

Aspectos moleculares y genéticos de la resistencia a azoles en *Candida albicans*

María Luisa Hernáez, Jesús Pla y César Nombela

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España

Resumen

El fluconazol es uno de los fármacos más útiles en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas, que padecen con frecuencia pacientes no inmunocompetentes. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes en los últimos años puede limitar notablemente su utilidad en un futuro próximo. Aunque se han descrito diversos mecanismos implicados en la resistencia a azoles, existen estudios genéticos recientes que demuestran la implicación de genes específicos en la resistencia clínica. Los mejor caracterizados hasta la fecha son los genes *MDR1* y *CDR1*, que codifican proteínas que pertenecen, respectivamente, a las familias MFS y ABC de transportadores de fármacos. Estas proteínas responden al potencial de membrana (MFS) o hidrolizan ATP (ABC) provocando la salida del fármaco y reduciendo así su acumulación intracelular. Se ha demostrado que algunas cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes sometidos a terapia con fluconazol de larga duración tiene niveles elevados del ARNm de dichos genes. El desarrollo de herramientas de manipulación genética en *C. albicans* está permitiendo caracterizar el papel de estos genes en éste y en otros procesos importantes para la célula fúngica.

Fluconazol, Azoles, *Candida albicans*, Resistencia, Transportadores

Molecular and genetic aspects of resistance to azoles in *Candida albicans*

Summary

Fluconazole is one of the most useful drugs in the treatment of fungal systemic infections which frequently affect non immunocompetent individuals. However, the emergence of resistant strains in recent years may severely limit its usefulness in future. Although there are several described mechanisms involved in resistance to azoles, recent genetic studies demonstrate the role of specific genes in clinical resistance. Currently, the best characterized are the *MDR1* and *CDR1* genes, which code members of the MFS or ABC family of drug transporters, respectively. These proteins respond to the membrane potential (MFS) or hydrolyse ATP (ABC) thus promoting drug efflux and therefore reducing its intracellular accumulation. It has been shown that the mRNA from these genes is frequently increased in some *Candida albicans* resistant strains from patients receiving long term azole treatment. The development of molecular genetic tools in *C. albicans* is allowing characterization of their role in this and other important processes in the fungal cell.

Key words

Fluconazole, Azoles, *Candida albicans*, Resistance, Transporters

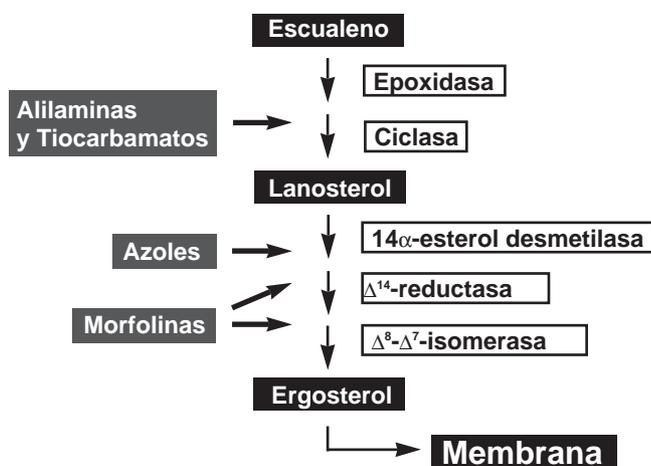
El fluconazol es un antifúngico de naturaleza triazólica de enorme importancia actual en el tratamiento de infecciones fúngicas. Este tipo de infecciones están aumentando en un gran número de países desarrollados [1,2], entre ellos España [3] y su tratamiento es hoy día un problema grave debido al reducido número de antifúngicos eficaces que actúen de forma totalmente selectiva.

La anfotericina B, el estándar clásico en el tratamiento de este tipo de infecciones, actúa por su capacidad de interacción con el ergosterol de la membrana plasmática de la célula fúngica [4] pero su capacidad de interacción (aunque en menor grado) con las membranas de células de mamíferos ricas en colesterol, es responsable de sus importantes efectos secundarios, parcialmente solventados con la utilización de nuevas formulaciones liposomales [5].

