

Rezistencia mikroorganizmov proti antifungálnym látkam Biochemický a genetický základ rezistencie kvasiniek proti mucidínu

J. ŠUBÍK — G. TAKÁCSOVÁ

Jedným z faktorov negatívne ovplyvňujúcich v praxi efektívnosť antimikróbných látok je rezistencia mikroorganizmov proti nim. V populácii mikroorganizmov, či už baktérií, kvasiniek alebo vlákňitých húb, vznikajú rezistentné mutanty, ktoré v dôsledku špecifických zmien v štruktúre alebo obsahu bunkového genómu sú schopné tolerovať vyššie koncentrácie biocídnych látok ako pôvodná populácia mikroorganizmov [1, 2].

V mikroorganizmoch rezistencia proti antimikróbnym látkam môže vzniknúť v dôsledku mutácií bunkového genómu, pričom gény rezistencie môžu byť umiestené na chromozónoch (jadrová DNA, bakteriálny chromozóm) alebo na extrachromozomálnych genetických elementoch (mitochondriálna DNA, plazmidová DNA). V baktériách rezistencia môže vzniknúť aj v dôsledku získania dodatkového genetického determinantu podmieňujúceho rezistenciu od iných baktérií. Prenos takýchto rezistentných faktorov v bakteriálnej populácii sa môže uskutočňovať i medzidruhovým spôsobom [1].

Za normálnych okolností mutanty mikroorganizmov rezistentné proti antimikróbnym látkam vznikajú spontánne a ich selekcia prebieha v prítomnosti týchto látok. Neprekvapuje preto, že v istých prípadoch mutanty rezistentné proti antimikróbnym látkam vznikli dávno pred zavedením týchto látok do praxe [3].

Prírodná potenciálna schopnosť mikroorganizmov vyvinúť rezistenciu proti biocídu závisí od typu biocídu a povahy mikroorganizmu. Túto schopnosť, ktorej rozsah udáva frekvencia spontánnych mutácií, možno významne zvýšiť účinkom rozličných fyzikálnych alebo chemických mutagénov [4].

Vznik rezistencie proti antimikróbnym látkam môžu z biochemického hľadiska spôsobovať zmeny v mikrobiálnej bunke, ktoré v menšom alebo väčšom rozsahu zabráňujú biocídu dosiahnuť miesto svojho účinku. Takéto zmeny zahŕňajú zníženie permeability plazmatickej membrány pre inhibítor alebo zvýšenie detoxikáciu inhibítora ešte pred dosiahnutím miesta účinku. Ak je inhibítor schopný toto miesto dosiahnuť, rezistencia môže vzniknúť v dôsledku zníženej afinity medzi inhibítorom a jeho reakčným miestom, obchádzkou blokovaného miesta v dôsledku funkcie alternatívnej metabolickej dráhy

alebo kompenzáciou efektu inhibície, napr. zvýšenou syntézou inhibovaného enzýmu [1, 2, 5].

Na pochopenie biochemického a fyziologického pozadia rezistencie mikroorganizmov proti inhibítorom je potrebná znalosť spôsobu účinku príslušného inhibítora. Na druhej strane však štúdium kmeňov rezistentných proti inhibítorom môže dopĺňať získané údaje alebo niekedy môže viesť i k rozriešeniu zatiaľ neobjasneného mechanizmu jeho pôsobenia.

Vzhľadom na to, že pri eukaryotických mikroorganizmoch sú biochemické a genetické aspekty mikrobiálnej rezistencie preštudované oveľa menej než v prípade prokaryotických baktérií, rozhodli sme sa skúmať na modelovom systéme základné otázky týkajúce sa rezistencie mikroorganizmov proti antifungálnym látkam. Ako antifungálnu látku sme použili antibiotikum mucidín, ktorý je špecifickým inhibítorom oxidácie mitochondriálneho cytochrómu *b* [6, 7], a ako mikroorganizmus sme si zvolili kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, ktorej genetika a biochemické vlastnosti sú dobre preštudované [8].

