

Análisis del perfil proteico de aislamientos clínicos de *Candida guilliermondii* sensibles y resistentes al fluconazol

Protein profile analysis of *Candida guilliermondii* clinical isolates sensitive and resistant to fluconazole

Salvador Gómez¹, Sandra Milena García², Catalina de Bedout³, Ana María García⁴

Resumen

Objetivo. El objetivo del estudio fue identificar posibles cambios en el perfil proteico de dos aislamientos clínicos de *Candida guilliermondii*, uno sensible y otro resistente al fluconazol, con el fin de discriminar las proteínas expresadas diferencialmente en relación con la resistencia a este antifúngico.

Métodos. Se aislaron fracciones procedentes de extractos proteicos citoplásmicos y de membrana o pared de un aislamiento resistente (CIM >256) y de otro sensible (CIM=4) al fluconazol, analizándolos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Resultados. Se identificaron cuatro bandas proteicas presentes en el aislamiento resistente al fluconazol y ausentes en el aislamiento sensible. En el extracto citoplásmico se encontraron tres proteínas, una de 16 kDa, de igual peso molecular a YNK1p (nucleósido difosfato cinasa), otra de 37 kDa de igual peso molecular a HEM13p (coproporfirinógeno III oxidasa) y a ADHp1 (alcohol deshidrogenasa) y una de 45 kDa. En el extracto de membrana o pared se encontró una banda de 25 kDa con peso molecular similar al de la HSP31p (cisteína proteasa).

Discusión. Este es el primer estudio de análisis proteico de la resistencia al fluconazol realizado con *C. guilliermondii*. Se identificaron algunas proteínas posiblemente asociadas con la resistencia a este azol, y se detectaron cuatro bandas expresadas diferencialmente en el aislamiento resistente, tres de ellas correspondientes a proteínas identificadas previamente en otras especies de *Candida* como relacionadas a resistencia y, la cuarta, una proteína de 45 kDa, no descrita previamente en otros estudios proteómicos realizados en este género; sin embargo, los estudios del análisis del perfil proteico de *C. guilliermondii* deben continuarse, desarrollando técnicas proteómicas más avanzadas y específicas, como el uso de 2D-DIGE y de espectrometría de masas.

Palabras clave: *Candida*, fluconazol, agente antifúngico, proteínas, electroforesis, SDS-PAGE.

Abstract

Objectives: The aim of this study was to identify possible changes in the protein profiles of two isolates of *Candida guilliermondii*, one sensitive and other resistant to fluconazole to recognize proteins differentially expressed in relation to the resistance to this antimycotic.

Methods: For this purpose, fractions from cytoplasm and membrane bound protein extracts from one resistant (MIC>256) and another sensitive (MIC=4) isolates were obtained and analyzed by SDS-PAGE.

Results: Four protein bands present in the resistant isolation and absent in the sensitive isolate were identified. In the cytoplasmic extract three proteins were identified, one of 16kDa with the same size to YNK1p (Nucleoside diphosphate kinase), other of 37kDa with similar size to HEM13p (Coprotoporphyrinogen III oxidase) and/or ADHp1 (Alcohol Dehydrogenase) and the last of 45kDa was not identified previously in other proteomic studies made with other *Candida* species. In the membrane extract, one band corresponding to 25kDa protein HSP31p (Cysteine protease) was found.

Conclusion: This is the first protein analysis study made in *C. guilliermondii* in which proteins potentially associated with resistance to fluconazole were found. In this research, four proteins bands differentially expressed and possibly associated to fluconazole resistance were identified. Three of these proteins, were previously described in other *Candida* species as related to azole resistance. The 45 kDa, hasn't been previously reported in other proteomic studies and could be specific to this species. Despite these results, further studies should be conducted on the protein profile of *C. guilliermondii* using more advanced and specific proteomic techniques as 2D-DIGE and mass spectrometry.

Key words: *Candida*, fluconazole, Antifungal Agents, proteins, electrophoresis, SDS-PAGE.

Introducción

Las levaduras del género *Candida* son causantes de micosis diseminadas y se las considera como agentes oportunistas por excelencia. La inmunosupresión y los tratamientos antimicrobianos han permitido el aumento de la frecuencia de

infecciones causadas por diferentes especies de este género ⁽¹⁻⁵⁾. En la última década se ha observado un aumento significativo de las especies de *Candida* no *albicans*, como agentes causante de micosis oportunistas, entre las que se incluye *Candida guilliermondii* ⁽⁶⁾. Esta última es causante de 0,7 % de las candidiasis a nivel

1 Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

2 Laboratorio de Micología y Fitopatología, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

3 Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín, Colombia

4 Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín, Colombia

Recibido: 27/07/2010; Aceptado:24/01/2011

Correspondencia: Ana María García, Carrera 72A N° 78B-141, Medellín, Colombia. Teléfono: (574) 4035950, extensión 231.