El segundo grupo de antifúngicos de utilidad hoy día, los azoles, actúan inhibiendo el mecanismo de síntesis del ergosterol (Figura 1) y son los que tienen en la actualidad una mayor importancia cualitativa y cuantitativa en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, clasificándose en derivados imidazólicos y triazólicos. El desarrollo de estos últimos (ketoconazol, fluconazol e itraconazol como compuestos más representativos), de

Dirección para correspondencia:

Dr. Jesús Pla
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, España
Tel.: +34 1 3941617; Fax: +34 1 3941745
E-mail: jesuspla@eucmax.sim.ucm.es



administración oral y mayor selectividad, supuso un gran avance en la terapia antifúngica. Entre ellos, el fluconazol fue rápidamente uno de los fármacos de elección en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, candidiasis orofaríngeas y meningitis criptocócica en pacientes con infección por VIH y sida debido a su elevada biodisponibilidad ($\cong 90\%$) y selectividad así como en tratamientos profilácticos en pacientes sometidos a terapia inmunosupresora. Estos compuestos presentaban numerosas ventajas frente a los primeros derivados imidazólicos (p.e.: miconazol), no sólo de tipo farmacocinético, sino también respecto a la especificidad de su mecanismo de acción, la biosíntesis del ergosterol. Los derivados triazólicos inhiben específicamente esta síntesis a nivel de la 14- α -esterol desmetilasa dependiente del sistema citocromo P-450 (14- α -DM) (Figura 1). La depleción del ergosterol celular unida a la acumulación de ciertos compuestos intermedios en su síntesis [6], conlleva, en última instancia, a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática y un efecto fungistático.

Sin embargo, tras la introducción del fluconazol en la práctica clínica en 1988, empezaron a surgir resistencias [7], de forma similar a lo ocurrido tras la introducción del ketoconazol en el tratamiento de la candidosis mucocutáneas crónicas [8,9] y que amenazan con limitar notablemente su utilidad a corto y medio plazo. De hecho, se ha descrito cómo las resistencias a fluconazol originan problemas en al menos un 10% de los pacientes de sida en fase avanzada [10]. Estas resistencias se correlacionan directamente, y en muchos casos, con las dosis de fluconazol administradas y/o la duración del tratamiento, siendo por tanto de naturaleza adquirida. Con frecuencia, además, son cruzadas con otros azoles [11]. En esta revisión intentaremos evidenciar los mecanismos moleculares que se conoce que juegan un papel en la resistencia a los azoles, centrándonos especialmente en los recientes avances que implican sistemas de transporte activo en resistencia a azoles y en particular, a fluconazol.

Mecanismos de resistencia a azoles. Existen básicamente tres tipos de mecanismos moleculares por los cuales un microorganismo puede adquirir resistencia a un antibiótico. El primero de ellos consiste en modificaciones de la enzima blanco, tanto de su regulación (aumento o disminución de niveles) como de su capacidad de interacción con el antibiótico, sin impedir que siga siendo capaz de llevar a cabo su función fisiológica en la célula. El segundo mecanismo consiste en la incapacidad de alcanzar el antibiótico concentraciones eficaces en el sitio

de su acción, lo cual suele ser debido a la existencia de barreras de permeabilidad o, alternativamente, a la presencia de sistemas de bombeo activo del antibiótico al exterior celular. El tercer mecanismo, ampliamente extendido en el mundo microbiano, es la inactivación del antibiótico por modificación covalente del antibiótico.

