



**Joana Alexandra  
Vilarinho Branco**

**Estudo molecular da resistência antifúngica  
de *Candida parapsilosis***



**Joana Alexandra  
Vilarinho Branco**

**Estudo molecular da resistência antifúngica  
de *Candida parapsilosis***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Doutora Isabel Alexandra Marcos Miranda, Investigadora do Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Professora Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, Professora e Investigadora do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor João António de Almeida Serôdio**  
Prof. Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Raquel Monteiro Marques da Silva**  
Investigador Auxiliar do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto - IPATIMUP

**Doutora Isabel Alexandra Marcos Miranda**  
Investigador Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Prof. Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira**  
Prof. Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À minha orientadora Doutora Isabel Miranda pela oportunidade, dedicação, paciência e compreensão com que orientou este trabalho.

À minha coorientadora Doutora Etelvina Figueira pela disponibilidade e confiança no meu trabalho.

A todas as minhas colegas de laboratório pelos ensinamentos e apoio prestado durante todo este tempo.

Aos meus pais por acreditarem e incentivarem sempre os meus sonhos.

Às minhas irmãs nas quais vejo exemplos de vida.

Aos meus dois amores por fazerem parte da minha vida.

Ao Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UP pela possibilidade de realizar este trabalho de investigação.

## palavras-chave

*Candida parapsilosis*, fator de transcrição *Mrr1*, resistência antifúngica

## resumo

A incidência de infecções fúngicas invasivas por *Candida parapsilosis* tem vindo a aumentar ao longo da última década. O maior grupo de risco por este tipo de infeção são indivíduos imunodeprimidos, principalmente neonatos de baixo peso, sendo esta levedura transmitida por via horizontal principalmente através do contato com as mãos dos prestadores de cuidados de saúde. Para o tratamento destas infeções estão disponíveis 4 classes de agentes antimicóticos, mas destes os mais utilizados são os azóis. Os agentes azólicos têm como alvo a via biossintética do ergosterol, principal constituinte da membrana celular fúngica, através da inibição direta da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase. Um estudo recente demonstrou que as estirpes resistentes obtidas após exposição de uma estirpe clínica suscetível de *C. parapsilosis* BC014 aos antifúngicos azólicos, fluconazol e voriconazol, aumentaram a expressão de transportadores membranares de efluxo *MDR1*, assim como o fator de transcrição *Mrr1* que controla a sua expressão. Após sequenciação do gene *MRR1* das estirpes resistentes BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub> e BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub> foram encontradas mutações *sense-to-sense* G583R e K873N, respetivamente. Encontra-se descrito para *C. albicans* que a sobre-expressão do *MRR1* e do *MDR1* está relacionada com mutações *gain-of-function* neste fator de transcrição. De forma a investigar a importância das mutações pontuais no fator de transcrição *Mrr1*, identificadas nas estirpes resistentes, pretendia-se efetuar a deleção do gene *MRR1* na estirpe clínica suscetível BC014 e seguidamente à sua complementação independente com os genes mutados. Para tal foi utilizada a ferramenta molecular *SAT1-Flipper*. No entanto, perante a impossibilidade da obtenção de clones  $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ , o trabalho prosseguiu com a complementação de uma estirpe de *C. parapsilosis*  $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ , denominada  $\Delta 1$ . A integração dos genes *MRR1* mutados, *MRR1<sub>R<sub>FLC</sub></sub>* e *MRR1<sub>R<sub>VRC</sub></sub>*, não alterou a suscetibilidade aos azóis das estirpes complementadas. Os valores de CIM obtidos foram de 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ao fluconazol e 0.03  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ao voriconazol, apresentando fenótipo suscetível. Estes resultados demonstram que as mutações pontuais no gene *MRR1* não são *gain-of-function*, não estando por isso associadas à resistência ao fluconazol e voriconazol em *C. parapsilosis*.

## keywords

*Candida parapsilosis*, transcription factor *Mrr1*, antifungal resistance

## abstract

For the past decade the incidence of invasive fungal infections with *C. parapsilosis* has been dramatically increased. Infections with this opportunistic pathogenic yeast are most common in immunocompromised patients like neonates low-birth-weight and is frequently transmitted horizontally through the hands of health care workers. For the treatment of this infections are available four antimycotic classes, being azoles the most commonly used. These azolic agents target the sterol biosynthetic pathway, the major sterol in the fungal cell membrane, by inhibiting the enzyme sterol 14 $\alpha$ -demethylase. A recent study has shown that the resistant strains BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub> and BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub>, obtained after exposure of a susceptible clinical strain *C. parapsilosis* BC014 to fluconazole and voriconazole, displayed increased expression of the *MDR1* multidrug resistance and its transcription factor *Mrr1*. The sequencing of the gene *MRR1* in these resistant strains identified two sense-to-sense mutations G583R (BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub>) and K873N (BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub>). In *C. albicans* the overexpression of *MRR1* and *MDR1* is associated with gain-of-function mutations in the transcription factor. In the present study we investigate the importance of *Mrr1* point mutations detected in *C. parapsilosis* BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub> and BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub> in their azole resistance. For that we intended to knockout the *MRR1* gene in the susceptible parental strain BC014 and then separately complementate the  $\Delta mrr1/\Delta mrr1$  strain with the mutated genes, *MRR1<sub>R<sub>FLC</sub></sub>* and *MRR1<sub>R<sub>VRC</sub></sub>*. For that, it was used the *SAT1*-flipper cassette. In the absence of null mutants ( $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ ) achievement, it was decided to complement an  $\Delta mrr1/\Delta mrr1$  strain designated  $\Delta 1$ . The independent integration of the *MRR1<sub>R<sub>FLC</sub></sub>* and *MRR1<sub>R<sub>VRC</sub></sub>* genes in the strain  $\Delta 1$  did not alter the susceptibility profile to fluconazole and voriconazole. The MIC values determined for parental and complemented strains were identical, 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  to fluconazole and 0.03  $\mu\text{g ml}^{-1}$  to voriconazole, displaying a susceptible phenotype. Therefore, these preliminary results demonstrated that mutations found in *MRR1* transcription factor were not associated with fluconazole and voriconazole resistance in *C. parapsilosis*.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
------------------------------	------------

---

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>V</b>
-----------------------------------	----------

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
-------------------	----------

---

Considerações Gerais	1
<i>Candida parapsilosis</i>	2
Terapia Antifúngica	3
Mecanismos de Resistência	4
Caso de Estudo	10

<b>OBJETIVO</b>	<b>11</b>
-----------------	-----------

---

<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
---------------------------	-----------

---

Estirpes e Condições de Crescimento	12
Antifúngicos	13
Preparação de Células Competentes de <i>E. coli</i>	13
Extração de DNA Plasmídico de <i>E. coli</i> (1)	13
Eletroforese de DNA	14
Restrição do DNA Plasmídico	14

Desfosforilação do DNA Plasmídico	14
Ligação de DNA - Vetor e Fragmentos/Gene	15
Transformação de <i>E. coli</i> com DNA Plasmídico	15
Extração de DNA Plasmídico de <i>E. coli</i> (2)	15
Extração de DNA Genómico de <i>C. parapsilosis</i>	16
Construção dos Plasmídeos	17
Transformação por Eletroporação	20
Amplificação e Restrição do Gene <i>SADH</i>	20
Avaliação da Suscetibilidade	21

---

**RESULTADOS | DISCUSSÃO** 23

---

**CONCLUSÃO | PERSPETIVAS FUTURAS** 31

---

**BIBLIOGRAFIA** 32



## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

ATCC – *American Type Culture Collection*

bp – pares de bases

CIM – Concentração Inibitória Mínima

Clo – Cloranfenicol

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO – dimetilsulfóxido

DTT - ditionitrotol

FLC – fluconazol

g (mg, µg, ng) – grama (miligrama, micrograma, nanograma)

*g* – força gravitacional

H<sub>2</sub>O – água

l (ml, µl) – litro (mililitro, microlitro)

mm – milímetros

ms – milissegundos

M (mM, µM) – molar (milimolar, micromolar)

MOPS – ácido propanosulfônico morfolino

Nou - nourseotricina

PBS – tampão fosfato salino

pm- picomoles

PSC - posaconazol

R - resistente

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

S – suscetível

S-DD - suscetível dose-dependente

U – unidades

VIH – vírus da imunodeficiência humana

YPD - *yeast peptone dextrose*

YPM - *yeast peptone maltose*

VRC – voriconazol

% - percentagem

5-FC – 5-fluorocitosina

5-FU – 5-fluorouracil

# LISTA DE FIGURAS E TABELAS

## INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Alvos das diferentes classes de agentes antifúngicos, utilizados na terapia clínica.

**Figura 2.** Mecanismos de resistência aos compostos azólicos em *C. albicans*.

**Tabela 1.** Natureza, alvo celular, modo de ação e mecanismos de resistência a alguns dos antifúngicos mais utilizados na terapia clínica.

**Tabela 2.** Localização das mutações *gain-of-function*, identificadas no fator de transcrição *Mrr1* nas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Tabela 1.** *Primers* utilizados neste estudo.

**Tabela 2.** Mistura para amplificação por PCR das sequências *up* e *downstream* do gene *MRR1*.

**Tabela 3.** Mistura para amplificação por PCR do gene *MRR1* mutado, das estirpes BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub> e BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub>, assim como das regiões *upstream* e *downstream* do gene.

**Tabela 4.** Mistura para amplificação por PCR do gene *SADH*.

## RESULTADOS | DISCUSSÃO

**Figura 1.** Construção da cassette de interrupção. (A) Cassete *SAT1-Flliper* (pCD8). (B) Cassete de interrupção pFM17 contendo as sequências *upstream* e *downstream* nos locais *KpnI/ApaI* e *SacII/SacI*, respectivamente.

**Figura 2.** Confirmação da deleção de um dos alelos do gene *MRR1* na estirpe BC014. As estirpes Cp1, Cp2 e Cp4 apresentaram ausência de crescimento, em meio YPD suplementado com Nou 200 µl ml<sup>-1</sup>, após 48 horas de incubação, confirmando assim a excisão da cassette *SAT1*.

**Figura 3.** Esquematização de uma nova cassette de interrupção do gene *MRR1* em *C. parapsilosis*. As sequências *up* e *downstream* clonadas no vetor referem-se às regiões -1000 a -500 bp (*MRR1\_up2*) e +500 a +1000 bp (*MRR1\_down2*) diferentes das clonadas no plasmídeo pFM17. Estas serão maiores e deslocadas no gene *MRR1*.

**Figura 4.** Construção das estirpes de *C. parapsilosis* complementadas com o gene *MRR1\_R<sub>FLC</sub>* e *MRR1\_R<sub>VRC</sub>*. (A) Foram construídas duas cassetes de complementação contendo o marcador de resistência à nouseotricina (*SAT1*) e o gene *MRR1\_R<sub>FLC</sub>* e *MRR1\_R<sub>VRC</sub>*, designadas de pFM18 e pFM19,

respetivamente. (B) Esquema do processo de integração dos genes mutados na estirpe  $\Delta 1$ . (C) Resultado da integração do gene *MRR1* em *C. parapsilosis*.

**Figura 5.** Seleção de transformantes de *C. parapsilosis* usando a cassete *SAT1-Flipper*. (A) Crescimento de células contendo a cassete de integração pFM18, apresentando resistência à nourseotricina, colónias grandes (indicadas pelas setas). (B) Seleção de transformantes após excisão da cassete com crescimento reduzido mesmo na presença de baixa concentração de nourseotricina, 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (colónias pequenas indicadas pelas setas).

**Figura 6.** Confirmação por PCR da integração dos genes *MRR1<sub>RFLC</sub>* e *MRR1<sub>RVRC</sub>* na estirpe  $\Delta 1$ . Amplificação de um fragmento com 916 bp do gene *MRR1*, com os primers MRR1\_F2A e MRR\_R3, a partir de DNA genómico dos clones selecionados, da estirpe  $\Delta 1$  ( $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ ) controlo negativo e da estirpe RI ( $\Delta mrr1/MRR1$ ) controlo positivo. M, representa o marcador de pesos moleculares de 100 bp Plus (Fermentas).

**Figura 7.** Confirmação da identidade das estirpes selecionadas para avaliação da suscetibilidade aos azóis, como *C. parapsilosis sensu stricto*, de acordo com os seus perfis de restrição do gene *SADH*. (A) Amplificação do fragmento de 716 bp do gene *SADH*, a partir do DNA genómico das estirpes Fr3-B, Fr3-C, Vr2-A e Vr2-B. (B) Restrição do gene *SADH* com a enzima *BanI*. M, representa o marcador de pesos moleculares de 100 bp Plus (Fermentas).

