expresi mnoha genů v klasických kvasinkových kulturách, mimo jiné i geny pro MDR pumpy jako jsou *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1* a *TPO1* (Fardeau *et al.*, 2007).

Vliv Pdr1p na rezistenci buněk k toxickým látkám zkoumali také Stepanov a spolupracovníci (Stepanov *et al.*, 2008). Represe tohoto proteinu má za následek rapidní zvýšení citlivosti k širokému spektru toxických látek, například cykloheximidu, mikonazolu a acetaminofenu. V postižených buňkách se akumuluje rhodamin třikrát více než v divokých, což značí, že je poškozeno odstraňování toxických látek z buňky. Dochází také ke snížení hladin některých proteinů regulovaných Pdr1p faktorem, zvláště Pdr5p pump.

Pdr5p pumpa může transportovat z buňky stovky různých strukturně a funkčně nepříbuzných látek, například cykloheximid, mykotoxin a cerulenin. Snq2p zprostředkovává rezistenci buněk k mutagenům jako jsou 4-nitroquinoline-N-oxid a methyl-nitro-nitrosoguanidin (Bauer *et al.*, 1999).



Obr. 9: Umístění aktivních MDR pump v koloniích. (A – D) Svislý příčný řez BR-F kolonií starou 36 hodin, barveno ConA-AF a Nilskou červení. (A) Celou kolonii pokrývá vrstva buněk nebarvitelných Nilskou červení. (B a C) Detail vrchních (B) a spodních (C) buněk odpovídá rámečkům v obrázku A. (D) Odstraňování Nilské červeně z vrchní vrstvy buněk je redukováno odstraněním transkripčního faktoru Pdr1p a blokováno nedostatkem energie způsobeným NaN_3 nebo absencí Pdr5p a Snq2p MDR transporterů. (E) Model regulace MDR genů. (F) Lokalizace Pdr5p-GFP v membránách vrchních buněk kolonie a špiček „kořínků“ koreluje s vrstvou nebarvitelných buněk v A-C. (G) Model distribuce Pdr5p a Snq2p (fialově) v kolonii. (H) Odstraňování Nilské červeně a lokalizace transporterů v koloniích různých kmenů. Wt – wild type – divoký typ. Převzato z Váchová *et al.*, (2011).

4.2 Rezistence v průběhu vývoje biofilmu

MDR transportéry přispívají výrazně k rezistenci biofilmů pouze v počátečních fázích jejich vývoje. S postupem času jejich příspěvek značně klesá a to až téměř k nule u vyzrálých biofilmů.

Tento závěr vychází z výsledků mnoha studií. V jednom z nich sledovali Mateus a spolupracovníci (*Mateus et al., 2004*) rezistenci biofilmů *C. albicans* k flukonazolu. V tomto pokusu bylo použito více metod, například sledování změn aktivit promotorů, produkce fúzních proteinů nebo změn rezistence k toxickým látkám. Již 15 až 30 minut po nasednutí kvasinkových buněk na podložní sklička byla pozorována zvýšená exprese genů *MDR1* a *CDR1* kódujících pumpy odstraňující toxické látky. Ve stejném časovém úseku byla v buňkách schopných produkovat fúzní proteiny Cdr1p nebo Mdr1p s fluorescenčním proteinem GFP pozorována fluorescence, což potvrzuje, že dochází nejen k transkripci genu, ale také k jeho translaci. U planktonních buněk nebyla zvýšená exprese genů pozorována. Proto se předpokládá, že právě kontakt buňky s podkladem vyvolá expresi alespoň těchto dvou genů. Jejich produkty - transportéry Mdr1p a Cdr1p - jsou pak patrně zodpovědné za rezistenci buněk k toxickým látkám, protože dvě hodiny po nasednutí vykazují buňky stonásobné zvýšení tolerance k flukonazolu oproti planktonním buňkám v logaritmické fázi. Naproti tomu kmeny mutantní v *MDR1* a *CDR1* jsou po dvou hodinách výrazně citlivější k této látce (*Mateus et al., 2004*).