Hasta la fecha, sólo se han descrito los dos primeros mecanismos (modificación del sistema blanco y acumulación intracelular reducida) en el caso de los azoles [12-14]. En efecto, se ha descrito como en *Candida* spp., la enzima blanco de la acción del antibiótico, la 14- α -DM puede hacerse menos sensible a la acción inhibitoria de los azoles [15]. Algunas cepas carentes de esta actividad presentan resistencia cruzada con polienos [16], lo cual se ha explicado teniendo en cuenta los cambios en la composición lipídica global de la membrana que produce la inhibición de este enzima. Igualmente, se ha descrito cómo el aumento en la actividad de la 14- α -DM puede explicar, al menos en parte, la resistencia de un aislamiento clínico de *Candida glabrata* [17]. También se ha descrito cómo defectos en la $\Delta 5,6$ -esterol desaturasa pueden generar resistencia a ketoconazol en una cepa de *C. albicans* (cepa Darlington). Esta cepa acumula fecosterol que, al ser utilizado como sustrato, puede compensar en parte los efectos nocivos de la acumulación de lanosterol y otros intermediarios tóxicos para la célula.

El segundo tipo de mecanismo observado es la acumulación intracelular reducida del antibiótico. Así, hace más de 13 años, se demostró que ciertas cepas que no respondían al tratamiento con ketoconazol eran incapaces de incorporar al citoplasma celular un derivado triazólico marcado radiactivamente [18]. Posteriores estudios pusieron de manifiesto que estas cepas tenían alteraciones en el contenido lipídico de la membrana, con una disminución de la relación esteroides/fosfolípidos [16,19,20]. Estos cambios se han postulado cómo responsables del proceso de "impermeabilización" de la membrana plasmática a la entrada de azoles siendo responsables, por tanto, de la resistencia a los mismos.

Sistemas de transporte activo de antibióticos. El aspecto quizá más llamativo en los últimos años en el campo de la resistencia a azoles ha sido la implicación de sistemas de transporte activo en la resistencia a azoles en hongos patógenos, principalmente en *C. albicans*. Esta situación contrasta con los sistemas bacterianos, en los que se conoce desde hace muchos años este mecanismo habiéndose implicado en la resistencia a tetraciclinas, quinolonas, macrólidos, cationes orgánicos y metales pesados [21]. Este hecho está, sin lugar a duda, relacionado con el menor grado de desarrollo de las herramientas de manipulación genética existentes en hongos patógenos, lo que ha limitado enormemente los estudios de caracterización genética.

La situación en *C. albicans* se complica por su carácter diploide y la ausencia de ciclo sexual [22], aun cuando en los últimos años se están empezando a desarrollar algunas de las herramientas genéticas que empiezan a permitir el aislamiento, identificación y caracterización de algunos genes implicados en muchos de estos procesos [23-25]. Los estudios en *C. albicans* disponen, por el contrario y como ventaja notoria, de un sistema modelo de referencia como *Saccharomyces cerevisiae*, organismo con el cual presenta una relativa proximidad filogenética y en el cual no sólo existen gran número de herramientas genéticas sino que la totalidad de su genoma ha sido secuenciado. Aun cuando *S. cerevisiae* no es una levadura patógena y no ha sido, por tanto, sometida a la presión selectiva de la terapia antifúngica, los intensos estudios

básicos que se han llevado a cabo en los últimos años han permitido caracterizar un complejo entramado de genes que codifican proteínas que juegan un papel en lo que se ha denominado resistencia múltiple o pleiotrópica a fármacos (PDR; de *Pleiotropic Drug Resistance*) [26-28], por la capacidad de tienen estos genes de determinar resistencias a una gran cantidad de compuestos sin relación estructural clara entre ellos. En general, se pueden clasificar en dos grupos de genes: los que intervienen directamente en el mecanismo o proceso de transporte de sustancias al exterior celular, que suelen codificar proteínas de membrana, y los factores de transcripción, que actúan activando la transcripción de los primeros. El sistema de *S. cerevisiae* es, por tanto, un marco conceptual muy adecuado para tratar de comprender este tipo de fenómenos.