Dirección electrónica: agarcia@cib.org.co

mundial, 3,7 % en Latinoamérica ⁽⁷⁾, 4,0 % en Colombia ⁽⁸⁾ y 3,6 % en la ciudad de Medellín ⁽⁹⁾.

Para el tratamiento de las infecciones sistémicas por las especies de *Candida*, se recomienda el uso de fluconazol y de equinocandinas ⁽¹⁰⁾. La resistencia global de las especies de *Candida* al fluconazol muestra una variación entre 6,3 % y 26,1 %, dependiendo de la especie. En Latinoamérica se ha reportado 10,2 % de aislamientos de *C. guilliermondii* resistentes a fluconazol, con 12,9 % de aislamientos sensibles dependientes de la dosis ⁽⁹⁾; en Colombia, es de 12,7 %, con 23,6 % de los aislamientos sensibles dependientes de la dosis ⁽⁸⁾ y, en Medellín, la resistencia alcanza valores de 50 % y con 33,3 % de aislamientos sensibles dependientes de la dosis ⁽⁹⁾, lo cual muestra cómo en nuestro medio los valores de resistencia y de sensibles dependientes de la dosis al fluconazol son superiores a los de otras localidades geográficas, lo que permite postular a *C. guilliermondii* como un patógeno emergente ^(7-9,11).

Se han llevado a cabo estudios genómicos y proteómicos con *C. albicans* ⁽¹²⁾, *C. glabrata* ⁽¹³⁻¹⁵⁾, *C. lusitaniae* ⁽¹⁶⁾ y *C. krusei* ⁽¹⁷⁾, para determinar los mecanismos moleculares que rigen la resistencia al fluconazol, y se han identificado genes, proteínas y vías metabólicas asociadas a estos procesos. Sin embargo, no se han estudiado los mecanismos por los cuales *C. guilliermondii* adquiere la resistencia, ni se han determinado los genes y las proteínas involucrados.

El presente estudio buscó identificar cambios en el perfil proteico de un aislamiento de *C. guilliermondii* resistente y de uno sensible al fluconazol, provenientes de pacientes con candidiasis sistémica, lo que llevó a la identificación de cuatro bandas proteicas expresadas diferencialmente en el aislamiento resistente.

Metodología

Microorganismo y condiciones de crecimiento

Se trabajaron 25 aislamientos previamente identificados como *C. guilliermondii*, provenientes de

pacientes con micosis sistémicas causadas por este microorganismo, los cuales se encontraban almacenados en la colección de hongos existente en la Corporación para Investigaciones Biológicas. Todos estos aislamientos se cultivaron en agar Sabouraud (BBL™ *Brain Sabouraud Dextrose Agar*) para confirmar su identificación por API® y en RPMI (1640-Medium) para realizar el Etest® para fluconazol. El Etest® para el fluconazol produce resultados comparables con los obtenidos por el método de microdilución en caldo (BMD), método estándar determinado por el *Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI* antes conocido como *National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS)* ⁽¹⁸⁾, con correlaciones entre estas dos pruebas de 96 % ⁽¹⁹⁾ y 97 % ⁽²⁰⁾.

Para la obtención de los extractos proteicos, los aislamientos se cultivaron en cajas de Petri con agar Sabouraud® (Difco BBL) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, para su posterior inoculación e incubación en 5 ml de medio BHI líquido (Bacto™ *Brain Heart Infusión*, BBL) a 37 °C en agitación por 24 horas.

Caracterización fenotípica y determinación del perfil de resistencia

Para la confirmación del género y de la especie de los 25 aislamientos trabajados, se utilizaron los métodos del CHROMagar™ *Candida* (BD, USA) y API® (Biomerieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El perfil de resistencia a fluconazol se confirmó por medio del Etest® (AB Biodisk, Suiza; protocolo en <http://www.abbiobisk.com/pdf/pi/75002262.pdf>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se escogieron por conveniencia y basados en los perfiles de resistencia obtenidos, dos aislamientos de *C. guilliermondii*, uno sensible a fluconazol, aislamiento 49262 (CIM=4) y uno resistente, aislamiento 70451 (CIM>256).