Účast proteinů kódovaných těmito geny *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* na rezistenci biofilmů k flukonazolu potvrdili také Mukherjee a jeho spolupracovníci (*Mukherjee et al., 2003*). Porovnávali rezistenci divokých kmenů, kmenů s delecí jednoho, dvou nebo všech tří genů a planktonních buněk. Aby zjistili, ve kterých vývojových fázích se MDR transportéry podílejí na rezistenci biofilmu, prováděli testy odolnosti 6, 12 a 48 hodin od zaočkování. Divoký kmen rostoucí v biofilmu byl stále stejně vysoce rezistentní. Kmeny s delecí jednoho genu měly rezistenci v biofilmu více méně neporušenou. Dvojnásobný a trojnásobný mutant vykazoval po 6 hodinách velmi sníženou odolnost oproti divokým kmenům, nicméně v pozdějších vývojových fázích se už projevoval stejně jako nemutovaný. Rezistence odpovídajících planktonních buněk je po celou dobu nesrovnatelně nižší v porovnání s buňkami v biofilmu a nemění se v čase. Nejvíce rezistentní z těchto planktonních buněk je divoký kmen a kmen s delecí *MDR1*, nejméně pak trojný mutant (viz tabulka 3).

Kmen	Genotyp	MIC ($\mu\text{g/ml}$) pro kmen rostoucí jako:					
		Biofilm v čase:			Planktonní buňky v čase:		
		6 h	12 h	48 h	6 h	12 h	48 h
CAF2-1	Wild type	>256	>256	>256	2	2	2
DSY448	$\Delta cdr1$	256	>256	>256	1	1	1
DSY465	$\Delta mdr1$	256	>256	>256	2	2	2
DSY654	$\Delta cdr \Delta cdr2$	64	>256	>256	1	1	1
DSY1050	$\Delta cdr1 \Delta cdr2 \Delta mdr1$	16	256	>256	0,13	0,13	0,13

Tab. 3: Minimální inhibující koncentrace MICs (minimum inhibitory concentrations) flukonazolu pro různé kmeny *C. albicans* rostoucí do určitého časového bodu jako biofilm nebo jako planktonní buňky. Převzato z Mukherjee et al., (2003).

Další metodou používanou Mateusem a spolupracovníky (Mateus et al., 2004) bylo sledování syntézy mRNA. Tento přístup přináší důkaz o tom, že pumpy přispívají k rezistenci pouze v časně fázi vývoje biofilmu, ale ne už u jeho vyzrálých forem. Expres *MDR1*, *CDR2* a *CDR1* genů je větší v adherovaných buňkách (15 minut po přisednutí) než v buňkách planktonních, a to dvojnásobně pro *MDR1* a *CDR2* a čtyřnásobně pro *CDR1*. Když porovnali expresi těchto genů v buňkách biofilmu, planktonních buňkách a takových, které rostly nejprve 2 hodiny přisedle a poté byly uvolněny a kultivovány volně, nebyly v kulturách starých 24 hodin zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Při porovnání 48 hodin starých kultur byla expres *MDR1* dvakrát nižší v buňkách biofilmu než u planktonních nebo oddělených buněk a expres *CDR1* dokonce 9,5-krát nižší. Z těchto výsledků můžeme vyslovit domněnku, že MDR pumpy hrají roli také v rezistenci planktonních buněk, a to po celou dobu jejich růstu.

Analýza množství mRNA *CDR1* a *MDR1* pomocí Northern blotu v biofilmech starých 6, 12 a 24 hodin přinesla podobné výsledky. Nejvyšší hodnota byla naměřená po 12 hodinách, nejnižší po 24 hodinách. Analogická sestupná aktivita pump byla prokázána pomocí jejich fluorescenčního substrátu Rh123, který se akumuluje v buňkách postrádajících funkční pumpu (Mukherjee et al., 2003).