Existen pocos genes descritos en *C. albicans* hasta la fecha con un papel definido en la resistencia a azoles. El primero de ellos, *MDR1*, denominado inicialmente *BENr*, fue aislado al conferir resistencia a los antibióticos benomilo y metotrexato en *S. cerevisiae* cuando se encontraba presente en plásmidos episómicos multicopia de este organismo [29]. Con posterioridad se demostró que su sobreproducción en *S. cerevisiae* confería resistencia no sólo a estos antifúngicos sino a una amplia variedad de compuestos que no estaban relacionados estructuralmente como cicloheximida, benzotriazoles, nitroquinoleínas y otros [30]. *MDR1* codifica una proteína, MDR1p, en la que se han sugerido dos dominios proteicos con seis regiones fuertemente hidrofóbicas (supuestamente transmembrana) cada una, así como su pertenencia a la familia de transportadores MFS (del inglés, *Major Facilitators Superfamily*). Estas proteínas, actúan por un mecanismo dependiente de la existencia de un potencial de membrana [31] (Figura 2). MDR1p, es homólogo (57% identidad, 77% similitud) con una proteína similar de *C. maltosa* que confiere resistencia a cicloheximida [32] así como el producto de un gen de *Schizosaccharomyces pombe* que confiere resistencia a amiloride denominado *car1* [33]. La interrupción de este gen en *C. albicans* ha demostrado su implicación en la virulencia [34], con reducciones en el tiempo medio de supervivencia de los ratones en los que se llevó a cabo el ensayo. Este aspecto apoya el hecho de que esta proteína, aunque no esencial, juega un papel importante en procesos fisiológicos normales en la célula fúngica. Se ha demostrado recientemente que la sobreproducción de *MDR1* confiere resistencia a fluconazol y otros azoles en *S. cerevisiae* (Regidor J., datos no publicados). Las cepas de *C. albicans* delecionadas en este gen son, igualmente, más sensibles a ciertos compuestos tóxicos aunque no a benomilo [35] ni a azoles [36] (Hernández ML, datos no publicados).

Un segundo gen caracterizado es *CDR1*, clonado por Prasad y cols. [37] al complementar la hipersensibilidad a fármacos que presentaban cepas de *S. cerevisiae* mutantes en el gen *PDR5*. *CDR1* codifica una proteína que, teniendo en cuenta su estructura primaria, pertenece a la superfamilia de transportadores de tipo ABC (del inglés, *ATP-Binding Cassette*) siendo homóloga al producto de los genes *PDR5* (56% identidad, 73% similitud) y *SNQ2* (42% identidad, 60% similitud) de *S. cerevisiae* [38,39], también implicados en la resistencia múltiple a drogas en este organismo [24,40]. Estos transportadores, ampliamente difundidos en el mundo microbiano [41,42], actúan acoplando el sistema de transporte del sustrato a un proceso de hidrólisis de ATP, que interacciona con una región definida de la proteína presente en un dominio citoplásmico (Figura 2). La sobreproducción de *CDR1p* en *S. cerevisiae* confiere resistencia a múltiples drogas

como cicloheximida, cloranfenicol, miconazol, oligomicina, nistatina y 2,4-dinitrofenol [37] así como a fluconazol (Hernández, ML, datos no publicados) hecho que apoya su papel como transportador multifuncional.