Preparación de los extractos proteicos

Posterior al proceso de incubación de los aislamientos 49262 (sensible) y 70451 (resistente), se procedió a la recolección de las células por cen-

trifugación a 7.200 rpm por siete minutos en tubos de polipropileno de 1,5 ml a partir de 5 ml del cultivo. Las células se lavaron tres veces con 1 ml de solución tampón salina de fosfato (PBS) y el precipitado celular se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se volvió a suspender en PBS con inhibidores de proteasa (ref. P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y se centrifugó a 10.000 rpm, a 4 °C durante 20 minutos, separando el sobrenadante correspondiente a la fracción de proteínas citoplásmicas y el precipitado que correspondió a la fracción de proteínas de membrana o pared celular ⁽²¹⁾.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La SDS-PAGE se llevó a cabo como lo describen Sambrook *et al.* (22), trabajando con geles de poliacrilamida al 10 % y tiñendo con azul de Coomassie y plata. Se digitalizaron los geles para su análisis y los tamaños moleculares se evaluaron mediante el *software* VisionWorks®LS *Image Acquisition and Analysis Software* (UVP, USA).

Resultados

El análisis de la SDS-PAGE de la fracción citoplásmica (figura 1A), reveló la expresión de tres bandas de 45, 37 y 16 kDa presentes en el aislamiento resistente (a) y ausente en el aislamiento sensible (b). Además, en el análisis de la SDS-PAGE de la fracción de membrana o pared (figura 1B), se demostró la expresión de una banda de 25 kDa presentes en el aislamiento resistente (a) y ausentes en el aislamiento sensible (b).

Discusión

La implementación del uso de técnicas proteómicas para la determinación de la resistencia al fluconazol en *C. albicans* y *C. glabrata*, ha llevado al reconocimiento de nuevas moléculas relacionadas con dicha resistencia y, aunque la técnica de elección ha sido la electroforesis en dos dimensiones con fluorescencia (2D-DIGE) ya que ofrece mejor resolución, la técnica de elec-

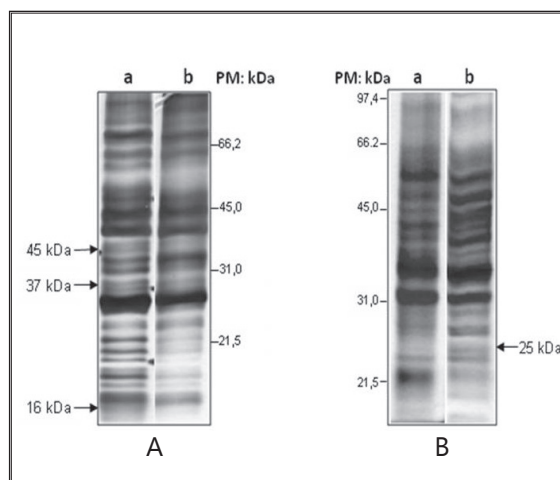


Figura 1. Comparación de los extractos proteicos de *Candida guilliermondii*. A. Extracto de proteínas citoplásmicas. a: aislamiento 70451 R. b: Aislamiento 49262 S. Las flechas muestran las bandas de 16 kDa, 37 kDa y 45 kDa expresadas por el aislamiento resistente a fluconazol. B. Extracto de proteínas de membrana/pared. a: aislamiento 49262 S. b: aislamiento 70451 R. La flecha señala la banda de 25 kDa expresada por el aislamiento resistente al fluconazol.

troforesis en una dimensión (1D) también se ha utilizado exitosamente en estudios previos encaminados a evaluar tal resistencia ^(13,14). Recientemente, Niimi *et al.* demostraron el aumento de la regulación de CDR1p (ATP-binding cassette transporter) y de ERG11p (14 α -demetilasa de lanosterol) en *C. glabrata*, como respuesta a su exposición al fluconazol, por medio del análisis de geles de electroforesis en 1D ⁽¹²⁾.

En el presente estudio se identificaron tres bandas proteicas (16 kDa, 37 kDa y 45 kDa) en el extracto citoplásmico y una (25 kDa) en el extracto de membrana o pared, presentes en el aislamiento resistente al fluconazol y ausentes en el aislamiento sensible. Aunque en el análisis cualitativo se observaron bandas de intensidad variable entre los aislamientos sensibles y los resistentes, que pudieran representar concentraciones variables de estas proteínas por expresión diferencial de sus genes, por ser de carácter cualitativo y no cuantitativo, en este estudio no se pueden analizar tales diferencias; otras metodologías, como el uso de 2D-DIGE o la evaluación por densitometría, podrían ayudar a resolver esta incógnita.