Na jiných kmenech *C. albicans* zjišťovali množství mRNA genů *MDR1*, *CDR1* a *CDR2* také Ramage se spolupracovníky (Ramage et al., 2002a). Pokusy byly prováděny na biofilmech starých 24 a 48 hodin. Expres *MDR1* genu byla po 24 hodinách velmi zřetelná, nicméně po 48 hodinách klesla téměř na hranici detekovatelnosti. Hladiny mRNA *CDR1* a *CDR2* byly přibližně stejné v obou časech a zároveň podstatně vyšší v porovnání s hladinami

těchto mRNA ve stejně starých planktonních buňkách. V těch bylo množství všech tří druhů mRNA po oba časy sotva detekovatelné. Tento výsledek je v rozporu s výše zmíněným pokusem, ale rozdíly mohou být způsobeny jinými kultivačními podmínkami i různými kmeny *C.albicans* použitými k pokusům. Oba výsledky se nicméně shodují v tom, že exprese *MDR1* genu s časem klesá, čímž musí zákonitě klesat také význam tohoto proteinu v rezistenci biofilmu.

Všem těmto zjištěním se vymyká pokus Garía-Sánchez a jejích spolupracovníků (*Garía-Sánchez et al., 2004*), kteří analyzovali a porovnávali exprese genů v buňkách rostoucích v biofilmu a planktonně. V této studii se exprese genů *CDR1*, *CDR2*, *CDR3*, *CDR4* a *MDR1* v těchto dvou typech buněk nijak nelišila. Jedná se ale o zcela ojedinělý výsledek.

Delece *CDR1*, *CDR2* ani *MDR1* genů neovlivňuje schopnost kmenů *C. albicans* tvořit biofilmy. Mutovaný i divoký biofilm mají stejnou morfologii, metabolickou aktivitu i suchou váhu. Z toho vyplývá, že rezistence, kterou tyto pumpy vyvolávají, není způsobená změnami v růstu nebo morfologii biofilmu (*Mukherjee et al., 2003*). To také odpovídá pozorování, že se rezistence projevuje již v době, kdy ještě neexistuje žádný strukturovaný biofilm, pouze přichycené buňky (*Mateus et al., 2004*).

4.3 Lokalizace MDR transportérů v koloniích

Lokalizace MDR transportérů byla podrobněji zkoumána zatím pouze u kolonií *Saccharomyces cerevisiae*. Zde existuje povrchová vrstva buněk, která efektivně odstraňuje fluorescenční substrát Nilskou červeň. Pro toto odstraňování je nutná přítomnost MDR transportérů Pdr5p a Snq2p. S pozorovanou aktivitou MDR pump výhradně v horních vrstvách kolonie souhlasí i buněčná lokalizace Pdr5p-GFP. V buňkách povrchové vrstvy kolonie staré jeden a půl dne je Pdr5p-GFP přítomný převážně na plasmatických membránách, kdežto ve vnitřních vrstvách kolonie se nachází hlavně ve vakuolách, což vypovídá o jeho degradaci (*Váchová et al., 2011*).

Také v koloniích hrají zřejmě MDR pumpy významnější roli v rezistenci pouze v počátečních fázích vývoje. V koloniích starých 24 až 36 hodin byla vrstva buněk s aktivními Pdr5p a Snq2p transportéry silná $17,8 \pm 2,5 \mu\text{m}$, po dvou dnech se ale znatelně ztenčila, zhruba na $11,5 \mu\text{m}$, a po sedmi dnech vymizela z celé kolonie kromě konců podpovrchové „kořenovité“ struktury tvořené pseudohyfálními buňkami (*Váchová et al., 2011*).

5 Závěr

Nejvýznamnějšími přenašeči toxických látek u *C. albicans* jsou produkty genů *CDR1*, *CDR2* a *MDR1*. Cdr1p pumpa patří do ABC proteinové nadrodiny a jejím substrátem jsou převážně azoly – flukonazol, ketokonazol a itrakonazol, dále pak například cykloheximid a chloramfenikol. Velkou homologii k tomuto přenašeči vykazuje Cdr2p, který se rovněž menší měrou podílí na rezistenci k azolům, a dále zřejmě přispívá k rezistenci k echinokandinům. Třetí důležitý přenašeč je Mdr1p patřící do MFS nadrodiny, který z buněk odstraňuje flukonazol, cerulenin, brefeldin A a další látky.

Tyto pumpy jsou produkovány v buňkách rodícího se biofilmu ve zvýšeném množství oproti planktonním buňkám již dvě hodiny po adhezi buněk na povrch substrátu. S touto zvýšenou expresí koreluje také zvýšená rezistence tohoto časného biofilmu. Protože v tomto čase ještě není přítomná extracelulární matrix ani jiné struktury, které přispívají k odolnosti maturovaných biofilmů, je zřejmé, že rezistence je způsobena pouze zvýšenou produkcí MDR pump, které odstraňují toxické látky z buňky.