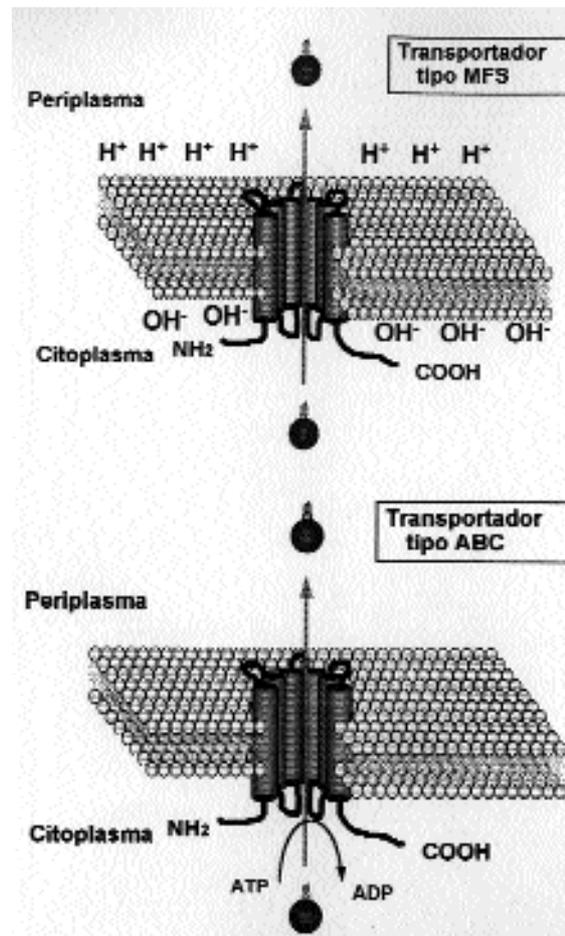


Figura 2. Modelo estructural y funcional de los tipos de transportadores implicados en la resistencia a múltiples fármacos en *C. albicans*.

Hay varios datos que apoyan el papel que juega *CDR1* en la resistencia a fluconazol en *C. albicans*. En primer lugar, se ha descrito que aislamientos clínicos obtenidos de pacientes de sida sometidos a terapia con fluconazol durante periodos prolongados tienen niveles elevados (hasta 10 veces superiores a los normales) de ARNm de *CDR1* [43], un aspecto que indica que la sobreproducción de esta bomba es un mecanismo de relevancia clínica. Algunos de estas cepas muestran niveles elevados del ARNm del gen *MDR1*, hecho que también apoya la importancia de *MDR1* en la resistencia. Por otro lado, experimentos de interrupción génica en *C. albicans* han demostrado que la deleción de *CDR1* genera cepas más sensibles a diversos antifúngicos, como el fluconazol, itraconazol, ketoconazol, terbinafina, amorolfina y cicloheximida entre otros [36], lo que indica que, aunque no sea esencial para la viabilidad celular, esta proteína es capaz de transportar dichos sustratos al exterior celular reduciendo la concentración intracelular de droga y con ello el efecto inhibitorio deseado.

Recientemente, se ha aislado otro gen por complementación de la sensibilidad a fluconazol que presentan cepas mutantes de *S. cerevisiae* *PDR5* [44]. Este gen, denominado *CDR2*, codifica una proteína 84% idéntica al producto del gen *CDR1* y también pertenece a la superfa-

milia ABC. Su patrón de expresión es, por el contrario, diferente, no detectándose mensajero en cepas silvestres. De igual forma a lo que ocurre con *MDR1*, su delección en *C. albicans* no genera cepas más sensibles a los azoles, pero en cambio, su sobreproducción en aislamiento clínico sí genera resistencia a los mismos [44].

Si bien la sobreproducción de transportadores en *S. cerevisiae* tiene efectos sobre numerosos compuestos sin relación estructural, no lo hace con todos con igual afinidad [27]. De hecho, en *C. albicans* la función de estos transportadores es diferente en varios aspectos. Por ejemplo, aunque tanto *CDR1* como *MDR1* pueden producir resistencia a fluconazol por sobreexpresión [44], la delección de cada uno de ellos no produce un fenotipo similar [35-36]. De hecho, la delección de *MDR1*, si bien no genera cepas más sensibles a fluconazol per se, sí aumenta la sensibilidad a diversos fármacos pero sólo cuando se lleva a cabo en un fondo genético *CDR1* [36]. Igualmente, hay autores que han sugerido (mediante estudios de obtención de mutantes de *C. albicans* resistentes a fluconazol en laboratorio) que *MDR1* es más específico de la resistencia asociada a fluconazol mientras que *CDR1* tiene un espectro de compuestos más amplio [45]. Otro ejemplo lo constituye *CDR2*, que parece tener una menor actividad transportadora en *S. cerevisiae* que *CDR1* pero es, por el contrario, más específico frente a sustancias como el cristal violeta [44].

En conclusión, los datos expuestos anteriormente demuestran la implicación en *C. albicans* de diversos miembros de las familias de transportadores ABC y MFS en la resistencia a azoles y otros antifúngicos.

CONCLUSIONES

A pesar de la relevancia de este último mecanismo en la resistencia a azoles, existen todavía muchos aspectos que se ignoran.