Materiál a metódy

1. Použité mikroorganizmy

V práci sme použili tieto kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*: D 225—5A (α adel lys2 ϱ^+ C^SE^SO^SM^S), DPI-1B (α his1 trp1 ϱ^+ ω^+ C^SE^SO^SM^S), IL8-8D (a ura1 ϱ^+ ω^+ C^R₃₂₁ E^R₂₂₁ O^SM^S), IL 126—1C (a ura1 ϱ^+ ω^- C^R₃₂₁ E^R₂₂₁ O^SM^S), IL458-1A (α his1 ϱ^+ C^R₃₂₁ E^R₂₂₁ O^SM^S), 55R5-3C/1 (a ura1 ϱ^+ ω^- C^SE^SO^RM^S) a 55R5—3C/11 (a ura1 ϱ^-), pochádzajúce zo zbierky prof. P. P. Slonimského (CNRS, Gif sur Yvette, Francúzsko) a kmeň 26—4 (a leu1 thr 2—1 ϱ^+ C^SE^SO^SM^S) pochádzajúci od dr. A. Putramentovej (PAN, Warszawa, Poľsko).

2. Kultivačné podmienky

Bunky kvasiniek rástli pri 30 °C za aeróbných podmienok v rastových médiách tohto zloženia:

Glukózové médium — obsahovalo v 1 litri 20 g glukózy, 5 g peptónu, 5 g kvasničného extraktu, 100 mg adenínu a zmes minerálnych solí [6].

Glycerolové médium — ako glukózové médium, ale namiesto glukózy obsahovalo 20 g glycerolu.

Minimálne médium — obsahovalo glukózu (2 %), zmes solí ako v glukózovom médiu a zmes vitamínov pozostávajúcich z 10 mg inozitolu, 1 mg tiamín-HCl, 600 μ g pyridoxín-HCl, 600 μ g kyseliny nikotínovej, 600 μ g kyseliny *p*-aminobenzoovej, 600 μ g pantotenanu vápenatého, 10 μ g biotínu a 200 μ g riboflavínu v 1 litri média). V doplnených minimálnych médiách konečné koncentrácie aminokyselín a adenínu boli: 300 μ g/ml *L*-treonínu, 30 μ g/ml *L*-leucínu, 30 μ g/ml *L*-lyzínu a 100 μ g/ml adenínu.

Glycerolové médiá s antibiotikami — pripravili sa pridaním rozpusteného antibiotika v etanole k autoklávovanému glycerolovému médiu (20 min/120 °C) schladenému na 60 °C. Ak nie sú iné údaje, konečné koncentrácie antibiotík boli: 4 mg chloramfenikolu/ml, 10 μ g oligomycínu/ml, 4 mg erytromycínu/ml a 0,5 μ g mucidínu/ml.

V pevných médiách sa agar použil v 2 % koncentrácii s výnimkou minimálneho média, kde bol 3 %.

Predsporulačné médium — obsahovalo 0,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 % KH_2PO_4 , 0,5 % kvasničný extrakt, 2 % agar, 2 % glukózu a 2 % laktát.

Sporulačné médium — obsahovalo 1 % acetát draselný, 0,1 % kvasničný extrakt, 0,05 % glukózu a 2 % agar.

3. Izolácia buniek zbavených mitochondriálnej DNA

Bunky kvasiniek vyrastené v tekutom glukózovom médiu obsahujúcom 25 μM etídiumbromidu pri 30 °C sa inokulovali do média toho istého zloženia a inkubovali ďalších 24 hodín. Po premytí sa bunky vysiali na pevné glycerolové médium a kolónie buniek neschopných dýchať pre stratu mitochondriálnej DNA sa identifikovali farbením pomocou trifenyltetrazóliumchloridu.

4. Mitotická segregácia [10]

Kvôli tvorbe zygot haploidné kmene kvasiniek opačných pohlavných typov obsahujúcich príslušné genetické znaky rástli 24 hodín v tekutom glukózovom médiu alebo 3 dni na pevných glycerolových médiách, obsahujúcich príslušné antibiotikum. 10^6 až 10^7 buniek obidvoch pohlavných typov sa zmiešalo v čerstvom glukózovom médiu, centrifugovalo (5 min pri 1600 g) a po dvojhodinovom státi opäť premiešalo. Po 24 hodinách sa 0,1 ml kultúry vysialo na pevné minimálne médium. Vyrastené zygoty sa po 2—3 dňoch rastu zmyli z misiek a opäť sa vysiali na pevné minimálne médium tak, aby ich počet na jednej miske bol približne 50 buniek. Takto vyrastené samostatné kolónie sa po troch dňoch replikovali na príslušné glycerolové médiá obsahujúce daný inhibítor. Rast replík sa kontroloval po troch a šiestich dňoch inkubácie pri 30 °C.