**Tabela 1.** Valores de CIM e fenótipos de suscetibilidade das estirpes de *C. parapsilosis*.

## INTRODUÇÃO

### Considerações Gerais

As leveduras pertencentes ao género *Candida* são fungos unicelulares, ubíquos, geralmente considerados patogêneos oportunistas<sup>1</sup>. Estas leveduras representam a quarta causa de infeções invasivas nos EUA e a oitava na Europa, com valores de mortalidade associada de 30 a 50%<sup>2,3</sup>. A nível nacional, dados provenientes de um estudo sobre fungemia realizado no Hospital S. João, Porto, mostraram que este tipo de infeções foi detetado em 3,17 dos casos por 1,000 doentes/dia. O género *Candida* foi identificado como o quarto agente mais isolado nas hemoculturas, dos quais as espécies mais prevalentes foram: *C. albicans* (35%), *C. parapsilosis* (25,6%) e *C. tropicalis* (12,8%)<sup>4</sup>.

Estas leveduras colonizam o homem, na pele e mucosas (trato respiratório superior, trato gastrointestinal, cavidade oral ou vaginal), sem causar qualquer dano (comensais). No entanto, por desequilíbrio do sistema imunológico, podem tornar-se patogénicas, provocando candidíases que vão desde infeções superficiais de mucosas, como as vulvovaginais ou candidíases orofaríngeas, até infeções sistémicas, do sangue e do líquido cefalorraquidiano (locais normalmente estéreis)<sup>5-7</sup>.

Dentro do grupo de risco encontram-se indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente indivíduos infetados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH), doentes neoplásicos ou transplantados, sujeitos a quimioterapia e/ou terapia imunossupressora, assim como pacientes não imunocomprometidos, mas sujeitos a grandes cirurgias ou internados em unidades de cuidados intensivos<sup>8-10</sup>.

A incidência de infeções fúngicas invasivas têm vindo a aumentar ao longo das últimas décadas, devido ao aumento da população de risco e à profilaxia antifúngica. Por outro lado, os procedimentos médicos são cada vez mais invasivos, levando à necessidade do uso de dispositivos médicos implantados. Estes são por vezes colonizados por microrganismos, constituindo assim uma porta de entrada para colonização sistémica<sup>11,12</sup>.

## ***Candida parapsilosis***

Desde a sua descoberta, a espécie *C. parapsilosis* tem vindo a sofrer várias alterações a nível da sua classificação filogenética. Em 1928 foi isolada pela primeira vez de um indivíduo com diarreia em Porto Rico, tendo sido classificada por *Monilia parapsilosis* (como espécie do género *Monilia*, por ser incapaz de fermentar maltose)<sup>13,14</sup>. Alguns anos mais tarde, em 1932, foi designada de *C. parapsilosis*, até que em 2005 esta espécie foi subdividida em 3 espécies distintas: *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida methapsilosis*. Apesar de estas espécies apresentarem características fenotípicas e bioquímicas idênticas, a sua reclassificação ocorreu após a sequenciação de grandes frações dos seus genomas, a qual demonstrou a existência de diferenças significativas. No entanto, *C. parapsilosis* é responsável pela maior incidência de infeções hospitalares<sup>15</sup>.

Comparativamente a outras espécies do género *Candida*, *C. parapsilosis* apresenta uma distribuição ubíqua. Ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis*, esta espécie não é um patogéneo humano obrigatório, tendo vindo a ser isolada de diversas fontes como, solo, ambientes marinhos, insetos e animais domésticos<sup>16</sup>.

Morfologicamente, *C. parapsilosis* apresenta células de diversas formas, ovais, redondas e cilíndricas, podendo as colónias serem lisas ou rugosas, mas sempre de cor branca<sup>17</sup>. Ao contrário de *C. albicans*, que apresenta vários estados morfogénicos, *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, mas sim pseudo-hifas. Esta espécie também se encontra em forma de levedura, estando o fenótipo das colónias dependente da forma das células<sup>18</sup>.

*C. parapsilosis* é um organismo comensal do homem, estando a sua patogenicidade limitada pela pele intata. Esta espécie apresenta diversos fatores de virulência, entre eles, a capacidade de adesão às células dos hospedeiros, a produção de enzimas hidrolíticas (lípases, protéases) e a formação de biofilmes<sup>19-21</sup>.

A incidência de *C. parapsilosis* tem vindo a aumentar ao longo da última década. A infeção por *C. parapsilosis* pode ocorrer sem pré-colonização sendo frequentemente transmitida horizontalmente, através de vetores externos como, predominantemente o contato com as mãos dos prestadores de cuidados de saúde, aparelhos e dispositivos médicos (catéteres, dispositivos médicos implantados, próteses), fluídos, entre outros<sup>22,23</sup>.

O maior grupo de risco de infeção nosocomial por *C. parapsilosis* são os neonatos de baixo peso. A colonização por esta levedura na pele e no trato gastrointestinal dos neonatos é

frequentemente um primeiro passo para uma candidíase invasiva<sup>24</sup>. Este grupo está especialmente apto a desenvolver doença, pois a integridade da pele muitas vezes está comprometida, o trato gastrointestinal é mais suscetível a infecções e o uso prolongado de catéteres venosos centrais e intubação endotraqueal, aumentam a probabilidade de infecção por *C. parapsilosis*<sup>25</sup>. Também indivíduos imunocomprometidos como os infetados com o VIH, indivíduos sujeitos a cirurgias, particularmente cirurgias ao trato gastrointestinal, indivíduos transplantados e indivíduos a receber nutrição parenteral apresentam um risco acrescido de infecção por *C. parapsilosis*<sup>26</sup>.

## Terapia Antifúngica

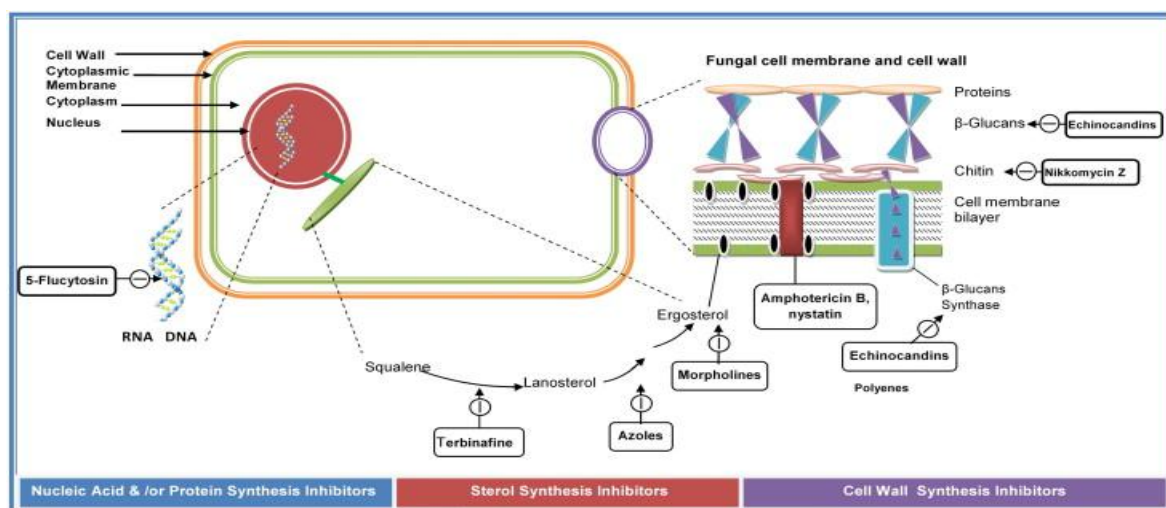
Hoje em dia, e apesar da pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, estão disponíveis apenas algumas classes de agentes antimicóticos para o tratamento de infecções fúngicas<sup>27</sup>. Na verdade apenas 4 classes de antifúngicos são utilizados na prática clínica, para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, incluindo infecções por *C. parapsilosis*, com diferentes modos de ação e largo espectro (**Figura 1.**).

Dentro da enorme classe dos polienos, apenas 3 possuem a toxicidade permitida na prática clínica (anfotericina B, nistatina e natamicina). O membro desta classe mais utilizado na clínica é a anfotericina B<sup>28</sup>. A sua estrutura anfífilica interage com o ergosterol das células fúngicas, através da sua ligação à bicamada lipídica, formando poros na membrana celular, permitindo assim a passagem de componentes intracelulares, tais como iões de potássio (K<sup>+</sup>) para o meio extracelular. O resultado desta interação é a alteração drástica da permeabilidade celular, levando à lise das células<sup>29-31</sup>.

No grupo das fluoropirimidinas, apenas a 5-fluorocitosina (5-FC) e a 5-fluorouracil (5-FU) são usadas na prática clínica no tratamento de infecções por leveduras patogénicas (*Candida* e *Cryptococcus spp.*) sendo maioritariamente utilizadas em terapia combinada com polienos ou azóis<sup>32</sup>. Estes agentes entram nas células fúngicas através de transportadores específicos, as citosina permeases, sendo posteriormente convertidos em 5-fluorouridina monofosfato por ação das enzimas citosina desaminases e fosforibosiltransferases. Destas conversões resulta a produção de RNA aberrante e a inibição da principal enzima envolvida na síntese de DNA, inibindo a replicação celular<sup>33,34</sup>.

As equinocandinas inibem especificamente a síntese de parede celular. Deste grupo, apenas 3 antifúngicos estão aprovados para o tratamento de infecções fúngicas, a caspofungina, micafungina e anidulafungina. As moléculas destes compostos são derivados sintéticos de lipopeptídeos. A ação dos agentes desta classe incide na inibição da enzima  $\beta$ -1,3-glucano sintetase, enzima envolvida na síntese da parede celular fúngica, através da polimerização da glucose uridina difosfato em  $\beta$  1,3-glucano. O  $\beta$  1,3-glucano é um dos principais componentes estruturais da célula responsáveis pela manutenção da integridade e rigidez da parede celular dos fungos<sup>35,36</sup>.

Por último, a classe dos agentes azólicos é de longe a mais utilizada na prática clínica. O fluconazol (FLC), voriconazol (VRC) e posaconazol (PSC) são alguns dos exemplos de azóis pertencentes a esta classe. Estes têm como alvo a via biossintética do ergosterol através da inibição direta da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, resultando na quebra da síntese do ergosterol e na acumulação de esteróis metilados tóxicos no interior da célula<sup>37,38</sup>.



**Figura 1.** Alvos das diferentes classes de agentes antifúngicos, utilizados na terapia clínica. Retirado de Kathiravan *et al.*<sup>27</sup>.

## Mecanismos de Resistência

Como todas as populações de microrganismos, as leveduras são organismos adaptáveis a condições de *stress*. Quando lhes é imposta uma pressão seletiva, como seja a exposição a um antifúngico, estas desencadeiam mecanismos de modo a superar o *stress* causado. O desenvolvimento de resistência antifúngica deriva de alterações genéticas que codificam para a resistência<sup>39</sup>.



A aquisição de resistência antifúngica destina-se a neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos das diferentes classes de antifúngicos, o que é conseguido através da: i) redução da acumulação do fármaco no interior da célula fúngica; ii) diminuição da afinidade do antifúngico à proteína alvo; iii) alteração no metabolismo (**Tabela 1.**)<sup>40</sup>.

A aquisição de resistência aos polienos é rara, pois este antifúngico possui baixa solubilidade e elevada toxicidade no hospedeiro, o que limita a sua utilização na terapia antifúngica a longo prazo. Os mecanismos de resistência desta classe ainda não estão estudados/descritos pela comunidade científica, mas admitem-se várias hipóteses como: alteração dos esteróis da membrana celular, defesa contra danos oxidativos, mutações nos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, como o gene *ERG3* e *ERG6*, e alteração do rácio fosfolípido dos esteróis<sup>41</sup>.

Vários mecanismos como, mutações que causem a quebra ou diminuição no importe do fármaco ou na sua conversão intracelular são frequentemente responsáveis pela resistência às fluoropirimidinas, um fenómeno muito comum<sup>42</sup>. O mecanismo de resistência mais frequente é uma mutação no gene *FUR1*, que codifica para a enzima responsável pela conversão intracelular da 5-FU em metabolitos capazes de integrar o metabolismo da citosina. A mutação neste gene resulta na resistência dos fungos aos fármacos 5-FC e 5-FU. Outra mutação frequentemente associada apenas à resistência da 5-FC é uma mutação no gene *FCY1*, que codifica para a citosina desaminase, responsável pela conversão de 5-FC em 5- fluorouridina monofosfato, desregulando a via biossintética das pirimidinas<sup>43,44</sup>.