La banda de 16 kDa expresada diferencialmente en el presente estudio, coincide en tamaño molecular con una proteína previamente identificada por Massoumeh *et al.* en *C. albicans*, quienes mediante estudios 2D-DIGE y espectrometría de masas, demostraron que correspondía a YNK1p (nucleósido difosfato cinasa) ⁽¹⁵⁾, proteína previamente descrita en *Saccharomyces cerevisiae*. YNK1p está localizada en el espacio entre membranas de la mitocondria y es una enzima muy conservada, crucial para la homeostasis de los nucleósidos trifosfato y difosfatos, con los cuales cataliza la transferencia de fosfatos de los primeros a los segundos ⁽²³⁾. Aunque se ha estudiado la bioquímica de su actividad ^(24, 25) y en *Trypanosoma cruzi* se ha descrito la presencia de esta enzima en cepas resistentes a benzimidazoles ⁽²⁶⁾, su función y papel en la resistencia al fluconazol son aún desconocidos.

En un estudio realizado por Rogers *et al.* en *C. glabrata* ⁽¹⁴⁾, se encontraron dos proteínas de igual peso molecular a la banda de 37 kDa expresada diferencialmente del extracto citoplásmico de nuestro estudio. Estas proteínas corresponden a HEM13p (oxidasa de coproporfirinógeno III), estudiada en *S. cerevisiae*, como la enzima encargada de catalizar el sexto paso en la ruta de la biosíntesis del grupo hemo ^(27, 28), y a ADH1p (alcohol deshidrogenasa) ⁽¹⁴⁾, la cual está encargada de catalizar la conversión de acetaldehído a etanol y que microbiológicamente juega un papel fundamental en la formación de biopelículas microbianas, las cuales en las diferentes especies de *Candida* representan un importante factor de virulencia relacionado con la adhesión a catéteres ⁽²⁹⁾. Además, los estudios de RT-PCR en *C. albicans* demostraron que el aumento de la expresión de esta enzima se encuentra estrechamente relacionada con la resistencia al fluconazol ⁽³⁰⁾, lo que sugiere a esta proteína como un fuerte candidato para continuar estudios para definirla como un posible nuevo blanco terapéutico.

La banda de 25 kDa hallada en el extracto de proteínas de membrana o pared, presenta el mismo peso molecular que una proteína hallada por Ro-

gers *et al.* en *C. glabrata* ⁽¹⁷⁾, reconocida como una HSP31p (cisteína proteasa), la que, según experimentos realizados en *S. cerevisiae*, está involucrada en la protección contra las especies reactivas de oxígeno y su expresión se induce cuando el microorganismo está sometido a eventos de estrés oxidativo. Sin embargo, los mecanismos por los cuales actúa en tal forma no son claros ⁽³¹⁾ y, asimismo, su función en los procesos de resistencia al fluconazol debe esclarecerse.

De esta manera, las proteínas de 16 kDa, 37 kDa y 25 kDa halladas en este estudio, se han descrito como relacionadas con la resistencia a benzimidazoles de *Trypanosoma cruzi* ⁽¹⁹⁾, a la formación de biopelículas microbianas ⁽¹⁷⁾ y a la protección contra las especies reactivas de oxígeno ⁽³⁷⁾, respectivamente. Sin embargo, el hecho de encontrar proteínas con pesos moleculares similares a otras proteínas descritas por diversos autores, no ratifica su identidad, por lo cual se hace necesario realizar nuevos estudios de mayor complejidad para caracterizarla. Para estos fines, podrían utilizarse técnicas de 2D-DIGE para mejorar la resolución en la separación de las proteínas y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas que llevará a la identificación de las proteínas bajo estudio.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Centro para Investigación y Desarrollo, CIDI, de la Universidad Pontificia Bolivariana (Número de radicado: 236A-06/08-52).

A la Unidad de Micología Médica y Experimental de la Corporación para Investigaciones Biológicas, por suministrar los aislamientos para la realización del estudio, en especial, a Ángela Tabares por su colaboración en la identificación de los microorganismos.