5. Tetrádová analýza [8]

Diploidné bunky po mitotickej segregácii rástli 24 hodín na predsporulačnom agare a potom sa umiestnili na sporulačný agar. Po troch až piatich dňoch rastu pri 30 °C vysporulované kultúry sa natrávili enzymatickým výťažkom zo žalúdka slimákov a asky obsahujúce 2, 3, resp. 4 spóry sa rozrezali mikromanipulátorom. Izolované spóry sa inkubovali 2 až 4 dni na pevnom glukózovom médiu a preniesli na to isté čerstvé médium. Tetrády sa potom testovali na schopnosť rásť na glycerolových médiách obsahujúcich príslušné antibiotiká i na príslušné genetické znaky.

6. Určenie respiračnej rýchlosti

Spotreba kyslíka celých buniek kvasiniek sa určila polarograficky vibračnou zlatou elektródou v reakčnej zmesi obsahujúcej v 2 ml: 50 mM glutarát draselný, 10 mM KH_2PO_4 , 100 mM KCl, 0,25 % glukózu, 0,48 % etanol, bunky kvasiniek (1—4 mg sušiny) a inhibítor, konečné pH 4,3.

Spotreba kyslíka mitochondrií kvasiniek izolovaných postupom podľa Kováča a spol. [11] sa určila polarograficky v reakčnej zmesi obsahujúcej

v 2 ml: 0,6 M manitol, 20 mM KCl, 1,5 mM EDTA, 10 mM Tris-maleát, 10 mM fosforečnan draselný, 0,25 mM ADP, mitochondrie (1—3 mg bielkovín), substrát a inhibítor ako bolo udané, konečné pH 6,4. Mitochondriálne bielkoviny sa stanovili biuretom [12].

Všetky merania respiračnej rýchlosti prebiehali pri 30 °C.

7. Určenie aktivity ATPázy

Aktivita mitochondriálnej ATPázy sa merala 6 minút pri 30 °C v 1 ml reakčnej zmesi obsahujúcej 10 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM ATP, 0,1 mg mitochondriálnych bielkovín a inhibítor ako bolo udané. Konečné pH bolo 9,5. Anorganický fosfát sa stanovil Sumnerovou metódou [13].

8. Použité chemikálie

Použili sa tieto chemikálie: oligomycín, *N, N, N', N'*-tetrametyl-*p*-fenyléndiamín (TMPD), antimicin A, karbonylkyanid-*m*-chlórphenylhydrazón (CCCP) a etídiumbromid (Serva, Heidelberg), chloramfenikol (Spofa, Praha), erytromycín báza alebo laktobionát (Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois). Mucidín bol dar dr. V. Musílka (Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha). Dimerkaptopropanol (BAL) a 2-heptyl-4-hydroxychinolín-*N*-oxid (HQNO) boli dar dr. G. S. P. Groota (University Amsterdam, Holandsko). Ostatné chemikálie sú výrobky firmy Lachema, Brno.

Výsledky

1. Biochemické aspekty rezistencie kvasiniek proti mucidínu

1.1 Rastová charakteristika mutantov rezistentných na mucidín

Mucidín v koncentrácii 0,2 $\mu g/ml$ inhiboval rast všetkých testovaných kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae* na pevných glycerolových médiách. Mutanty kvasiniek rezistentné proti mucidínu bolo možné preto izolovať na základe ich schopnosti rásť na glycerolových médiách v prítomnosti mucidínu. Frekvencia vzniku mutantov rezistentných proti mucidínu pri štandardnom kmeni D 225—5A ako výsledok spontánnych mutácií bola 10^{-8} až 10^{-9} . Ak sa však bunky kultivovali v tekutom glukózovom médiu bez horečnatých iónov v prítomnosti 6 až 10 mM $MnCl_2$ [9], frekvencia vzniku mutácií sa zvýšila takmer stonásobne.

Tabuľka 1 udáva niektoré vlastnosti vybraných spontánne vzniknutých kmeňov kvasinky *S. cerevisiae* rezistentných proti mucidínu [9], ktoré na základe získaných výsledkov sa dali rozdeliť na tri odlišné fenotypické skupiny. Mutanty 1. skupiny, tvoriace väčšinu izolovaných mutantov, ukazovali združenú rezistenciu proti inhibítorom syntézy bielkovín, ako aj proti inhibítorom dýchania a oxidatívnej fosforylácie. Mutanty 2. skupiny boli špecificky rezistentné proti mucidínu. Jediný mutant tvoriaci 3. skupinu mal rozsah združenej

Tab. 1. Tolerancia na mucidín a združená rezistencia mutantov rezistentných proti mucidínu. Rezistencia proti mucidínu je definovaná ako maximálna koncentrácia umožňujúca normálny rast kmeňa. Pri určení združenej rezistencie inhibícia funkcie mitochondrií je vyjadrená ako priemer zóny inhibície rastu na pevnom glycerolovom médiu spôsobený inhibítorom po troch dňoch rastu. Množstvo inhibítorov aplikovaných na disk je uvedené v tabuľke