**Tabela 1.** Natureza, alvo celular, modo de ação e mecanismos de resistência a alguns dos antifúngicos mais utilizados na terapia clínica.

Agente Antifúngico	Modo de ação	Mecanismo de resistência
Polienos	Ligação ao ergosterol	Várias hipóteses mas sem confirmação
Fluoropirimidinas	Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Mutações ou inibição das enzimas implicadas no metabolismo de 5-Fluorocitosina Desregulação da via biossintética das pirimidinas
Equinocandinas	Inibição da $\beta$ -1,3 glucano sintetase	Alteração da afinidade das equinocandinas pela $\beta$ -1,3-glucano sintetase
Azóis	Inibição da função do citocromo p450	Alterações da via biossintética do ergosterol Mutações pontuais do gene <i>ERG11</i> Sobre-expressão do gene <i>ERG11</i> Sobre-expressão de transportadores membranares de efluxo

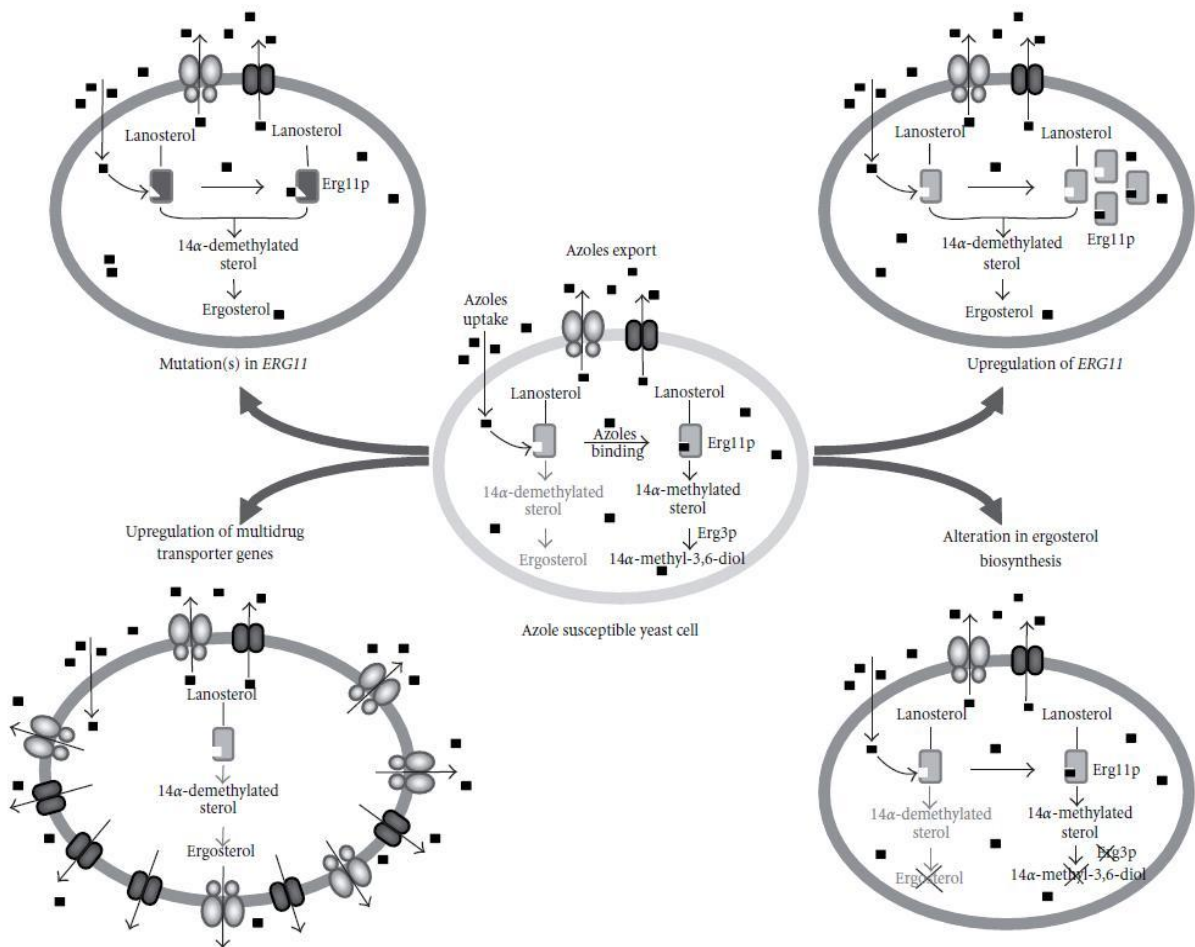
Embora a utilização na clínica das equinocandinas seja recente, já se encontram descritas resistências a este fármaco. O mecanismo de resistência mais amplamente descrito são as mutações no gene *FKS1*, que codifica para a subunidade catalítica do complexo  $\beta$ -1,3-glucano sintetase (alvo das equinocandinas). Estas mutações encontram-se em duas regiões *hot-spot* distintas do gene. A primeira região *hot-spot* engloba os aminoácidos entre as posições 641-648, com o aminoácido serina (S) na posição 645 (S645) a desempenhar um papel particularmente importante na resistência. As mutações neste aminoácido para prolina (S645P), fenilalanina (S645F) e tirosina (S645Y) são as mutações mais prevalentes em *C. albicans* correlacionadas com o aumento da resistência a este fármaco. A segunda região *hot-spot* do gene *FKS1* corresponde aos aminoácidos entre 1345-1365, sendo que estudos em *S. cerevisiae* identificaram uma mutação de arginina (R) para serina (S) no aminoácido 1357 (R1357S), responsável pelo aumento da resistência às equinocandinas<sup>45-47</sup>. Recentemente, o aumento compensatório da produção de quitina, polissacarídeo constituinte da parede celular, foi proposto como mecanismo que diminui a eficácia das equinocandinas<sup>48</sup>.

A classe dos antifúngicos azólicos é de longe a mais utilizada na clínica e portanto a mais investigada. Relativamente aos mecanismos de resistência aos azóis, a grande maioria dos estudos realizados envolveu o conhecimento dos mecanismos de resistência em *C. albicans*. Assim, e para esta espécie, estão descritos até agora vários mecanismos: i) alterações na via metabólica do ergosterol; ii) mutações pontuais no gene *ERG11*; iii) sobre-expressão do gene *ERG11*; iv) sobre-expressão de transportadores membranares de efluxo (**Figura 2.**)<sup>49,50</sup>.

Em leveduras do género *Candida* o alvo dos agentes azólicos é a proteína *Erg11*. Esta proteína participa na biossíntese do ergosterol, principal esteroide das membranas das células dos fungos. A *Erg11* é uma lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, que catalisa a demetilação da lanosterol 14 $\alpha$  para formar 4,4''-dimetil colest-8,14,24-trieno-3-beta-ol. Membro da família do citocromo p450, a *Erg11p* é uma hemoproteína que tem o átomo de ferro como grupo prostético, cuja função é fixar duas moléculas de oxigénio, necessário para a atividade enzimática<sup>37,51</sup>.

A inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, pelos antifúngicos azólicos não só resulta na inibição da via biossintética do ergosterol, como também na acumulação de 14 $\alpha$ -metilergosta-8,24-dieno-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (14 $\alpha$ -metil-3,6-diol) um esteroide metilado que inibe o crescimento das células fúngicas. As alterações nesta via biossintética, que têm como objetivo evitar a acumulação deste esteroide inibidor do crescimento celular na presença de azóis, constitui um dos mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos. Este mecanismo passa

pela inativação da enzima esterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase (codificada pelo gene *ERG3*) que atua a jusante da lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase na via biossintética do ergosterol, convertendo 14 $\alpha$ -metilfecosterol em 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol. Como o esterol 14 $\alpha$ -metilfecosterol é capaz de suportar o crescimento da célula fúngica e 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol é tóxico para a célula, a inativação da esterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturase promove a resistência aos azóis<sup>52,53</sup>.



**Figura 2.** Mecanismos de resistência aos compostos azólicos em *C. albicans*. Retirado de Vandeputte *et al.*<sup>40</sup>.

As mutações no gene *ERG11* conferem resistência aos azóis pela diminuição da afinidade de ligação do fármaco. Estas mutações não se encontram aleatoriamente distribuídas ao longo do gene *ERG11* (1587 bp, que codificam para 595 aminoácidos) mas estão preferencialmente localizadas em três regiões *hot-spot*. Uma das regiões *hot-spot* do gene *ERG11* situa-se entre os aminoácidos 105 e 165, que compreende o segmento N-

terminal da proteína, enrolado em hélice. Este forma um canal que permite aos substratos, e possivelmente aos antifúngicos, alcançar o local com ação catalítica. As outras duas regiões *hot-spot* encontram-se em locais da proteína (aminoácidos 266 a 287 e aminoácidos 405 a 488) importantes para a fixação do grupo heme. A substituição de aminoácidos resulta na diminuição da afinidade de ligação do antifúngico à proteína, dificultando o acesso ou impedindo a coordenação do antifúngico ao grupo heme. No entanto, algumas das mutações identificadas não têm qualquer impacto na resistência, constituindo apenas um polimorfismo genético natural<sup>54,55</sup>.

A expressão do gene *ERG11* é regulada pelo fator de transcrição *Upc2*. Em resposta aos agentes azólicos, foram detetadas mutações no gene *UPC2*, através da alteração aminoacídica de glicina (G) na posição 648 por aspartato (D) (G648D) como também de guanina por alanina (A), treonina (T) e valina (V) na posição 643 (G643A, A643T, A643V) designadas de mutações *gain-of-function*, uma vez que está demonstrado serem responsáveis pela sua hiperatividade. Esta hiperatividade conduz à ativação da expressão do gene *ERG11*. A sobre-expressão do *ERG11* reduz significativamente o efeito antifúngico nas células, diminuindo a sua suscetibilidade<sup>55-57</sup>.

O mecanismo mais descrito como responsável pela resistência aos azóis em *C. albicans* é a ativação de genes que codificam para bombas de efluxo. Estas bombas de efluxo exportam o antifúngico do meio intracelular para o meio extracelular, reduzindo assim a sua concentração intracelular. Duas famílias de transportadores membranares de efluxo podem ser distinguidas em leveduras, de acordo com a fonte de energia utilizada para a extrusão de substratos<sup>58</sup>.

As bombas pertencentes à superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) são codificadas pelos genes *CDR1* e *CDR2* (*Candida Drug Resistance*). Estas contêm dois domínios transmembranares e dois domínios nucleotídicos de ligação, utilizando a hidrólise de ATP para encaminhar os substratos através da membrana. A expressão dos genes *CDR1* e *CDR2* é regulada pelo fator de transcrição *Tac1* (*Transcriptional Activator of CDR genes*). A hiperativação do fator de transcrição *Tac1* é conferida por mutações *gain-of-function* que conseqüentemente promovem a sobre-expressão dos genes *CDR1* e *CDR2*. Até hoje foram descritas 15 mutações em 12 locais diferentes do fator de transcrição<sup>59-61</sup>.

As bombas pertencentes à superfamília MF (*Major Facilitator*) são transportadores membranares de efluxo codificadas por um único gene *MDR1* (*Multi Drug Resistance 1*). A bomba de efluxo codificada pelo gene *MDR1* possui 12 domínios transmembranares e utiliza

um gradiente eletroquímico de prótons como força motriz para efetuar a extrusão de substratos, estando especificamente envolvida na resistência ao fluconazol. A expressão do gene *MDR1* é regulada por pelo menos por 3 fatores de transcrição, entre eles, o mais descrito, o fator de transcrição *Mrr1* (*Multidrug Resistance Regulator 1*), o fator de transcrição bZIP *Cap1*, também envolvido na resposta a *stresses* oxidativos, e o fator de transcrição *Mcm1*, envolvido numa grande variedade de processos celulares e co-regulador do fator *Cap1*<sup>62,63</sup>.

A hiperativação do fator *Mrr1* é conferida por mutações pontuais. Está descrita a existência de 4 locais *hot-spot* para mutações *gain-of-function* no fator de transcrição *Mrr1* na espécie *C. albicans*. O primeiro local situa-se entre os aminoácidos 335 e 381 onde estão descritas 4 mutações, um segundo local com 5 mutações relativamente pequeno entre os aminoácidos 873 e 896. Por último, duas mutações localizadas nos aminoácidos 997 e 998 completam os locais *hot-spot* de mutações neste fator de transcrição<sup>64,65</sup>. Também estão descritas mutações nos locais 683, 803. A sequenciação do gene *MRR1* em *C. dubliniensis*, a espécie fúngica mais próxima de *C. albicans*, permitiu a identificação de 5 mutações, posteriormente identificadas como sendo *gain-of-function*, onde uma das quais é idêntica à previamente encontrada em *C. albicans* (**Tabela 2.**)<sup>66</sup>.