En primer lugar, es de destacar que no existen todavía datos que apoyen de forma directa la capacidad de unión de Cdr1p, Cdr2p y MDR1p a azoles, de forma que la sobreproducción de estos transportadores podría

desencadenar un mecanismo indirecto de resistencia por interacción con otros sistemas de exportación celular. De hecho, todavía se desconoce la localización celular de estas proteínas, aun cuando por similitud con el modelo de *S. cerevisiae* [46], se sugiera una localización en la membrana citoplásmica.

En segundo lugar, es de enorme interés la regulación de estos genes. En *S. cerevisiae* se conocen diversos factores de transcripción implicados en la regulación de sistemas de transporte de antibióticos y sustancias tóxicas. Así, los genes *PDR1* y *PDR3* son, entre otros, reguladores positivos de *PDR5* en *S. cerevisiae* [38,47]. Es predecible que numerosos factores (temperatura, diferentes tipos de estrés o los propios sustratos) puedan modular la expresión de estos transportadores. Aunque algunos de estos factores de transcripción ya han sido identificados en *C. albicans* (Hernández M. L., datos no publicados), se desconoce por el momento su implicación en fenómenos de resistencias en la práctica clínica.

Por último, es de destacar que se desconoce el mecanismo por el cual se induce la expresión de estos transportadores, que pudiera ser debido, entre otros, a una disregulación (por mutaciones en su región promotora), a mutaciones en otras proteínas que actuaran en trans (factores de transcripción) e incluso a fenómenos de amplificación génica tal y como ha sido descrito en células de mamífero. Además, no se excluye la existencia de otros mecanismos adicionales (como mutaciones en el gen estructural) que puedan incrementar y actuar aditivamente a éste. El aislamiento y la caracterización molecular de los genes aislados así como la identificación de nuevos genes implicados en este fenómeno (previsible por analogía con el modelo de *S. cerevisiae*) puede arrojar claves que posibiliten en un futuro el control y terapia eficaz de las infecciones fúngicas.

Agradecemos al Dr. R. Rotger la cuidadosa revisión de este artículo. Parte de nuestro trabajo de investigación está financiado por Pfizer S.A. (España) y por el Proyecto FIS SAF-96-1540.

Bibliografía

1. Fox JL. Fungal infection rates are increasing. *ASM News* 1993; 10: 515-518.
2. Shaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91(Suppl 3B): 72S-5S.
3. Vaque Rafart J, Baquero Mochales F, Monge Jodra V, et al. Proyecto EPINE 1992. Barcelona, Grafimed Publ., 1993.
4. Bennett JE. Antimicrobial agents: antifungal agents. In Gilman AG, Rall TW, Sies AS, Taylor P (Eds.) *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Elmsford, Pergamon Press, 1996: 1165-1181.
5. Madrenys i Brunet N, Torres-Rodríguez JM. Anfotericina B complejo lipídico (ABLC): Nueva formulación de un antifúngico clásico. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13 (Supl 2): S95-S100.
6. Yeagle PL, Martin RB, Lala AK, Block K. Differential effects of cholesterol and lanosterol on artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4924-4926.
7. Ng TT, Denning DW. Fluconazole resistance in *Candida* in patients with AIDS-a therapeutic approach. *J Infect* 1993; 26: 117-125.
8. Horsburgh CR, Kirkpatrick CW. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. *Am J Med* 1983; 74: 23-29.
9. Warnock DW, Johnson EM, Richardson MD, Vickers CFH. Modified response to ketoconazole of *Candida albicans* from a treatment failure. *Lancet* 1983; i: 642-643.
10. Baily GG, Perry FM, Denning DW, Mandal BK. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. *AIDS* 1994; 8: 787-792.
11. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 1: 1-8.
12. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 463-471.
13. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol* 1994; 2: 393-400.
14. Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 1039-1047.
15. Vanden Bossche H, Marichal P, Gorrens J, Bellens D, Moereels H, Janssen PA. Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 alpha-demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 56-59.
16. Hitchcock CA, Russell NJ, Barrett-Bee KJ. Sterols in *Candida albicans* mutants resistant to polyene or azole antifungals, and of a double mutant *C. albicans* 6.4. *Crit Rev Microbiol* 1987; 15: 111-115.
17. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC, Le Jeune L, Coene MC. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 12: 2602-2610.
18. Ryley JF, Wilson RG, Barrett-Bee KJ. Azole resistance in *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 53-63.
19. Hitchcock CA, Barrett BK, Russell NJ. The lipid composition of azole-sensitive and