Skupina	Kmeň	Genotyp	Tolerancia na mucidín in vivo ($\mu\text{g/ml}$)	Združená rezistencia k inhibítorom						
				Mucidín (5 μg)	Antimycín A (0,2 μg)	Oligomycín (20 μg)	Karbonylkyanid <i>m</i> -chlorofenylhydrazón (10 μg)	Etidiumbromid (20 μg)	Chloramfenikol (3 mg)	Erytromycín (2,5 mg)
				Priemer zóny inhibície (mm)						
1	1D	muc ^{PR}	0,5							
	2D	muc ^{PR}	0,5	26	25	15	26	20	14	24
2	3D	M _{3D} ^R	2,0	20	42	17	60	17	40	45
	101—4B	M ₁₀₁ ^R	1,0							
3	101	muc ^{PR} M ₁₀₁ ^R	$\geq 40,0$	0	25	12	25	20	14	25
Štandardný kmeň		D 225—5A	0,1	45	42	22	40	20	17	32

rezistencie podobný ako mutanty 1. skupiny, ale navyše bol rezistentný proti extrémne vysokým koncentráciám mucidínu.

Pri detailnejšom štúdiu vlastností uvedených mutantov sa zistilo, že rastové rýchlosti mutantov 1D a 2D sa významne nelíšia od rastových rýchlostí štandardného kmeňa D 225—5A, keď bunky rástli aeróbne na pevných glycerolových alebo v tekutých glukózových médiách s 0,5 % glukózou ako zdrojom uhlíka. V poslednom prípade sa stacionárna fáza rastu dosiahla po 24 hodinách kultivácie. Naproti tomu mutant 3D dosiahol stacionárnu fázu rastu po 72 hodinách rastu a mutanty 101 a 101—4B po 40 hodinách. Rozdiely v rýchlosti rastu na neskvastelných substrátoch sa prejavili aj v odlišnej veľkosti kolónií po raste mutantov rezistentných proti mucidínu na pevnom glycerolovom médiu. Aeróbne rastové výťažky a cytochrómové spektrá mutantov, dorastných do stacionárnej fázy v tekutých médiách, významne sa nelíšili od rastových výťažkov a cytochrómového spektra štandardného kmeňa D 225—5A. Tieto zistenia naznačujú, že energetické spriahnutie v mitochondriách neovplyvňujú mutácie podmieňujúce rezistenciu proti mucidínu.

1.2 Vplyv mucidínu a iných inhibítorov na intaktné bunky a izolované mitochondrie

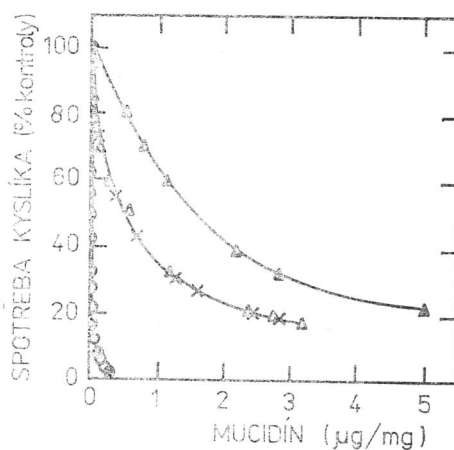
Výskum inhibície dýchania celých buniek mucidínom ukázal, že v porovnaní s pôvodným materským kmeňom D 225—5A je citlivosť mutantov proti

mucidínu 2- až 460-násobne nižšia. Mutant 101 bol najrezistentnejší, čo súhlasí s údajmi rastovej charakteristiky tohto kmeňa. Vplyv mucidínu a príbuzných inhibítorov dýchacieho reťazca na spotrebu kyslíka celými bunkami uvádza tabuľka 2. Vidieť, že respiračná aktivita kmeňov 2D a 101 je rezistentnejšia tak proti mucidínu, ako aj proti antimycínu A a HQNO, kým dýchanie buniek mutantov 3D a 101—4B bolo špecificky rezistentné iba proti mucidínu.