**Tabela 2.** Localização das mutações *gain-of-function*, identificadas no fator de transcrição *Mrr1* nas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Mutações	Espécie
K335N   Q350L   T360I   T381I - T374I	<i>C. albicans</i> - <i>C. dubliniensis</i>
S595Y	<i>C. dubliniensis</i>
P683S   P683 H	<i>C. albicans</i>
N803D	<i>C. albicans</i>
C866Y	<i>C. dubliniensis</i>
R873T   G878E   A880E   W893R   T896I	<i>C. albicans</i>
T985Δ	<i>C. dubliniensis</i>
G997V	<i>C. albicans</i>
L998F	<i>C. albicans</i>
[D987- I998]Δ	<i>C. dubliniensis</i>

Durante o tratamento prolongado com antifúngico ocorre frequentemente o aparecimento sequencial de diferentes mecanismos de resistência, que atuam em sinergismo originando o desenvolvimento de estirpes altamente resistentes aos azóis<sup>67</sup>.

O desenvolvimento de resistência antifúngica aos azóis é frequente por duas razões: i) os azóis são fármacos fungistáticos e não fungicidas, podendo deixar grandes populações de células expostas a uma elevada pressão direcional para a resistência; ii) devido aos vários e diferentes mecanismos de resistência inerentes às próprias espécies fúngicas, em que a taxa de mutações a fim de obterem um fenótipo de resistência é muito elevada<sup>39</sup>.

## Caso de Estudo

A aquisição de resistência por leveduras patogénicas a agentes antifúngicos, particularmente após exposições prolongadas, é um fenómeno bem conhecido em fungos<sup>68</sup>.

Um estudo recente de Silva *et al.*<sup>69</sup> demonstrou que tal como em *C. albicans*, a aquisição de resistência aos antifúngicos azólicos por *C. parapsilosis* poderá envolver a ativação de bombas de efluxo, através da sobre-expressão do gene *MDR1*.

De modo a perceber os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de resistência aos azóis em *C. parapsilosis*, um isolado clínico suscetível (BC014) foi exposto *in vitro* e separadamente a concentrações serológicas de 3 agentes azólicos: fluconazol, voriconazol e posaconazol. Esta exposição foi prolongada até a obtenção de estirpes resistentes para cada um dos antifúngicos, tendo o ensaio decorrido durante um período máximo de 60 dias. As estirpes resistentes resultantes da exposição ao FLC e VRC, BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>, respetivamente, desenvolveram resistência cruzada entre si, enquanto a estirpe incubada na presença de PSC desenvolveu resistência cruzada aos três azóis.

A análise comparativa do transcriptoma das 3 estirpes resistentes aos azóis com a estirpe suscetível que lhe deu origem, permitiu apontar como mecanismo de aquisição de resistência ao fluconazol e ao voriconazol a sobre-expressão do gene *MDR1* e do fator de transcrição responsável pela sua transcrição, o *Mrr1*. Como referido anteriormente, em *C. albicans* a sobre-expressão dos genes ligados à resistência antifúngica está frequentemente associada à hiperatividade dos fatores de transcrição que regulam a sua expressão. Para esta hiperatividade contribuem mutações descritas como *gain-of-function*. No sentido de se perceber se a sobre-expressão do fator de transcrição *MRR1* em *C. parapsilosis* estava relacionada com o aparecimento de mutações, a sequência nucleotídica deste fator de

transcrição foi sequenciada nas 2 estirpes resistentes BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>. Na estirpe BC014R<sub>FLC</sub>, a substituição da base guanina (G) na posição 1747 por adenina (A) (G1747A) na sequência nucleotídica do gene *MRR1*, resulta na substituição do aminoácido 583 na cadeia polipeptídica, de uma glicina para uma arginina (G583R). Na estirpe BC014R<sub>VRC</sub> a mutação ocorreu na posição 2619 da cadeia nucleotídica, onde a A foi substituída por uma citosina (C) (A2619C), resultando numa alteração aminoacídica de lisina para asparagina (K873N).

Os resultados deste estudo demonstraram que os mecanismos de resistência aos azóis em *C. parapsilosis* são idênticos aos já descritos para *C. albicans*. Estes mecanismos podem envolver a sobre-expressão do gene *MDR1*, resultante da hiperatividade do fator de transcrição *Mrr1*, que pode estar relacionada com mutações pontuais encontradas.

## **OBJETIVO**

Este trabalho tem como principal objetivo determinar a importância das mutações pontuais do gene *MRR1*, ocorridas na estirpe clínica de *C. parapsilosis* BC014 após indução de resistência ao fluconazol e ao voriconazol (BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>), na resistência aos azóis.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estirpes e Condições de Crescimento

As estirpes de *Candida parapsilosis* utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas por Ana Silva, do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina, da Universidade do Porto e por Geraldine Butler da *School of Biomolecular and Biomedical Science of University College Dublin*, Irlanda. A estirpe clínica suscetível de *C. parapsilosis*, assim como as estirpes induzidas ao fluconazol e voriconazol foram previamente designadas por BC014, BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>, respetivamente<sup>68</sup>. As estirpes de *C. parapsilosis* cedidas pela Prof. Geraldine Butler correspondem a uma estirpe em que o gene *MRR1* se encontra deletado nos dois alelos ( $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ ), designada por  $\Delta 1$ , e outra onde o gene *MRR1* foi reintegrado apenas num dos alelos do genoma designada de RI (*MRR1*/ $\Delta mrr1$ ).

As estirpes de *C. parapsilosis* foram cultivadas rotineiramente em caldo *Yeast Peptone Dextrose* líquido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%) (YPD) a 30°C com agitação, ou YPD agar (agar 2%). Para seleção dos transformantes o meio YPD agar foi suplementado com nourseotricina (Nou; Werner Bioagents, Jena, Germany) na concentração final de 200 µg ml<sup>-1</sup>. Para efetuar a excisão da cassete *SAT1*, os transformantes cresceram em meio *Yeast Peptone Maltose* líquido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, maltose 2%) (YPM) a 30°C com agitação, durante a noite. Apartir desta cultura foram plaqueadas aproximadamente 100 células em YPD agar suplementado com Nou na concentração final de 20 µg ml<sup>-1</sup>. As estirpes de *C. parapsilosis* transformadas e não-transformadas foram guardadas em meio YPD com 40% de glicerol, a -80°C.

Neste estudo foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , para as clonagens e extração de DNA plasmídico. Estas bactérias cresceram rotineiramente a 37°C, em meio LB líquido (extrato de levedura 1%, bacto-triptona 2%, NaCl 2%) (Difco Laboratories) ou em meio LB agar (LB agar 2%) (Difco Laboratories). Nas manipulações de DNA, os transformantes de DH5 $\alpha$  cresceram em meio LB líquido ou LB agar suplementado com Cloranfenicol (Clo; Sigma) na concentração final de 25 mg ml<sup>-1</sup>. As estirpes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , assim como todas as estirpes resultantes da transformação com DNA plasmídico, foram mantidas a -80°C em meio LB com 20% de glicerol, até posterior utilização.



## Antifúngicos

Os antifúngicos fluconazol (FLC; Pfizer, Groton, CT) e voriconazol (VRC; Pfizer, New York, NY) foram fornecidos pelos respectivos fabricantes. Os solventes utilizados na preparação de soluções *stock* de FLC (2,000 µg ml<sup>-1</sup>) e VRC (1,600 µg ml<sup>-1</sup>) foram água destilada estéril e dimetil sulfoxido (DMSO; Merck), respectivamente. As soluções *stock* de antifúngicos, foram mantidas a -70°C até posterior utilização e todas as diluições posteriores para preparação das diferentes concentrações dos antifúngicos foram realizadas em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; Sigma) tamponado a pH 7.0 com 0.165 M de ácido propanosulfônico morfolino (MOPS; Sigma).

## Preparação de Células Competentes de *E. coli*

A partir de uma cultura de *E. coli* DH5α incubada durante a noite a 37°C com agitação, inoculou-se 5 ml de meio LB. Após ter atingido a densidade ótica (DO<sub>550nm</sub>) de 0.3, aproximadamente 4 ml da cultura foi repicada para 100 ml de LB, e incubada nas mesmas condições até atingir a mesma DO<sub>550nm</sub>. Posteriormente, a cultura foi colocada em gelo durante 5 minutos. Após centrifugação a 1,700 *g* durante 5 minutos, à temperatura de 4°C, as células foram recolhidas e gentilmente ressuspensas em 40 ml de solução TFBI (KOAc 30mM, MnCl<sub>2</sub> 50mM, RbCl<sub>2</sub> 100mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, glicerol 15%) fria. Depois de recolhidas a 665 *g* durante 5 minutos a 4°C, as células foram novamente ressuspensas em 5 ml de solução TFBII (NaMOPS 10mM pH 7.0, CaCl<sub>2</sub> 75mM, RbCl<sub>2</sub> 10mM, glicerol 15%) frio. Tendo o cuidado de a manter em gelo, a suspensão celular foi dividida em alíquotas de 200 µl, as quais foram imediatamente guardadas a -80°C até posterior utilização.

## Extração de DNA Plasmídico de *E. coli* (1)

O plasmídeo pCD8<sup>70</sup> e os vários plasmídeos obtidos nas clonagens ao longo do trabalho desenvolvido, foram extraídos de *E. coli* DH5α, de acordo com o protocolo descrito nos seguintes *kits*, QIAquick Plasmid Mini (Quiagen) e NZYMiniprep (NZYtech).

## **Eletroforese de DNA**

Os géis de agarose foram preparados a diferentes percentagens (0.5 a 0.8%) usando agarose “Ultra Pure Grade” (NZYtech) dissolvida em tampão TAE 1x (Tris 0.04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM pH 8), onde foi incorporado brometo de etídeo (0.02 µg ml<sup>-1</sup>). As amostras de DNA foram preparadas adicionando tampão de carregamento na concentração final de 1x (azul de bromofenol 0.25%, xilenocianol 0.25%, glicerol 30%). As eletroforeses decorreram a 80 V (Power Pac Basic, Bio-Rad) num sistema de eletroforese horizontal (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad). Após conclusão da corrida eletroforética, o DNA foi visualizado no sistema Chemi Doc XRS (Bio-Rad) e a imagem foi capturada através do software Image Lab (Bio-Rad).

## **Restrição do DNA Plasmídico**

O DNA plasmídico (5 µg) foi cortado com 5 U da respetiva endonuclease de restrição, durante 16 horas a 37°C, numa reação de 20 µl. As enzimas de restrição e os respetivos tampões foram adquiridos à empresa Fermentas e utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante. As digestões foram confirmadas após eletroforese de pequenas porções da reação em gel de agarose. O plasmídeo linearizado foi purificado usando o *kit* QIAquick Nucleotide Removal (Quiagen) e de acordo com o protocolo descrito no kit.

Para diferenciar os clones positivos dos negativos, após a clonagem de um fragmento de DNA, foram realizadas reações de restrição. Após a extração de DNA plasmídico, descrito abaixo [**Extração de DNA Plasmídico de *E. coli* (2)**] este foi digerido com enzimas de restrição específicas de forma a obter uma confirmação da inserção do fragmento no vetor.

## **Desfosforilação do DNA Plasmídico**

Os vetores de DNA foram tratados com fosfatase alcalina (Roche), para tal prepararam-se reações com 2 µg do vetor previamente cortado ao qual foi adicionado 2 U de fosfatase alcalina (Roche) e 2 µl de tampão de desfosforilação 10x (Tris-HCl 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 8.5). O volume final da reação foi de 20 µl, que foi ajustado com água *milliQ*. As reações de desfosforilação foram incubadas a 37°C durante 1 hora, seguidas da inativação da enzima a 65°C por 10 minutos.

## Ligação de DNA - Vetor e Fragmentos/Gene

A ligação do vetor com o fragmento ou gene *MRR1* ocorreu mediado pela enzima T4 DNA Ligase (Fermentas). Assim da reação de ligação constam os seguintes componentes: 30-60 pmol do vetor de DNA, 90-180 pmol de fragmento de DNA, tampão da ligase 1x (Tris-HCl 250 mM pH7.6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, polietileno glicol-8000 25%) e 5 U de T4 DNA Ligase. O volume final da reação foi ajustado com água *milliQ*. As ligações ocorreram a 22°C durante 1 hora, seguidas da inativação da enzima a 70°C por 5 minutos.