Jak biofilm dozrává, exprese MDR pump se výrazně snižuje až téměř vymizí, nicméně rezistence biofilmu zůstává stejná. Lze tedy usoudit, že roli pump postupně přebírají jiné mechanismy a pumpy tudíž hrají roli v odolnosti biofilmů pouze v jejich počátečních vývojových fázích.

Funkce MDR pump úzce souvisí s plazmatickou membránou, zvláště s obsahem ergosterolu. Množství a zastoupení sterolů v membráně ovlivňuje Pdr16p, čímž se nepřímo podílí na rezistenci buněk.

Lokalizace MDR transportérů uvnitř kvasinkové mnohobuněčné struktury byla zatím zkoumána pouze v jednom článku, a to na kvasince *S. cerevisiae*, jejíž významné MDR přenašeče jsou hlavně Pdr5p a Snq2p. Obě pumpy jsou schopné odstraňovat z buňky stovky různých strukturně a funkčně nepříbuzných látek. V strukturovaných, biofilmu podobných koloniích *S. cerevisiae* jsou tyto transportéry lokalizované na plazmatických membránách buněk povrchové vrstvy kolonie, která tak chrání vnitřní buňky před působením toxických látek.

K této tématice není zatím provedeno mnoho pokusů, což má za následek, že se získané poznatky často různí. Proto zde zůstává velké pole působnosti pro další výzkum, který by jednou mohl pomoci k zefektivnění léčby nejen kvasinkových infekcí.

6 Seznam použité literatury

- Adam, B., Baillie, G.S. and Douglas, L.J. (2002) Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermalis*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 344-349
- Alem, M.A.S., Oteef, M.D.Y., Flowers, T.H., and Douglas, L.J. (2006) Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryotic Cell* 5, 1770-1779
- Al-Fattani, M.A. and Douglas, L.J. (2006) Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* 55, 999-1008
- Baillie, G.S. and Douglas, L.J. (2000) Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 397-403
- Balan, I., Alarco, A.M., and Raymond, M. (1997) The *Candida albicans* CDR3 Gene Codes for an Opaque-Phase ABC Transporter. *Journal of Bacteriology* 179, 7210-7218
- Basso, L.R., Gast, Ch.E., Mao, Y., and Wong, B. (2010) Fluconazole Transport into *Candida albicans* Secretory Vesicles by the Membrane Proteins Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p. *Eukaryotic Cell* 9, 960-970
- Bauer, B.E., Wolfger, H., Kuchler, K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 217-236
- Blankenship, J.R. and Mitchell, A.P. (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* 9, 588-594
- Calabrese, D., Bille, J. and Sanglard, D. (2000) A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 146, 2743-2754
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T. and Ghannoum, M.A. (2001) Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology* 183, 5385-5394
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., and Fink, G.R. (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *PNAS* 101, 5048-5052
- Chen, L.M., Xu, Y.H., Zhou, C.L., Zhao, J., Li, C.Y. and Wang, R. (2010) Overexpression of *CDR1* and *CDR2* Genes Play an Important Role in Fluconazole Resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C Mutations. *The Journal of International Medical Research* 38, 536-545
- Daniels, K.J., Srikantha, T., Lockhart, S.R., Pujol, C. and Soll, D.R. (2006) Opaque cells

signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. The EMBO Journal 25, 2240-2252

Deken, X.D. and Raymond, M. (2004) Constitutive Activation of the *PDR16* Promotor in a *Candida albicans* Azole-Resistant Clinical Isolate Overexpressing *CDR1* and *CDR2*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48, 2700-2703

Donlan, R.M. (2001) Biofilms and Device-Associated Infections. Emerging Infectious Diseases 7, 277-281

Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 15, 167-193

Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. TRENDS in Microbiology 11, 30-36

Fardeau, V., Lelandais, G., Oldfield, A., Salin, H., Lemoine, S., Garcia, M., Tanty, V., Le Crom, S., Jacq, C., and Devaux, F. (2007) The Central Role of *PDR1* in the Foundation of Yeast Drug Resistance. The Journal of Biological Chemistry 282, 5063-5074