Tab. 2. Inhibícia dýchania celých buniek rôznymi inhibítormi dýchacieho reťazca

Skupina	Kmeň	$(\mu\text{l O}_2/\text{hod}/\text{mg suš.})$ QO_2	I_{50} hodnoty inhibítorov ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
			Mucidín	Antimycín A	HQNO
1	2D	104,0	0,03	0,015	16,0
2	3D	26,8	2,40	0,005	3,0
	101—4B	25,8	0,40	0,006	3,0
3	101	35,2	7,40	0,020	18,2
Štandardný kmeň	D 225—5A	98,5	0,016	0,0045	3,3

Vplyv mucidínu na dýchanie izolovaných mutantných mitochondrií znázorňuje obrázok 1. V porovnaní so štandardným kmeňom mutantné kmene 3D, 101—4B a 101 na rozdiel od kmeňa 2D boli menej citlivé na mucidín. Koncentrácie potrebné na 50 % inhibíciu dýchania pri kmeňoch D 225—5A, 2D, 3D, 101—4B a 101 boli: 0,016, 0,020, 1,5, 0,45 a 0,50 μg mucidínu na 1 mg mitochondriálnych bielkovín. Takto iba mutanty 2. a 3. skupiny ukazovali zmenenú odpoveď na mucidín tak in vivo, ako aj na úrovni izolovaných mitochondrií.



Obr. 1. Vplyv mucidínu na respiračnú aktivitu izolovaných mitochondrií oxidujúcich citrát ako substrát. ● ———● štandardný kmeň D 225-5A; ○ ———○ 2D; △ ———△ 101-4B; ▲ ———▲ 3D; × ———× 101

Citlivosť na mucidín mutantu 101—4B bola rovnaká ako v prípade kmeňa 101 na mitochondriálnej úrovni, hoci bola oveľa vyššia na úrovni celých buniek.

Vplyv iných inhibítorov cytochrómu bc_1 oblasti respiračného reťazca na biologickú oxidáciu sa sledoval aj na úrovni izolovaných mitochondrií. Ako pri živočíšnych mitochondriách, titračné krivky pre antimycín A boli sigmoidálne pre štandardný kmeň i pre všetky testované mutanty. Koncentrácie dávajúce 50 % inhibíciu dýchania kmeňov D 225—5A, 2D, 3D a 101—4B boli 0,035, 0,035, 0,042 a 0,053 μg antimycínu A na 1 mg bielkovín. Takéto významnejšie zvýšenie rezistencie proti antimycínu sa nepozorovalo ani pri jednom z testovaných mutantov. Podobný záver vyplynul aj pre HQNO, t. j. inhibítor miestom svojho účinku podobný antimycínu A [14]. Koncentrácie potrebné na 50 % inhibíciu dýchania kmeňov D 225—5A, 2D, 3D, 101—4B a 101 boli: 0,35, 0,32, 0,28, 0,26 a 0,30 μg HQNO na 1 mg bielkovín. Citlivosť dýchania mitochondrií na inhibičný účinok 2,3-dimarkaptopropanolu sa testoval iba s mutantmi 3D a 101—4B. Významný rozdiel medzi kmeňmi rezistentnými na mucidín a štandardným kmeňom sa však ani v tomto prípade nepozoroval. Koncentrácie 2,3-dimarkaptopropanolu vyvolávajúce 50 % inhibíciu dýchania izolovaných mitochondrií kmeňov 3D, 101—4B a D 225—5A boli: 0,7, 0,85 a 0,6 $\mu\text{mol/mg}$ bielkovín.

V dôsledku združenej rezistencie mutantov rezistentných na mucidín 1. a 3. skupiny proti oligomycínu, preštudovali sme aj vlastnosti Mg^{2+} aktivovanej ATPázy mitochondrií izolovaných zo štandardného kmeňa a mutantov 2D, 3D, 101—4B a 101 (tab. 3). Nijaké významné rozdiely v citlivosti mitochondriálnej

Tab. 3. Vlastnosti mitochondriálnej ATPázy mutantov rezistentných proti mucidínu

Skupina	Kmeň	Špecifická aktivita ($\mu\text{mol P/min/mg}$ bielkovín)	Citlivosť na oligomycín I_{50} ($\mu\text{g/mg}$ bielkovín)
1	2D	3,7	1,9
2	3D	3,7	1,9
	101—4B	3,9	2,0
3	101	3,6	2,0
Štandardný kmeň	D 225—5A	3,6	1,8

ATPázy na oligomycín medzi štandardným kmeňom a mutantmi rezistentnými proti mucidínu sa však nenašli. Značí to, že mutácie v študovaných mutan-
toch neovplyvňujú základné vlastnosti energiu transdukujúceho systému mitochondriálnych membrán. Pri mutantoch 1. skupiny rezistencia proti oligomycínu (pravdepodobne i proti iným inhibítorom), podobne ako rezisten-
cia proti mucidínu sa dá takto demonštrovať iba na úrovni celých buniek a nepozorovala sa na úrovni izolovaných mitochondrií.