## Transformação de *E. coli* com DNA Plasmídico

Células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (200  $\mu$ l) foram incubadas com 5  $\mu$ l das amostras da ligação, durante 30 minutos em gelo. O mesmo volume de células competentes foi incubado nas mesmas condições, mas na ausência de DNA (controlo negativo). De seguida, a suspensão celular foi sujeita a um choque térmico, a 42°C durante 90 segundos, tendo sido imediatamente colocada em gelo por 2 minutos. Previamente à incubação a 37°C com agitação durante 1 hora foi adicionado a cada amostra 800  $\mu$ l de meio SOC (bacto-triptona 2%, extrato de levedura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, glucose 2.0 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). As células foram posteriormente centrifugadas a 660 *g* durante 1 minuto à temperatura ambiente. A suspensão celular foi ressuspensa em cerca de 50  $\mu$ l de sobrenadante e plaqueada em LB agar suplementado com Clo na concentração final de 25 mg ml<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 37°C durante cerca de 16 horas.

## Extração de DNA Plasmídico de *E. coli* (2)

A extração de DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  foi realizada a partir de uma cultura inoculada com uma colónia transformada com o plasmídeo de interesse, incubada a 37°C durante aproximadamente 16 horas, em meio LB agar suplementado com Clo (25 mg ml<sup>-1</sup>). As células foram separadas por centrifugação a 18,000 *g* à temperatura ambiente durante 5 minutos. Depois de desprezar o sobrenadante procedeu-se a nova centrifugação de forma a retirar o excesso de sobrenadante. Após lavagem com 1 ml de Solução I (Glucose 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0), as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ l de Solução I. A esta suspensão foi adicionado 200  $\mu$ l da Solução II (NaOH 0.2 M, SDS 1%) e 150  $\mu$ l da Solução III (fria) (Acetato de Potássio 3 M pH 5.0). Procedeu-se à mistura por inversão. Após incubação em gelo por 5 minutos, centrifugou-se a amostra a 18,000 *g* durante 10 minutos à

temperatura de 4°C. O sobrenadante ( $\approx 400 \mu\text{l}$ ) foi separado para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 0.7 volumes de isopropanol. Depois de incubar à temperatura ambiente por 10 minutos, o DNA plasmídico foi recolhido por centrifugação a 18,000 *g* durante 10 minutos à temperatura de 10°C. Após lavagem com 1 ml de etanol 70% (frio) o DNA plasmídico foi ressuspense em 20  $\mu\text{l}$  de água estéril.

### **Extração de DNA Genómico de *C. parapsilosis***

A extração de DNA genómico de *C. parapsilosis* foi efetuada pelo método descrito por Hoffman e Winston<sup>71</sup>, com algumas adaptações. Centrifugou-se 15 ml de cultura com uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  entre 1 e 2, a 1,700 *g*, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, as células foram lavadas com 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  *milliQ* estéril e resuspensas em 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM pH8), ao qual foi adicionado 0.3 g de esferas de vidro (diâmetro entre 0.45 e 0.52 mm; Sigma, St. Louis, MO) e 200  $\mu\text{l}$  de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1; Fluka Biochemika). A mistura foi sonicada por períodos de 30 segundos, intercalados com períodos de incubação em gelo (30 segundos), por um periodo total de 10 minutos. Ao lisado celular foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0). Procedeu-se a uma centrifugação a 18,000 *g*, durante 5 minutos a 4°C. A camada aquosa foi transferida para um novo microtubo contendo 1 ml de etanol absoluto (100%) e misturada por inversão. Os ácidos nucleicos foram separados após centrifugação a 20,000 *g* a 4°C durante 20 minutos e ressuspensos em 200  $\mu\text{l}$  de TE e 2  $\mu\text{l}$  de RNase (10 mg  $\text{ml}^{-1}$ ; Sigma). O RNA foi degradado após incubação a 37°C durante 1 hora. Para precipitar o DNA foi adicionado 0.1 volumes de acetato de amónio 4 M e 3 volumes de etanol absoluto (100%). Após 1 hora de incubação a -80°C, o DNA foi recolhido a 20,000 *g* durante 20 minutos a 4°C. De seguida o DNA foi lavado com etanol 70% e seco a 37°C. Por último, foi ressuspendido em 50  $\mu\text{l}$  de tampão TE. A concentração e qualidade do DNA foi avaliada por espectrofotometria ( $A_{260}/A_{280}$ ) no NanoDrop.

Também foi realizada extração de DNA genómico de *C. parapsilosis* pelo método proposto por Harju *et al.*<sup>72</sup>. Recolheram-se as células por centrifugação a 20,000 *g* durante 5 minutos, apartir de um volume de cultura de 1.5 ml. As células foram ressuspensas em 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0). Após o congelamento da suspensão celular a -80°C esta foi imediatamente imersa num banho a 95°C durante 1 minuto. O processo foi repetido novamente, e os tubos vortexados vigorosamente durante 30 segundos. À mistura foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de

clorofórmio (Sigma) tendo sido, em seguida, vortexada durante 2 minutos. Após centrifugação por 3 minutos à temperatura ambiente a 20,000 *g*, a fase aquosa foi transferida para um tubo com 400 µl de etanol absoluto frio precipitando durante 5 minutos a -20°C. Após centrifugação a 20,000 *g* durante 5 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se à lavagem dos ácidos nucleicos com 0.5 ml de etanol 70%, Para eliminar o RNA, a amostra foi ressuspensa em 50 µl de água *milliQ* estéril e 10 µl de RNase de 1 mg ml<sup>-1</sup> (Fermentas) e incubada a 22°C durante 1 hora. A concentração e qualidade do DNA genômico foram medidas por espectrofotometria ( $A_{260}/A_{280}$ ).

## Construção dos Plasmídeos

Os oligonucleótidos usados ao longo do trabalho foram desenhados no programa Oligo Explorer e encontram-se listados na **Tabela 1**.

A sequência do gene *MRR1* de *C. parapsilosis* foi obtida a partir do projeto de sequenciação do genoma de *C. parapsilosis* (<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis/>).

**Tabela 1.** *Primers* utilizados neste estudo.

<b>Nome do <i>Primer</i></b>	<b>Sequência do <i>Primer</i> (5' a 3')</b>
paraMRR1_up_F2	CCCCGCGGCTACTGATATGCCTGACGCCAC
paraMRR1_up_R	GGGGGGCCCTCTCTCTTATTGAAAACAAGAAAGC
paraMRR1_down_F	CCGCGGTAACCTAGCGAATAGAAAATATGGT
paraMRR1_down_R	GGGGAGCTCTCTCTTATTGAAAACAAGAAAGC
MRR1_F2 A	CCCTTTCTTCCGCAGATTTTC
MRR_R3	ACTTGAACGAAATGGAGACC
SADH_F	GTTGATGCTGTTGGATTGT
SADH_R	CAATGCCAAATCTCCCAA

O plasmídeo pCD8 adaptado para *C. parapsilosis*, gentilmente cedido pela Prof. Geraldine Butler, contém o gene de resistência à Nou - SAT1 (*SAT1*)<sup>73</sup>. Este plasmídeo foi usado para construir a cassette de disrupção do gene de *MRR1*, assim como a cassette de complementação do mesmo gene.

Para construir a cassette de disrupção (pFM17) foi amplificado, por PCR, a partir de DNA genómico de *C. parapsilosis* BC014, as sequências *downstream* (510 bp) e *upstream* (457 bp) do gene *MRR1*, com os *primers* paraMRR1\_up\_F2 e paraMRR1\_up\_R e paraMRR1\_down\_F e paraMRR1\_down\_R, respetivamente (**Tabela 1.**).

A reação de amplificação da sequência *downstream e upstream* (**Tabela 2.**) ocorreu num aparelho Realplex Mastercycler (Eppendorf, Madrid, Espanha) com o seguinte programa: 95°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C, 57°C e 72°C por 30 segundos cada, e um último ciclo de 10 minutos de extensão a 72°C. Após amplificação os fragmentos de DNA foram purificados com o *kit* QIAquick PCR Purification (Quiagen) de acordo com as recomendações do fabricante.

**Tabela 2.** - Mistura para amplificação por PCR das sequências *up e downstream* do gene *MRR1*.

<b>Componentes</b>	<b>Volume na solução stock</b>	<b>Concentração final</b>
H <sub>2</sub> O <i>milliQ</i>	Ajustar a 25 µl	
Tampão (10x)	2.5 µl	1x
Mistura de dNTPs (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
<i>Primer F</i> (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
<i>Primer R</i> (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 µl	1.5 mM
DNA	1 µl	Até 500 ng
<i>Taq</i> DNA polimerase (5 U µl <sup>-1</sup> )	0.2 µl	1 U

O fragmento *MRR1\_downstream* foi posteriormente digerido com as enzimas *SacII* e *SacI* de acordo com as recomendações do fabricante e ligado ao plasmídeo pCD8. O plasmídeo foi previamente desfosforilado como descrito anteriormente. O passo seguinte foi a transformação de *E. coli* DH5α com o produto da ligação.

Após a obtenção do plasmídeo pFM7 (pCD8+*MRR1\_downstream*) foi iniciada a clonagem da sequência *upstream* (457 bp) no mesmo. As etapas para a construção do novo

plasmídeo foram as mesmas que a construção anterior, apenas os *primers* utilizados para a amplificação da sequência e as enzimas de restrição (*KpnI* e *ApaI*) foram modificadas. Desta forma foi construída a cassette de interrupção pFM17 (*MRR1\_upstream* + pCD8 + *MRR1\_downstream*). A confirmação da clonagem das *up* e *downstream* do gene *MRR1* foi obtida após sequenciação do plasmídeo pFM17.

Após a reação de restrição do plasmídeo pFM17 com enzimas *KpnI* e *SacI*, a cassette de interrupção foi extraída em gel de agarose 0.5% usando o *kit* QIAquick Gel Extraction (Quiagen).

Os plasmídeos pFM18 e pFM19 foram construídos para a reintegração do gene *MRR1* mutado, resultante da exposição ao FLC e VRC, no local original do genoma de *C. parapsilosis* BC014 ( $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ ). O gene *MRR1* e as regiões *upstream* e *downstream* foram amplificadas com os *primers* paraMRR\_up\_F2 e paraMRR\_down\_R (**Tabela 1.**) usando como molde o DNA genômico extraído das estirpes BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>. Preparou-se a reação de PCR como descrito na **Tabela 3.** para um volume final de 25  $\mu$ l.

O programa de PCR incluiu um 1° ciclo durante 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 65°C por 15 segundos e 72°C durante 5 minutos, e um último passo a 72°C por 5 minutos.

**Tabela 3.** – Mistura para amplificação por PCR do gene *MRR1* mutado, das estirpes BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>, assim como das regiões *upstream* e *downstream* do gene.

Componentes	Volume na solução <i>stock</i>	Concentração final
H <sub>2</sub> O <i>milliQ</i>	Ajustar a 25 $\mu$ l	
Primer <b>F</b> (10 $\mu$ M)	0.75 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
Primer <b>R</b> (10 $\mu$ M)	0.75 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
DNA	1 $\mu$ l	100 ng $\mu$ l <sup>-1</sup>
<i>KAPA HiFi HotStart ReadyMix</i> (2x)	12.5 $\mu$ l	1x

Posteriormente os produtos de PCR purificados, Full\_R<sub>FLC</sub> e Full\_R<sub>VRC</sub>, foram digeridos com as enzimas *SacII* e *SacI*, e clonados independentemente no plasmídeo pFM17. A confirmação da clonagem dos genes *MRR1\_R<sub>FLC</sub>* e *MRR1\_R<sub>VRC</sub>* foi obtida após sequenciação dos plasmídeos pFM18 e pFM19, respetivamente.

## Transformação por Eletroporação

A estirpe de *C. parapsilosis* foi transformada por eletroporação como descrito por Zemanova *et al.*<sup>74</sup>, com algumas modificações. Após incubação durante a noite, a cultura foi diluída para uma  $DO_{600nm}$  de 0.2 em 50 ml de YPD. Esta foi incubada a 30°C até atingir uma  $DO_{600nm}$  de aproximadamente de 2.0. As células foram posteriormente recolhidas por centrifugação a 5,000 *g* durante 10 minutos, ressuspensas em 10 ml de tampão Tris-EDTA (pH 7.5) contendo 10 mM de ditioneitol (DTT) e incubadas novamente a 30°C por 1 hora com agitação. À suspensão celular foi adicionado 40 ml de água fria. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes, primeiro com 50 ml de água fria e em seguida com 10 ml de sorbitol 1 M frio. De seguida as células foram ressuspensas em 125  $\mu$ l de sorbitol 1 M frio. Aproximadamente 1  $\mu$ g da cassette de interrupção foi misturada com 50  $\mu$ l das células competentes e transferidas para uma cuvette de eletroporação de 1 mm. A transformação ocorreu num eletroporador Gene Pulser X-cell (Bio-Rad) a 1,25 kV em tempo constante de 5 ms. Após eletroporação, 950  $\mu$ l de meio YPD contendo 1 M de sorbitol foi adicionado imediatamente e a mistura foi incubada a 30°C durante 4 horas com agitação. Por último, 100  $\mu$ l da amostra anterior foi distribuída em YPD agar suplementado com Nou numa concentração final de 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Os transformantes foram obtidos após 48 horas de incubação a 30°C.