- azole-resistant strains of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1986; 132: 2421-2431.
20. Hitchcock CA, Barrett-Bee KJ, Russell NJ. The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 1987; 25: 29-37.
21. Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1992; 4: 695-703.
22. Odds FC. *Candida* and candidosis (2 Ed). London, Baillière Tindall, 1988.
23. Scherer S, Magee PT. Genetics of *Candida albicans*. Microbiol Rev 1990; 54: 226-241.
24. Kirsch DR, Kelly R, Kurtz MB. The genetics of *Candida*. En: Kirsch DR, Kelly R, Kurtz MB (Eds). Boca Raton, CRC Press, 1990.
25. Pla J, Pérez-Díaz RM, Navarro-García F, Sánchez M, Nombela C. Cloning of the *Candida albicans* HIS1 gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. Gene 1995; 165: 115-120.
26. Balzi E, Goffeau A. Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast. Biochim Biophys Acta 1991; 1073: 241-252.
27. Balzi E, Goffeau A. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. Biochim Biophys Acta 1994; 1187: 152-162.
28. Balzi E, Goffeau A. Yeast multidrug resistance: the PDR network. J Bioenerg Biomembr 1995; 27: 71-76.
29. Fling ME, Kopf J, Tamarkin A, Gorman JA, Smith HA, Koltin Y. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. Mol Gen Genet 1991; 227: 318-329.
30. Ben-Yaacov R, Knoller S, Caldwell GA, Becker JM, Koltin Y. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. Antimicrob Agents Chemother 1994; 4: 648-652.
31. Marger MD, Saier MH. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. Trends Biochem Sci 1993; 18: 13-20.
32. Sasnauskas K, Jomantiene R, Lebediene E, Lebedys J, Januska A, Janulaitis A. Cloning and sequence analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to cycloheximide. Gene 1992; 116: 105-108.
33. Jia Z-P, McCullough N, Wong L, Young PG. The amiloride resistance gene, *car1*, of *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Gen Genet 1993; 241: 298-304.
34. Becker JM, Henry LK, Jiang W, Koltin Y. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. Infect Immun 1995; 63: 4515-4518.
35. Goldway M, Teff D, Schmidt R, Oppenheim AB, Koltin Y. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BENR* gene. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 422-426.
36. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 1996; 10: 2300-2305.
37. Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. Curr Genet 1995; 27: 320-329.
38. Balzi E, Wang M, Leterme S, Van Dyck L, Goffeau A. *PDR5*, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator *PDR1*. J Biol Chem 1994; 269: 2206-2214.
39. Servos J, Haase E, Brendel M. Gene *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. Mol Gen Genet 1993; 236: 214-218.
40. Leppert G, McDevitt R, Falco SC, Van Dyk TK, Ficke MB, Golin J. Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. Genetics 1990; 125: 13-20.
41. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. CLUSTAL V. Improved software for multiple sequence alignment. Comput Appl Biosci 1992; 2: 189-191.
42. Higgins CF. The ABC of channel regulation. Cell 1995; 82: 693-696.
43. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2378-2386.
44. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology 1997; 143: 405-416.
45. Albertson GD, Niimi M, Cannon R, Jenkinson HF. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2835-2841.
46. Decottignies A, Kolaczowski M, Balzi E, Goffeau A. Solubilization and characterization of the overexpressed *PDR5* multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. J Biol Chem 1994; 269: 12797-12803.
47. Meyers S, Schauer W, Balzi E, Wagner M, Goffeau A, Golin J. Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes *PDR1* and *PDR5*. Curr Genet 1992; 21: 431-436.