2. Genetické aspekty rezistencie kvasiniek proti mucidínu

2.1 Jadrová a mitochondriálna dedičnosť rezistencie proti mucidínu

Všetky mutanty kvasiniek rezistentné proti mucidínu boli stabilné a vhodné na genetickú analýzu. Analýzu dominancie/recesívnosti uvádza tabuľka 4. Úroveň rezistencie diploidov pochádzajúcich z mutantných kmeňov 1D a 2D bola rovnako nízka ako v prípade diploidov pochádzajúcich zo štandardných kmeňov. V diploidoch odvodených z mutantných kmeňov 3D a 101-4B rezistencia proti mucidínu bola rovnako vysoká ako v prípade haploidov. Rezistencia diploidov odvodených od mutantu 101 bola nižšia ako v prípade haploidného kmeňa, avšak vyššia ako v prípade štandardného kmeňa. Mutácie mutantov 1. skupiny sú takto recesívne, kým mutácie mutantov 2. skupiny sú dominantné. Povahu semidominantne sa prejavujúcich mutácií kmeňa 101 v ďalšej časti práce vysvetlíme jej komplexným genetickým pozadím.

Tab. 4. Rezistencia diploidov proti mucidínu, vzniknutých krížením kmeňov rezistentných proti mucidínu a senzitívnych na mucidín

Skupina	Kmeň	Tolerancia k mucidínu ($\mu\text{g/ml}$)	
		Haploidy	Diploidy
1	1D	0,5	0,1
	2D	0,5	0,1
2	3D	2,0	2,0
	101—4B	1,0	1,0
3	101	$\geq 40,0$	1,0
Štandardný kmeň	D 225—5A	0,1	0,1

Kvantitatívnou analýzou diploidného potomstva [10, 15] po genetickom krížení haploidných buniek sa zistilo, že mutanty 1. skupiny 1D a 2D nevykazujú mitotickú segregáciu (tab. 5). Všetky bunky diploidného potomstva boli citlivé na mucidín, čo odpovedá jadrovému spôsobu dedičnosti. Mitotická segregácia typov buniek rezistentných proti mucidínu a citlivých na mucidín sa pozorovala iba s mutantmi 3D, 101-4B a 101, čo naznačuje cytoplazmatický spôsob dedičnosti.

Rast mutantov 3D, 101-4B a 101 v prítomnosti etídiumbromidu má za následok transformáciu týchto mutantov na cytoplazmatické petity (φ^-). Toto malo za následok úplnú stratu determinantov mucidínovej rezistencie, čo sa prejavilo vlastnosťami odpovedajúcich diploidov (tab. 5). Na druhej strane, keď sa mutanty 3D, 101-4B a 101 krížili so sesterskými kmeňmi transformovanými etídiumbromidom na petity (pravdepodobne φ^0), mitotická segregácia sa nepozorovala — všetky diploidy boli rezistentné proti mucidínu. Tieto výsledky naznačujú, že obidve mutácie rezistentné proti mucidínu,

Tab. 5. Mitotická segregácia: kvantitatívna analýza diploidného potomstva

Kríženie	Kmeň $\alpha \times \underline{a}$	Diploidy rezistentné proti mucidínu (% z počtu kolónií)	Počet analyzovaných kolónií
q^+MR s q^+MS	1D \times 26—4	0	950
	2D \times 26—4	0	1032
	3D \times 26—4	68,9	893
	101—4B \times 26—4	62,4	494
	101 \times 26—4	72,3	1029
q^- z MR s q^+MS	1D \times 26—4	0	930
	2D \times 26—4	0	945
	3D \times 26—4	0	1020
	101—4B \times 26—4	0	744
	101 \times 26—4	0	859
q^+MR s q^- z MS	1D \times 26—4	0	630
	2D \times 26—4	0	842
	3D \times 26—4	100	1063
	101—4B \times 26—4	100	1034
	101 \times 26—4	100	1629

MR_{3D} pri kmeni 3D a MR_{101} pri kmeni 101-4B a 101, sú lokalizované na mitochondriálnom genóme.

Výsledky tetradovej analýzy vybraných mutantov každej fenotypickej skupiny uvádza tabuľka 6. Všetky tetrády získané z mutantu 2D ukazovali segregáčny pomer 2 : 2 (R : S) pre rezistenciu proti mucidínu, poskytujúce dôkaz, že mutáciu vyvolávajúcu fenotyp združenej rezistencie kóduje jediný jadrový gén, označený *muc^{PR}*. Na druhej strane segregácia alel pri meióze sa nepozorovala s mutantom 3D, čo potvrdzuje mimojadrovú povahu jeho mutácie.