## Amplificação e Restrição do Gene *SADH*

A identificação das estirpes manipuladas como pertencentes à espécie *C. parapsilosis*, foi realizada através da amplificação do gene *SADH* como descrito por Tavanti *et al.*<sup>15</sup>. Preparou-se a uma reação como descrita na **Tabela 4.** com os *primers* *SADH\_F* e *SADH\_R* (**Tabela 1.**), para um volume final de 25  $\mu$ l. As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C durante 30 segundos e 72°C durante mais 30 segundos, e por último um ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C. Os PCRs foram realizados num aparelho Realplex Mastercycler (Eppendorf, Madrid, Espanha).

O gene *SADH* amplificado foi digerido com a enzima *BanI* (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom) numa reação de 40  $\mu$ l de volume final, contendo 20  $\mu$ l de produto de PCR e 40 U de *BanI*. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose de 2%.



**Tabela 4.** – Mistura para amplificação por PCR do gene *SADH*.

<b>Componentes</b>	<b>Volume na solução <i>stock</i></b>	<b>Concentração final</b>
H <sub>2</sub> O <i>milliQ</i>	Ajustar a 25 µl	
Tampão (10x)	2.5 µl	1x
Mistura de dNTPs (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
<i>Primer F</i> (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
<i>Primer R</i> (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
DNA	1 µl	100 ng
<i>Taq</i> DNA polimerase (5 U µl <sup>-1</sup> )	0.2 µl	1 U

### Avaliação da Suscetibilidade

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico para cada estirpe foram determinados de acordo com protocolo M27-A3 do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)<sup>75</sup>. Após sementeira e incubação durante 16 horas em meio YPD agar, preparou-se uma suspensão celular de aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup> em tampão fosfato salino (PBS pH=7.4; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) correspondente a uma densidade celular de 0.5 MacFarland. Foram efetuadas 3 diluições seriadas em RPMI 1640 a fim de se obter uma suspensão final de 1x10<sup>3</sup> de células ml<sup>-1</sup>.

As concentrações de FLC e VRC testadas variaram de 64 a 0.125 µg ml<sup>-1</sup> e 16 a 0.03 µg ml<sup>-1</sup>, respetivamente. Foram preparadas diluições seriadas de 1:2 de FLC e VRC e dispensados 100 µl em cada poço da microplaca de poliestireno de 96 poços. De seguida adicionou-se o mesmo volume da suspensão celular. Como controlos, adicionaram-se 100 µl de RPMI 1640 a igual volume de suspensão celular (controlo positivo) e de FLC/VRC na menor concentração (controlo negativo). Incubaram-se as microplacas durante 48 horas a 30°C, sem agitação.

Os valores dos CIMs foram registados após 48 horas de incubação, sendo considerados como a menor concentração onde foi possível visualizar uma redução de aproximadamente 50% de crescimento. Os critérios interpretativos para os antifúngicos foram os estabelecidos pelo CLSI. Para o FLC o CIM para suscetível (S) foi de ≤ 2 µg ml<sup>-1</sup>, para suscetível dose-dependente (S-DD) de 4 µg ml<sup>-1</sup> e o CIM para resistente (R) de ≥ 8 µg ml<sup>-1</sup>. Relativamente ao VRC o CIM para S foi de ≤1 µg ml<sup>-1</sup>, o de S-DD igual a 2 µg ml<sup>-1</sup> e de R ≥ 4 µg ml<sup>-1</sup> <sup>76,77</sup>.

A estirpe *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controlo de qualidade na avaliação da suscetibilidade antifúngica, de acordo com o mesmo protocolo do CLSI.

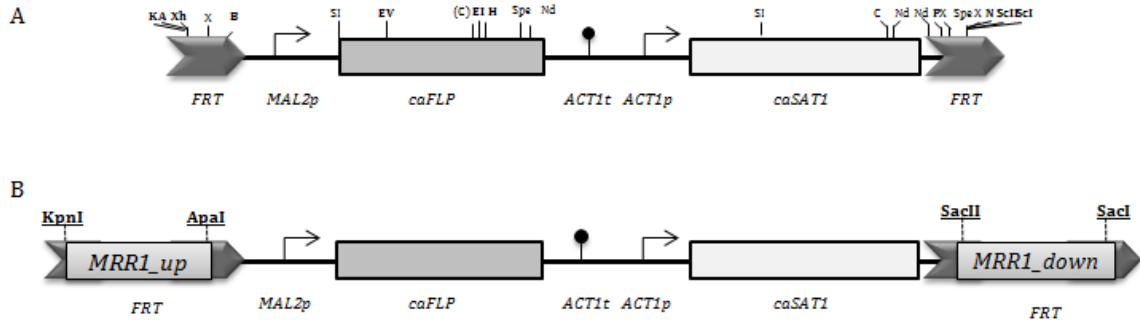
## RESULTADOS | DISCUSSÃO

De modo a esclarecer se as mutações encontradas no fator de transcrição *Mrr1* nas estirpes BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub> e BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub>, seriam responsáveis pelo seu aumento de expressão, e assim, preponderantes no fenótipo de resistência ao fluconazol e ao voriconazol, procedeu-se à deleção do gene *MRR1* na estirpe clínica suscetível BC014 (*MRR1/MRR1*) e seguidamente à complementação independente da mesma estirpe com os genes *MRR1<sub>R<sub>FLC</sub></sub>* e *MRR1<sub>R<sub>VRC</sub></sub>*.

A estratégia de deleção génica numa estirpe clínica exigiu o uso de um marcador de resistência não auxotrófico, como o antibiótico nourseotricina (Nou), codificado pelo gene *SAT1*, usado na ferramenta de disrupção génica *SAT1-Flipper*. A cassette *SAT1-Flipper*, descrita por Reuss *et al.*<sup>70</sup> baseia-se no marcador de resistência (*SAT1*) para a seleção de transformantes de integração, controlado pelo promotor da actina (*ACT1*). Para além destes, a cassette é composta pelo gene *FLP*, que codifica para a recombinase (*FLP*) cuja expressão é controlada pelo promotor da maltose (*MAL2*) e duas sequências FRT (*Flippase Recognition Target*) (**Figura 1. A**). Devido à natureza diploide do genoma de *C. parapsilosis* são necessárias duas rondas de integração e excisão para gerar mutantes homozigóticos, que diferem da estirpe inicial apenas pela ausência do gene alvo. A reinserção de uma cópia intata do gene, de modo a complementar o fenótipo mutante, é realizada através da mesma metodologia. A principal vantagem desta ferramenta reside no fato de possibilitar o estudo de genes, através da deleção/integração em estirpes sem marcador auxotrófico de crescimento. Daqui advêm uma segunda vantagem, a possibilidade de comparar estirpes geneticamente idênticas, como a estirpe suscetível BC014 *versus* BC014<sub>R<sub>FLC</sub></sub> e BC014<sub>R<sub>VRC</sub></sub>.

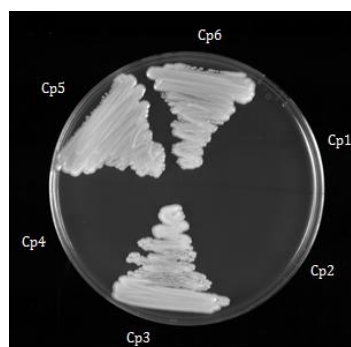
Da primeira transformação por eletroporação da estirpe clínica suscetível BC014 com a cassette pFM17 (*SAT1-Flipper* com as sequências *up* e *downstream* da estirpe suscetível) (**Figura 1. B**) foram gerados transformantes após crescimento num meio seletivo (YPD - Nou 200 µl ml<sup>-1</sup>). A integração no *locus* alvo ocorre com elevada especificidade, pois foram adicionadas sequências homólogas (*MRR1<sub>upstream</sub>* e *MRR1<sub>downstream</sub>*) que flanqueiam ambos os lados da cassette. A excisão da cassette *SAT1*, mediada pela recombinase *FLP*, de alguns dos transformantes foi conseguida através do crescimento dos transformantes durante algumas horas em meio YPM, sem antibiótico. Os transformantes sensíveis à nourseotricina foram facilmente identificados pelo seu crescimento mais lento em placas contendo uma baixa concentração de nourseotricina (20 µl ml<sup>-1</sup>). Após recuperação em meio

YPD, 6 colónias pequenas foram riscadas em meio seletivo (YPD - Nou 200  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) de forma a confirmar a deleção da cassette *SAT1*, através da ausência de crescimento.



**Figura 1.** Construção da cassete de disrupção. (A) Cassete *SAT1-Flipper* (pCD8). (B) Cassete de disrupção pFM17 contendo as sequências *upstream* e *downstream* nos locais *KpnI/ApaI* e *SacII/SacI*, respetivamente.

Foram identificadas três estirpes positivas, com um alelo deletado ( $\Delta mrr1/MRR1$ ) Cp1, Cp2 e Cp4 (**Figura 2.**). As estirpes Cp1 e Cp4, em diferentes momentos, foram escolhidas para a repetição do processo correspondente à deleção do segundo alelo do gene *MRR1*. Das 70 colónias resultantes da segunda transformação (em ambas as estirpes) e após incubação em meio YPM líquido para a excisão da cassete de disrupção, não foi detetado nenhum clone deletado homozigótico (*mrr1/mrr1*) por PCR.

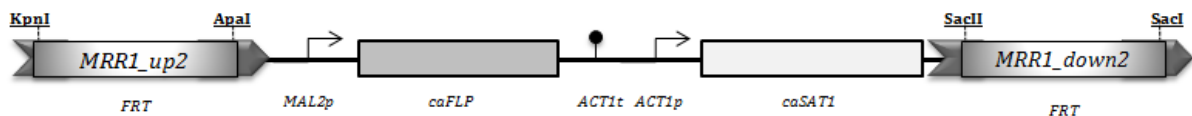


**Figura 2.** Confirmação da deleção de um dos alelos do gene *MRR1* na estirpe BC014. As estirpes Cp1, Cp2 e Cp4 apresentaram ausência de crescimento, em meio YPD suplementado com Nou 200  $\mu\text{l ml}^{-1}$ , após 48 horas de incubação, confirmando assim a excisão da cassete *SAT1*.

A ausência de clones deletados após a segunda ronda de transformação pode dever-se ao fato da cassette de disrupção não emparelhar no local pretendido. Para que a deleção do segundo alelo seja bem-sucedida, a cassette de disrupção pFM17 deverá recombinar com as regiões *upstream* e *downstream* do alelo que contém o gene *MRR1*. Como não foi conseguido nenhum clone com os dois alelos deletados, é de se presumir que a recombinação não está a ocorrer no alelo pretendido, mas sim com as sequências homólogas *up* e *downstream* do alelo já disruptado. Dado a dificuldade em obter clones  $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ , concluímos que a probabilidade da cassette de disrupção emparelhar no local do gene já deletado é elevada.

Futuramente, a resolução deste problema passará pela construção de uma nova cassette de disrupção (**Figura 3.**). Nesta nova ferramenta as sequências *up* e *downstream* clonadas na cassette *SAT1* serão diferentes das inseridas na primeira. As sequências deverão conter as seguintes regiões *upstream* e *downstream* do gene: -1000 a -500 bp (*MRR1\_up2*) e +500 a +1000 bp (*MRR1\_down2*) aproximadamente. A construção da segunda cassette de disrupção com as zonas acima referidas poderá solucionar o problema de recombinação com as sequências *upstream* e *downstream* presentes no alelo já deletado. No entanto e de modo a garantir eficiência no processo de disrupção, esta nova cassette deverá ser usada para disruptar o primeiro alelo e a cassette pFM17 servirá para a disrupção do segundo.

A necessidade de construção de duas cassetes de disrupção apresenta-se como uma desvantagem na utilização desta ferramenta, assim como todo o processo de transformação associado, tornando-a temporalmente demorada.