A la Unidad de Bacteriología de la Corporación para investigaciones Biológicas, por el gentil préstamo del *software* para el análisis de geles: VisionWorks®LS Image Acquisition and Analysis Software.

A Lina Martínez y al Semillero de Investigación de la Facultad de Medicina, SIFAM, de la Universidad Pontificia Bolivariana.

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo no presentan ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Finquelievich JL. Candidiasis. En: Restrepo A, Robledo J, Restrepo M, Botero D, Bedoya V, editores. Enfermedades infecciosas. Sexta edición. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p. 268-74.
2. Marodi L. Local and systemic host defense mechanisms against *Candida*: Immunopathology of candidal infections. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;1:795-801.
3. Hostetter MK. An integrin-like protein in *Candida albicans*: Implications for pathogenesis. *Trends Microbiol*. 1996;4:242-6.
4. Franklin C, Metry M. Life-threatening *Candida* infections in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 1992;7:127-37.
5. Edwards JE. Invasive *Candida* infections, evolution of a fungal pathogen. *N Engl J Med*. 1991;11:1060-2.
6. Cardona N. Género *Candida*. En: Restrepo A, Díaz F, Estrada S, Franco L, Jaramillo J, Maestre A, et al., editores. Microbiología de las infecciones humanas. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 657-65.
7. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1366-77.
8. Caro C. ARTEMIS disk antifungal surveillance study. Annual Summary Report. Colombia. Bogotá: Pfizer; 2008.
9. Zuluaga A, de Bedout C, Agudelo CA, Hurtado H, Arango M, Restrepo A, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001-2007). *Rev Iberoam Micol*. 2010;27:125-9.
10. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. 2009;48:503-35.
11. Pfaller M, Diekema D, Méndez M, Kibbler C, Erzsébet P, Chang S, et al. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3551-6.
12. Massoumeh Z, Barker K, Hooshdaran MZ, Hilliard GM, Kusch H, Rogers PD. Proteomic analysis of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2733-5.
13. Berila N, Borecka S, Dzugasova V, Bojnansky J, Subik J. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:574-8.
14. Rogers PD, Vermitsky J, Edlind T, Hilliard G. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:434-8.
15. Niimi M, Nagai Y, Niimi K, Wada S, Canoon RD, Monk BC, et al. Identification of two proteins induced by exposure of the pathogenic fungus *Candida glabrata* to fluconazole. *J Chromatogr B Analyt Technol B*. 2002;782:245-52.
16. Reboutier D, Boisnard S, Conti A, Chevalier V, Florent M, Da Silva B, et al. Combination of different molecular mechanisms leading to fluconazole resistance in a *Candida lusitanae* clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63:188-93.
17. Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, de Groot MJ, Burt C, Filler SG, et al. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;4:1213-9.
18. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghanoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:643-58.
19. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Diekema DJ, et al. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1087-90.
20. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1781-4.
21. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Cell wall fractionation for yeast and fungal. En: A. Posch. 2D-PAGE: Sample preparation and fractionation (Methods in Molecular Biology 425). Second edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 217-37.
22. Sambrook J, Russel D. Commonly used techniques in molecular cloning. In: Sambrook J, Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition. New York: CSHL PRESS; 2001. p. A8.1-54.
23. Amutha B, Pain D. Nucleoside diphosphate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, Ynk1p: Localization to the mitochondrial intermembrane space. *Biochem J*. 2003;370:805-15.
24. Biondi RM, Veron M, Walz K, Passeron S. *Candida albicans* nucleoside-diphosphate kinase: Purification and characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1995;323:187-94.
25. Lascu I, Gonin P. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32:237-46.
26. Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benzimidazole. *J Proteome Res*. 2008;7:2357-67.
27. Zagorec M, Buhlers JM, Treichl I, Kengll T, Guarentell L, Labbe-Boiss R. Isolation, sequence, and regulation by oxygen to hfe yeast *HEM13* gene coding for coproporphyrinogen oxidase. *J Biol Chem*. 1988;263:9718-24.
28. Phillips JD, Whitby FG, Warby CA, Labbe P, Yang C, Pflugrath JW, et al. Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004;279:38960-8.
29. Mukherjee PK, Mohamed S, Kuhn D, Liu S, Munyon R, et al. Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect Immun*. 2006;74:3804-16.
30. Zhu YN, Lu SM. Application of differential display-PCR technique in fluconazole-resistance gene expression of *Candida*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2005;34:157-62.
31. Skoneczna A, Miciałkiewicz A, Skoneczny M. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:1409-20.