Tab. 6. Analýza tetrád

Kríženie, z ktorého diploidy sporulovali $\alpha \times \underline{a}$	Fenotyp diploidov	Počet tetrád $\frac{\text{úplných}}{\text{neúplných}}$	Meiotická segregácia tetrád ⁺ (R : S)
2D \times 26—4	senzitívny na mucidín	17	2 : 2 ⁺⁺
3D \times 26—4	senzitívny na mucidín	16	0 : 4
3D \times 26—4	rezistentný proti mucidínu	4	4 : 0
		14	3 : 0
		2	2 : 0
101 \times 26—4	senzitívny na mucidín	17	2 : 2 ⁺⁺
101 \times 26—4	rezistentný proti mucidínu	10	4 : 0
		3	3 : 0

⁺ Jadrové genetické markery segregovali normálne vo všetkých prípadoch.

⁺⁺ Ten istý segregáčny pomer sa pozoroval aj pre rezistenciu proti chloramfenikolu.

Dedičnosť rezistencie proti mucidínu pri mutante 101 bola komplexnejšia. Všetky tetrády odvodené z diploidov citlivých na mucidín po mitotickej segregácii ukazovali segregáčny pomer 2 : 2 (R : S) pre rezistenciu proti mucidínu. Tieto výsledky indikujú, že mutant 101 obsahuje jediný recesívny jadrový gén podmieňujúci rezistenciu proti mucidínu a súčasne aj proti iným štruktúrne a funkčne odlišným inhibítorm. Na druhej strane však segregáčny pomer 4 : 0 (R : S) pri tetrádach odvodených z diploidov rezistentných proti mucidínu naznačuje, že mutant 101 popri gène *muc*^{PR} obsahuje ešte aj ďalší cytoplazmatický genetický determinant (M_{101}^R), ktorý je zodpovedný za rezistenciu proti mucidínu. Tento záver potvrdzujú aj vlastnosti mutantu 101-4B izolovaného po meióze z diploida 101R rezistentného proti mucidínu, vzniknutého krížením kmeňov 101 a 26—4, obsahujúceho jedine mitochondriálnu alelu M_{101}^R , ktorá zodpovedá za rezistenciu proti mucidínu tak in vivo, ako aj in vitro.

2.2 Alelizmus mutácií rezistentných proti mucidínu

Ako sme už uviedli, mutanty 1D, 2D a 101 rezistentné proti mucidínu, izolované z kmeňa D 225-5A, obsahujú recesívne jadrové mutácie podmieňujúce rezistenciu proti mucidínu. Aby bolo možné určiť, či sa tieto mutácie týkajú jedného alebo viacerých genetických lokusov, vykonali sa kríženia alelického testu opísané v tabuľke 7. Pred krížením bolo však potrebné transformovať mutáciu kmeňa 2D prostredníctvom meiózy (2D × 26-4) do kmeňa 2D-22D pohlavného typu *a* (*a* *ade1* *leu1* *muc*^{PR}). Podobne kmeň 101-7C (*a* *ade1* *lys2* *muc*^{PR}) sa izoloval po meióze z diploida citlivého na mucidín (101 × 26-4) vybraného po mitotickej segregácii. Ako vidieť z tabuľky 7, v uvedených dvoch kríženiach nevznikali nijaké diploidy citlivé na mucidín. Všetky tri jadrové mutanty rezistentné proti mucidínu možno preto pokladať za alelické, nesúce mutáciu *muc*^{PR} v tom istom gène.

Tab. 7. Alelické testy medzi jadrovými mutantmi rezistentnými proti mucidínu

Kríženie $\alpha \times \underline{a}$	Diploidy		Počet analyzovaných kolónií
	rezistentné proti mucidínu	citlivé na mucidín	
1D × 2D—22D	560	0	560
101—7C × 2D—22D	435	0	435