García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., and d'Enfert, Ch. (2004) *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns. Eukaryotic Cell 3, 536-545

Gauthier, Ch., Weber, S., Alarco, A.M., Alqawi, O., Daoud, R., George, E., and Raymond, M. (2003) Functional Similarities and Differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p Transporters. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 1543-1554

Granger, B.L., Flenniken, M.L., Davis, D.A., Mitchell, A.P. and Cutler, J.E. (2005) Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. Microbiology 151, 1631-1644

Greenspan, P. and Fowler, S.D. (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe Nile red. Journal of Lipid Research 26, 781-789

Hawser, S.P. and Douglas, L.J. (1995) Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39, 2128-2131

Hiller, D., Sanglard, D., and Morschhäuser, J. (2006) Overexpression of the *MDR1* Gene Is Sufficient To Confer Increased Resistance to Toxic Compounds in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50, 1365-1371

Holmes, A.R., Lin, Y., Niimi, K., Lamping, E., Keniya, M., Niimi, M., Tanabe, K., Monk, B., and Cannon, R. (2008) ABC Transporter Cdr1p Contributes More than Cdr2p Does to Fluconazole Efflux in Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52, 3851-3862

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lise, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., and Nickerson, K.W. (2001) Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. Applied and Environmental Microbiology 67, 2982-2992

- Jungwirth, H., Kuchler, K. (2006) Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Letters* 580, 1131-1138
- Kumamoto, C.A. (2005) A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *PNAS* 102, 5576-5581
- Kumamoto, C.A. and Vines, M.D. (2005) Alternative *Candida albicans* Lifestyles : Growth on Surfaces. *Annual Review of Microbiology* 59, 113-133
- LaFleur, M.D., Kumamoto, C.A., Lewis, K. (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3839-3846
- Li, F., Svarovsky, M.J., Karlsson, A.J., Wagner, J.P., Marchillo, K., Oshel, P., Andes, D., and Palecek, S.P. (2007) Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. *Eukaryotic Cell* 6, 931-939
- Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M.A., and Oliveira, R. (2007) Morphogenesis Control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through Signaling Molecules Produced by Planktonic and Biofilm Cells. *Eukaryotic Cell* 6, 2429-2436
- Mateus, C., Crow, S.A., Jr., and Ahearn, D.G. (2004) Adherence of *Candida albicans* to Silicone Induces Immediate Enhanced Tolerance to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3358-3366
- Miller, M.G. and Johnson, A.D. (2002) White-Opaque Switching in *Candida albicans* Is Controlled by Mating-Type Locus Homeodomain Proteins and Allows Efficient Mating. *Cell* 110, 293-302
- Mohandas, V. and Ballal, M. (2011) Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. *Journal of Global Infection Diseases* 3,4-8
- Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M., and Ghannoum, M.A. (2003) Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. *Infection and Immunity* 71, 4333-4340
- Mukhopadhyay, K., Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, T.J., Chattopadhyay, A., and Prasad, R. (2004) Membrane Sphingolipid-Ergosterol Interaction Are Important Determinants of Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1778-1787
- Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Holmes, A.R., Yates, J.E., Decottignies, A., Monk, B., Goffeau, A., and Cannon, R.D. (2001) Functional Expression of *Candida albicans* Drug Efflux Pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Deficient in Membrane Transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 3366-3374
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Pla, J., and Nombela, C. (1995) Functional Characterization

of the *MKCI* Gene of *Candida albicans*, which Encodes a Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog Related to Cell Integrity. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2197-2206

Nett, J.E., Crawford, K., Marchillo, K., and Andes, D.R. (2010) Role of Fks1p and Matrix Glukan in *Candida albicans* Biofilm Resistance to an Echinocandin, Pyrimidine, and Polyene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 3505-3508

Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A.R., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B.C., and Cannon, R.D. (2006) Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* Does Not Produce Significant Changes in Exhinocandin Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1148-1155

Niimi, M., Niimi, K., Takano, Y., Holmes, A.R., Fischer, F.J., Uehara, Y. and Cannon, R.D. (2004) Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 999-1006