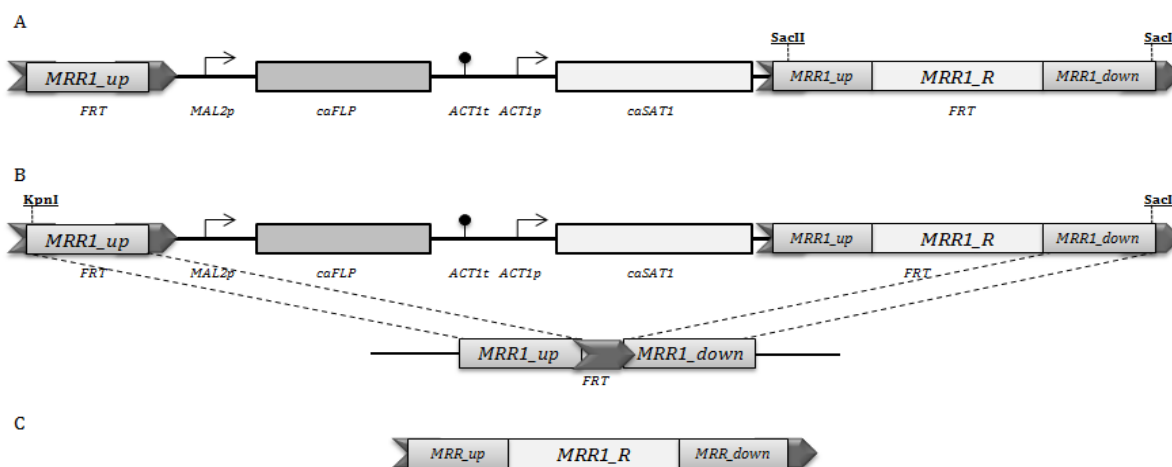


**Figura 3.** Esquematização de uma nova cassette de disrupção do gene *MRR1* em *C. parapsilosis*. As sequências *up* e *downstream* clonadas no vetor referem-se às regiões -1000 a -500 bp (*MRR1\_up2*) e +500 a +1000 bp (*MRR1\_down2*) diferentes das clonadas no plasmídeo pFM17. Estas serão maiores e deslocadas no gene *MRR1*.

Devido à inexistência de clones da estirpe clínica de *C. parapsilosis* BC014 deletados ( $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ ) o trabalho prosseguiu com uma estirpe de *C. parapsilosis* deletada no gene *MRR1* denominada  $\Delta 1$ , gentilmente cedida por Geraldine Butler.

Procedeu-se à construção de duas cassetes de integração independentes, com os genes mutados das estirpes induzidas, *MRR1<sub>RFLC</sub>* (G583R) e *MRR1<sub>RVRC</sub>* (K873N), correspondendo às cassetes pFM18 e pFM19, respetivamente. A **Figura 4. A** esquematiza a casete de integração *standard* construída.

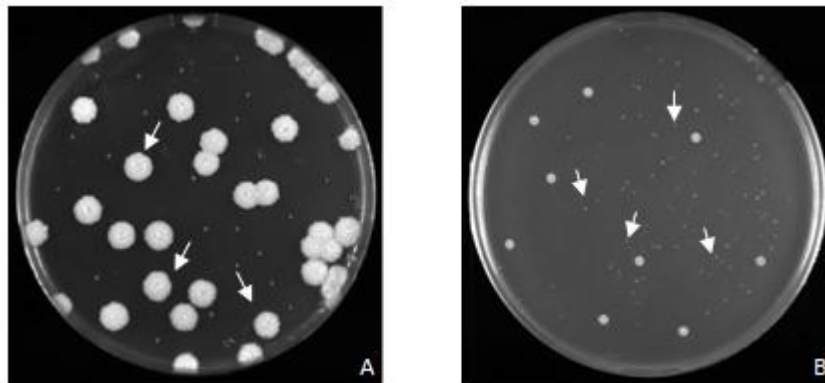
A integração de cada casete com o gene mutado na estirpe deletada ( $\Delta 1$ ) ocorreu como representado na **Figura 4. B**, através da recombinação das sequências homólogas. Os clones resultantes apresentaram resistência à nourseotricina - colónias grandes (**Figura 5. A**). Após o processo de excisão da casete, o gene mutado ficou integrado no seu *locus* (**Figura 4. C**). Os clones complementados foram selecionados pelo seu crescimento mais lento em meio YPD suplementado com Nou 20  $\mu\text{l ml}^{-1}$  (**Figura 5. B**).



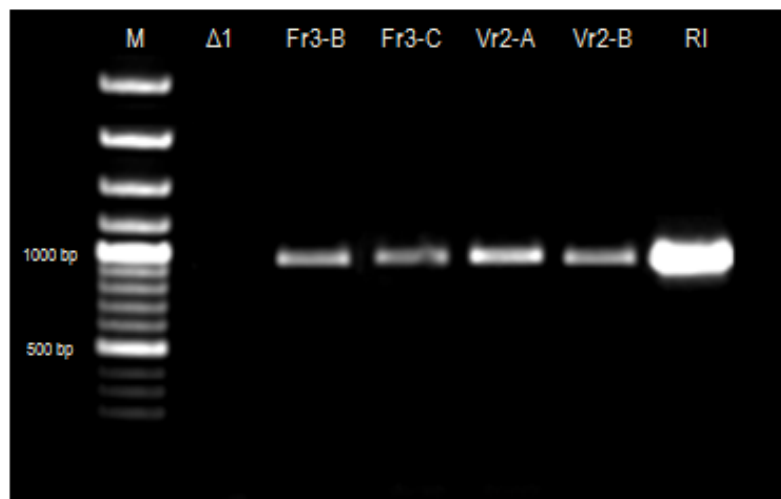
**Figura 4.** Construção das estirpes de *C. parapsilosis* complementadas com o gene *MRR1<sub>RFLC</sub>* e *MRR1<sub>RVRC</sub>*. (A) Foram construídas duas cassetes de complementação contendo o marcador de resistência à nourseotricina (*SAT1*) e o gene *MRR1<sub>RFLC</sub>* e *MRR1<sub>RVRC</sub>*, designadas de pFM18 e pFM19, respetivamente. (B) Esquema do processo de integração dos genes mutados na estirpe  $\Delta 1$ . (C) Resultado da integração do gene *MRR1* em *C. parapsilosis*.

A confirmação da integração com o gene *MRR1<sub>RFLC</sub>* e *MRR1<sub>RVRC</sub>* foi realizada por PCR. A frequência de integração em  $\Delta 1$  com a utilização desta ferramenta foi muito elevada. Aproximadamente 100% das colónias testadas por PCR, resistentes à nourseotricina, continham o gene na região alvo, frequência já descrita por outro grupo de trabalho<sup>73</sup>.

Foram selecionadas quatro estirpes de *C. parapsilosis*, duas com o gene *MRR1<sub>RFLC</sub>*, Fr3-B e Fr3-C, e outras duas com o gene *MRR1<sub>RVRC</sub>*, Vr2-A e Vr2-B (**Figura 6.**) para a avaliação do impacto das mutações na suscetibilidade aos azóis.



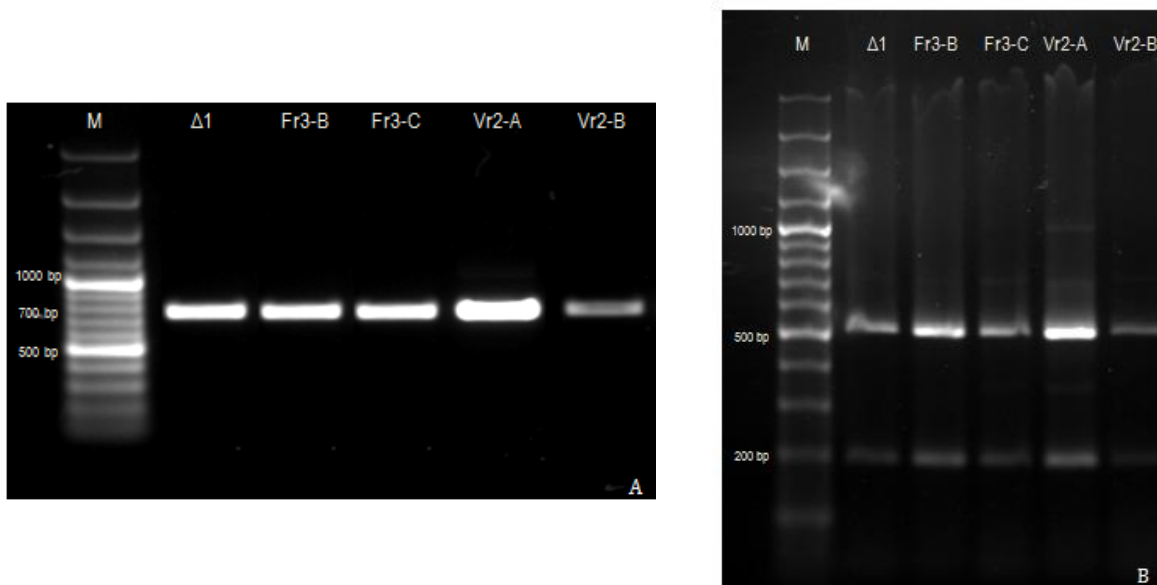
**Figura 5.** Seleção de transformantes de *C. parapsilosis* usando a cassette *SAT1-Flipper*. (A) Crescimento de células contendo a cassette de integração pFM18, apresentando resistência à nourseotricina, colónias grandes (indicadas pelas setas). (B) Seleção de transformantes após excisão da cassette com crescimento reduzido mesmo na presença de baixa concentração de nourseotricina, 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (colónias pequenas indicadas pelas setas).



**Figura 6.** Confirmação por PCR da integração dos genes *MRR1<sub>RFLC</sub>* e *MRR1<sub>RVRC</sub>* na estirpe  $\Delta 1$ . Amplificação de um fragmento com 916 bp do gene *MRR1*, com os primers *MRR1<sub>F2A</sub>* e *MRR<sub>R3</sub>*, a partir de DNA genómico dos clones selecionados, da estirpe  $\Delta 1$  ( $\Delta mrr1/\Delta mrr1$ ) controlo negativo e da estirpe RI ( $\Delta mrr1/MRR1$ ) controlo positivo. M, representa o marcador de pesos moleculares de 100 bp Plus (Fermentas).

De forma a confirmar que as estirpes construídas pertenciam à espécie *C. parapsilosis*, tal como a estirpe parental, procedeu-se à amplificação do gene *SADH* e posterior restrição como descrito por Tavanti *et al.*<sup>15</sup>. O fragmento do gene *SADH* com 716 bp (**Figura 7. A**) foi sujeito à endonuclease *BanI*. Foi assim confirmada a identificação dos clones reintegrados

como pertencentes à espécie *C. parapsilosis sensu stricto*, uma vez que se obteve 2 bandas, correspondente à divisão do fragmento por um único local de corte para a enzima *BanI*. (Figura 7. B).



**Figura 7.** Confirmação da identidade das estirpes selecionadas para avaliação da suscetibilidade aos azóis, como *C. parapsilosis sensu stricto*, de acordo com os seus perfis de restrição do gene *SADH*. (A) Amplificação do fragmento de 716 bp do gene *SADH*, a partir do DNA genômico das estirpes Fr3-B, Fr3-C, Vr2-A e Vr2-B. (B) Restrição do gene *SADH* com a enzima *BanI*. M, representa o marcador de pesos moleculares de 100 bp Plus (Fermentas).

De modo a determinar qual a importância das mutações encontradas no fator de transcrição *MRR1* nas estirpes BC014<sub>FLC</sub> e BC014<sub>VRC</sub>, foi avaliado o padrão de suscetibilidade aos azóis das estirpes Δ1, Fr3-B, Fr3-C, Vr2-A e Vr2-B, comparativamente com as estirpes BC014, BC014<sub>FLC</sub> e BC014<sub>VRC</sub>, descrito na **Tabela 1**.

Como controlo de qualidade foi utilizada a estirpe *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os valores de *breakpoints* publicados determinaram o fenótipo das estirpes de acordo com os valores de CIM apresentados<sup>76,77</sup>.

Assim como previsto a estirpe BC014 apresentou fenótipo suscetível a ambos os azóis, 1 µg ml<sup>-1</sup> ao FLC e 0.03 µg ml<sup>-1</sup> ao VRC. As estirpes BC014<sub>FLC</sub> e BC014<sub>VRC</sub>, resultantes da indução de resistência *in vitro*, exibiram resistência cruzada a ambos os azóis testados, 64 µg ml<sup>-1</sup> ao FLC e 4 µg ml<sup>-1</sup> ao VRC. A estirpe Δ1 (*Δmrr1/Δmrr1*) exibiu valores de CIM idênticos à estirpe BC014, assim como as 4 estirpes integradas (Fr3-B, Fr3-C, Vr2-A e Vr2-B) apresentando fenótipo suscetível.