Nobile, C.J., Mitchell, A.P. (2005) Regulation of Cell-Surface Genes and Biofilm Formation by the *C. albicans* Transcription Factor Bcr1p. *Current Biology* 15, 1150-1155

Nobile, C.J., Mitchell, A.P. (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular Microbiology* 8, 1382-1391

Pasrija, R., Banerjee, D., and Prasad, R. (2007) Structure and Function Analysis of CaMdr1p, a Major Facilitator Superfamily Antifungal Efflux Transporter Protein of *Candida albicans*: Identification of Amino Acid Residues Critical for Drug/H⁺ Transport. *Eukaryotic Cell* 6, 443-453

Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A., Balzi, E. (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Current Genetics* 27, 320-329

Prasad, R., Gaur, N.A., Gaur, M. and Komath, S.S. (2006) Efflux Pumps in Drug Resistance of *Candida*. *Infectious Disorders – Drug Targets* 6, 1-15

Prasad, R., Sharma, M., and Rawal, M.K. (2011) Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic *Candida albicans*. *Journal of Amino Acids* 2011, 1-12

Procko, E., O'Mara, M.L. Bennette, W.F.D., Tieleman, D.P., and Gaudet, R. (2009) The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *The FASEB Journal* 23, 1287-1302

Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T.F., Wickes, B.L. and López-Ribot, J. (2002a) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 973-980

Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., and López-Ribot, J.L. (2002) Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molekule. *Applied and*

Environmental Microbiology 68, 5459-5463

Ramage, G., VandeWalle, K., Wickes, B.L. and López-Ribot J. L. (2001) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 18, 163-170

Reddy, V.S., Shlykov, M., Castillo, R., Sun, E.I. and Saier, M.H., Jr. (2012) The Major Facilitator Superfamily (MFS) Revisited. The FEBS Journal

Sá-Correia, I., dos Santos, S.C., Teixeira, M.C., Cabrito, T.R. and Mira, N.P. (2009) Drug:H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. Trends in Microbiology 17, 22–31

Sá-Correia, I., Tenreiro, S. (2002) The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. Journal of Biotechnology 98, 215-226

Saidane, S., Weber, S., Deken, X.D., St-Germain, G. and Raymond, M. (2006) *PDR16*-mediated azole resistance in *Candida albicans*. Molecular Microbiology

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J. (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology 143, 405-416

Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E. and Kuchler, K. (2003) The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. Molecular Microbiology 48, 225-235

Seeger, M.A., van Veen, H.W. (2009) Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. Biochimica et Biophysica Acta 1794, 725-737

Sipos, G. and Kuchler, K. (2006) Fungal ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Drug Resistance & Detoxification. Current Drug Targets 7, 471-481

Staab, J.F., Ferrer, Ch.A., and Sundstrom, P. (1996) Developmental Expression of a Tandemly Repeated Prolin- and Glutamine-rich Amino Acid Motif on Hyphal Surfaces of *Candida albicans*. The Journal of Biological Chemistry 271, 6298-6305

Stepanov, A., Nitiss, K.C., Neale, G., and Nitiss, J. (2008) Enhancing drug accumulation in *S. cerevisiae* by repression of pleiotropic drug resistance genes with chimeric transcription repressors. NIH Public Access 74, 423–431

Suci, P.A. and Tyler, B.J. (2002) Action of Chlorhexidine Digluconate against Yeast and Filamentous Forms in an Early-Stage *Candida albicans* Biofilm. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 3522-3531

Tsao, S., Rahkhoodae, F., and Raymond, M. (2009) Relative Contributions of the *Candida albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53, 1344-1352

Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., a Palková, Z. (2011) Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *The Journal of Cell Biology* 194, 679–687

van den Hazel, H.B., Pichler, H., do Valle Matta, M.A., Leitner, E., Goffeau, A., and Daum, G. (1999) *PDR16* and *PDR17*, Two Homologous Genes of *Saccharomyces cerevisiae*, Affect Lipid Biosynthesis and Resistance to Multiple Drugs. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 1934-1941

White, T.C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L.F., and Stevens, D.A. (2002) Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1704–1713

Wirsching, S., Michel, S. and Morschhäuser, J. (2000) Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Molecular Microbiology* 36, 856-865