Estes resultados indicam que as mutações encontradas no fator de transcrição *Mrr1* nas estirpes BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>, não estão associadas ao aumento de resistência aos azóis, na estirpe  $\Delta 1$ . Esta abordagem não permitiu considerar as mutações como *gain-of-function*, não estando por isso diretamente ligadas ao aumento de expressão do gene *MRR1*.

**Tabela 1.** Valores de CIM e fenótipos de suscetibilidade das estirpes de *C. parapsilosis*.

Estirpe	CIM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )   Fenótipo	
	Fluconazol	Voriconazol
ATCC 22019	0.5   S	0.015   S
BC014	1   S	0.03   S
BC014R <sub>FLC</sub>	64   R	4   R
BC014R <sub>VRC</sub>	64   R	4   R
$\Delta 1$	1   S	0.03   S
Fr3-B	1   S	0.03   S
Fr3-C	1   S	0.03   S
Vr2-A	1   S	0.03   S
Vr2-B	1   S	0.03   S

Hoje em dia muito pouco se sabe sobre os mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos em *C. parapsilosis*, os estudos realizados incidem maioritariamente sobre *C. albicans*. Aliás o único estudo publicado até hoje sobre a temática dos mecanismos moleculares de resistência em *C. parapsilosis*, foi o estudo que promoveu a iniciação deste projeto, publicado por Silva *et al.*<sup>69</sup>. Neste apenas foram descritas as mudanças no perfil de expressão génica de *Candida parapsilosis* associadas à aquisição de resistência induzida experimentalmente aos azóis, e não a comprovação dessas alterações de expressão na resistência antifúngica.

A função do fator de transcrição *Mrr1* como principal regulador da expressão das bombas de efluxo *MDR1* encontra-se comprovado em *C. albicans*<sup>64</sup>, incluindo a evidência de que este fator não é apenas responsável pela sobre-expressão constitutiva das bombas *MDR1* em isolados clínicos resistentes, como também é responsável pela expressão das *MDR1* em estirpes suscetíveis. As mutações no gene *MRR1* são a principal causa de sobre-expressão das bombas de efluxo *MDR1* em, *C. albicans* e *C. dubliniensis*, demonstrando assim que o fator de transcrição *Mrr1* tem um papel fundamental no desenvolvimento de resistência nestas leveduras<sup>65,66</sup>.

As mutações encontradas nas estirpes BC014R<sub>FLC</sub> (G583R) e BC014R<sub>VRC</sub> (K873N) de *C. parapsilosis* não estão descritas em *C. albicans*, embora a mutação K873N tenha ocorrido na mesma posição 873 da cadeia polipeptídica, local classificado como *hot-spot* para mutações em *C. albicans*.

O fato das mutações adquiridas pelas estirpes induzidas à resistência não serem consideradas como *gain-of-function*, não impossibilita o fato de não possuírem algum impacto na atividade fisiológica das células fúngicas. Estudos experimentais e computacionais demonstraram que as mutações de um modo geral (sinónimas ou não) podem alterar as vias de sinalização, assim como toda a complexa rede envolvida no funcionamento celular. A alteração da sequência de aminoácidos na estrutura primária de uma proteína afeta o processo de tradução, e conseqüentemente a quantidade intracelular relativa destas proteínas, a aquisição da sua estrutura terciária ou quaternária (*foldings*) e, por vezes, a sua funcionalidade. A alteração no *foldings* de uma proteína pode conduzir a um efeito cascata noutras proteínas e eventualmente a um efeito proteotóxico<sup>78</sup>.

A falta da estrutura tridimensional do fator de transcrição *Mrr1* impossibilita a modelação e a avaliação do impacto da troca de resíduos em termos estruturais e funcionais, de interação com as regiões intergênicas ou com outras proteínas reguladoras.

## CONCLUSÃO | PERSPETIVAS FUTURAS

Os resultados do presente estudo demonstraram, preliminarmente, que as mutações adquiridas no fator de transcrição *Mrr1* pela estirpe clínica BC014, após indução de resistência ao fluconazol e voriconazol não contribuíram para a mudança de fenótipo de suscetível para resistente aos mencionados antifúngicos. Assim, e ao contrário do que seria expectável, estas mutações não são *gain-of-function*, logo não induzem a sobre-expressão dos transportadores de efluxo *MDR1* em *C. parapsilosis*. No entanto, pretende-se futuramente comprovar estes resultados na estirpe suscetível, BC014, possuidora das mesmas características genéticas das estirpes resistentes, BC014R<sub>FLC</sub> e BC014R<sub>VRC</sub>. Para tal, proceder-se-á à construção de uma cassette de disrupção, como descrito anteriormente.

Uma vez que o conhecimento relativo aos mecanismos de resistência antifúngica em *C. parapsilosis* são diminutos, seria importante conhecer a importância de outros fatores de transcrição, como o *Ndt80*, o *Tac1* e o *Upc2*, na aquisição de resistência aos azóis por *C. parapsilosis*, uma vez que o seu papel na resistência antifúngica está bem descrito em *C. albicans*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Odds, F.C. Candida infections: an overview. *Crit Rev Microbiol* **15**, 1-5 (1987).
2. Pfaller, M.A. & Diekema, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-63 (2007).
3. Shao, P.L., Huang, L.M. & Hsueh, P.R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* **30**, 487-95 (2007).
4. Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonca, D. & Goncalves Rodrigues, A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**, 365-74 (2008).
5. Clark, T.A. & Hajjeh, R.A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* **15**, 569-74 (2002).
6. Erjavec, Z., Kluin-Nelemans, H. & Verweij, P.E. Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* **15**, 625-33 (2009).
7. Tortorano, A.M. et al. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 359-66 (2006).
8. Richardson, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **56 Suppl 1**, i5-i11 (2005).
9. LJ, D. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiology* **11**, 30-6 (2003).
10. O'Toole G, K.H., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**, 49-79 (2000).
11. Kojic, E.M. & Darouiche, R.O. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**, 255-67 (2004).
12. Estivill, D., Arias, A., Torres-Lana, A., Carrillo-Munoz, A.J. & Arevalo, M.P. Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials. *J Microbiol Methods* **86**, 238-42 (2011).
13. Ashford, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **8**, 507-538 (1928).
14. Weems, J.J., Jr. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* **14**, 756-66 (1992).
15. Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C. & Odds, F.C. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. *J Clin Microbiol* **43**, 284-92 (2005).
16. Fell, J.W. & Meyer, S.A. Systematics of yeast species in the Candida parapsilosis group. *Mycopathol Mycol Appl* **32**, 177-93 (1967).
17. Laffey, S.F. & Butler, G. Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis. *Microbiology* **151**, 1073-81 (2005).
18. Kim, S.K., El Bissati, K. & Ben Mamoun, C. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen Candida parapsilosis. *Microbiology* **152**, 2885-94 (2006).

19. Clark, T.A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol* **42**, 4468-72 (2004).
20. Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K. & Ghannoum, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* **70**, 878-88 (2002).
21. Ramage, G., Martinez, J.P. & Lopez-Ribot, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**, 979-86 (2006).
22. Bonassoli, L.A., Bertoli, M. & Svidzinski, T.I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* **59**, 159-62 (2005).
23. van Asbeck, E.C., Huang, Y.C., Markham, A.N., Clemons, K.V. & Stevens, D.A. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia* **164**, 287-93 (2007).
24. Benjamin, D.K. et al. Mortality following blood culture in premature infants: increased with Gram-negative bacteremia and candidemia, but not Gram-positive bacteremia. *J Perinatol* **24**, 175-80 (2004).
25. Saiman, L. et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* **20**, 1119-24 (2001).
26. Trofa, D., Gacser, A. & Nosanchuk, J.D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**, 606-25 (2008).
27. Kathiravan, M.K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg Med Chem* **20**, 5678-98 (2012).
28. Lemke, A., Kiderlen, A.F. & Kayser, O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 151-62 (2005).
29. Baginski, M., Resat, H. & McCammon, J.A. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Mol Pharmacol* **52**, 560-70 (1997).
30. Milhaud, J., Ponsinet, V., Takashi, M. & Michels, B. Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol. *Biochim Biophys Acta* **1558**, 95-108 (2002).
31. Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J.N., Odds, F.C. & Rex, J.H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 719-27 (2010).
32. Stiller, R.L. et al. Correlation of in vitro susceptibility test results with in vivo response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. *J Infect Dis* **147**, 1070-7 (1983).
33. Vermes, A., Guchelaar, H.J. & Dankert, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* **46**, 171-9 (2000).
34. Waldorf, A.R. & Polak, A. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* **23**, 79-85 (1983).
35. Denning, D.W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**, 1142-51 (2003).
36. Denning, D.W. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother* **49**, 889-91 (2002).

37. Carrillo-Munoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P.A. & Quindos, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* **19**, 130-9 (2006).
38. Sanglard, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* **5**, 379-85 (2002).
39. Anderson, J.B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* **3**, 547-56 (2005).
40. Vandeputte, P., Ferrari, S. & Coste, A.T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol* **2012**, 713687 (2012).
41. Perea, S. & Patterson, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* **35**, 1073-80 (2002).
42. Polak, A. & Scholer, H.J. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* **21**, 113-30 (1975).
43. Papon, N. et al. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 369-71 (2007).
44. Chapeland-Leclerc, F. et al. Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3101-8 (2005).
45. Perlin, D.S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* **10**, 121-30 (2007).
46. Kanafani, Z.A. & Perfect, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* **46**, 120-8 (2008).
47. Walker, L.A., Gow, N.A. & Munro, C.A. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* **47**, 117-26 (2010).
48. Walker, L.A. et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* **4**, e1000040 (2008).
49. Morschhauser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 240-8 (2002).
50. Morschhauser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **47**, 94-106 (2010).
51. Podust, L.M., Poulos, T.L. & Waterman, M.R. Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3068-73 (2001).
52. Chau, A.S. et al. Inactivation of sterol Delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3646-51 (2005).
53. Shyadehi AZ, L.D., Kelly SL, Kelly DE, Schunck WH, WrightJN,. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14  $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase P-45014DM, and CYP51). *J Biol Chem* **271**, 12445—50 (1996).
54. Morio, F., Loge, C., Besse, B., Hennequin, C. & Le Pape, P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **66**, 373-84 (2010).

55. Sanglard, D. & Odds, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**, 73-85 (2002).
56. Heilmann, C.J., Schneider, S., Barker, K.S., Rogers, P.D. & Morschhauser, J. An A643T mutation in the transcription factor *Upc2p* causes constitutive *ERG11* upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 353-9 (2010).
57. Flowers, S.A. et al. Gain-of-Function Mutations in *UPC2* Are a Frequent Cause of *ERG11* Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**, 1289-99 (2012).
58. Marie, C. & White, T.C. Genetic Basis of Antifungal Drug Resistance. *Curr Fungal Infect Rep* **3**, 163-169 (2009).
59. de Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. & Sanglard, D. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol* **43**, 1197-214 (2002).
60. Coste, A.T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J. & Sanglard, D. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell* **3**, 1639-52 (2004).
61. Coste, A. et al. A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**, 2139-56 (2006).
62. Alarco, A.M. The *bZip* transcription factor *Cap1p* is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **181**, 700-708 (1999).
63. Noël, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs *Journal de Mycologie Médicale* **22**, 173-178 (2012).
64. Morschhauser, J. et al. The transcription factor *Mrr1p* controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **3**, e164 (2007).
65. Dunkel, N., Blass, J., Rogers, P.D. & Morschhauser, J. Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* **69**, 827-40 (2008).
66. Schubert, S., Rogers, P.D. & Morschhauser, J. Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4274-80 (2008).
67. Rogers, P.D. & Barker, K.S. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1220-7 (2003).
68. Pinto e Silva, A.T., Costa-de-Oliveira, S., Silva-Dias, A., Pina-Vaz, C. & Rodrigues, A.G. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. *FEMS Yeast Res* **9**, 626-33 (2009).
69. Silva, A.P. et al. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3546-56 (2011).
70. Reuss, O., Vik, A., Kolter, R. & Morschhauser, J. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**, 119-27 (2004).
71. Hoffman, C.S. & Winston, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72 (1987).

72. Harju, S., Fedosyuk, H. & Peterson, K.R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol* **4**, 8 (2004).
73. Ding, C. & Butler, G. Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* **6**, 1310-9 (2007).
74. Zemanova, J., Nosek, J. & Tomaska, L. High-efficiency transformation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* **45**, 183-6 (2004).
75. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27-A3*, (CLSI, 2008).
76. Pfaller, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* **125**, S3-13 (2012).
77. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Moet, G.J., Jones, R.N. & Castanheira, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents* **38**, 65-9 (2011).
78. Sauna, Z.E. & Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet* **12**, 683-91 (2011).