Alelický test sa vykonával s cytoplazmatickými mutantmi 3D a 101-4B. Po prevedení mutácií M_{3D}^R meiózou (3D × 26-4) do pohlavného typu *a* kmeňov 3DC-1B (*a* *leu1* *thr2-1* M_{3D}^R) a 3DC-7A (*a* *ade1* *lys2* *leu1* M_{3D}^R), urobili sa kríženia opísané v tabuľke 8. Zistilo sa, že bunky vzniknutého diploidného potomstva možno rozdeliť na 4 odlišné skupiny: $M_{3D}^S M_{101}^R$ — dobre rastúce diploidy rezistentné proti mucidínu, fenotypicky podobné mutantu 101, $M_{3D}^R M_{101}^S$ — pomaly rastúce diploidy rezistentné proti mucidínu, fenotypicky podobné mutantu 3D, $M_{3D}^S M_{101}^S$ — dobre rastúce diploidy citlivé na mucidín, neschopné tolerovať

Tab. 8. Alelické testy medzi mutantmi rezistentnými proti mucidínu

Kríženie 101-4B × × 3DC-1B $\alpha M_{101}^R \times \alpha M_{3D}^R$	Prenosnosť α alel (%)		Diploidy (% z celkového počtu)						Počet analyzo- vaných kolónií
			M_{3D}^S	M_{101}^R	M_{3D}^R	M_{101}^S	M_{3D}^S	M_{101}^S	
Číslo	M_{3D}^Z	M_{101}^Z							
1	75,2	70,2	66,7	21,3		8,5	3,5		141
2	72,0	67,8	63,5	23,7		8,5	4,3		282
3	82,7	82,7	76,9	11,5		5,8	5,8		395
4	75,5	77,8	72,0	18,6		3,5	5,8		450
5	64,0	50,9	45,6	30,7		18,4	5,3		114
6	64,9	43,6	33,4	33,9		31,5	1,2		165
7	57,5	52,2	47,3	37,6		10,2	4,9		423

Priemerné % prenosnosti $M\alpha$ alel: $M_{101}^Z = 62,3$, $M_{3D}^Z = 70,2$.
Priemerné % rekombinantov: 16,7.

0,2 μ g mucidínu na 1 ml pevného glycerolového média, fenotypicky podobné štandardnému kmeňu a nakoniec $M_{3D}^R M_{101}^R$ — diploidy nerastúce na glycerolovom médiu, nerastúce na etanole ako zdroji uhlíka a prejavujúce sa deficienciou v cytochróme *b*. Výsledky jednoznačne ukazujú, že po krížení dvoch mitochondriálnych mutantov rezistentných proti mucidínu, 3D a 101-4B, možno zachytiť vcelku značné percento rekombinantov (citlivých na mucidín a s nedostatkom cytochrómu *b*). V podstate rovnaké výsledky sa získali aj po krížení kmeňa 101-4B s kmeňom 3DC-7A. Priemerná celková frekvencia rekombinantov z viacerých nezávislých krížení bola 16,7 %. Značí to, že mutant 3D rezistentný proti mucidínu nie je alelický s mutantom 101-4B. Rezistencia proti mucidínu pri kvasinkách je takto kódovaná dvoma nealelickými genetickými miestami na mitochondriálnej DNA. Tieto dva lókusy sa označili ako MUC1 a MUC2, čo odpovedá mutáciám M_{3D}^R a M_{101}^R .

2.3 Vzťah mitochondriálnych mutácií rezistentných proti mucidínu k iným mitochondriálnym mutáciám

Mitochondriálne mutanty rezistentné proti mucidínu sa krížili s kmeňmi nesúcimi mitochondriálne mutácie C^R , E^R a O^R , odpovedajúce miestam RIB1, RIB3 a OLI1 [15—17]. Výsledky krížení uvádza tabuľka 9. V kríženiach zahrňajúcich mutácie C^R , E^R a M^R sa nepozorovala výrazná polarita rekombinácie medzi C^R a E^R markermi [17, 18], hoci kmene 3D a 101-4B sa krížili s obidvoma kmeňmi obsahujúcimi alely ω^+ a ω^- . Polarita rekombinácie sa nepozorovala ani v podobných kríženiach vykonaných so štandardným kmeňom D 225-5A. Za tých istých experimentálnych podmienok však kontrolné kríženie kmeňov DPI-1B ($\alpha\omega^+ C^S E^S$) \times IL126-1C ($a\omega^- C^R E^R$) ukazovalo silnú polaritu rekombinácie s prevahou rekombinantov typu $C^S E^R$. Tieto výsledky poukazujú na zvláštnosť ω lókusy a nie je vylúčená jeho prítomnosť vo forme alely ω^n [17, 19] v štandardnom kmeni i v mutantoch pochádzajúcich z neho.

Tab. 9. Rekombinácia medzi mutáciami v lókusoch RIB1, RIB3, OLI1 a MUC

Križenie $\alpha \times \underline{a}$	Prenosnosť (%)				Rekombinácia medzi pármí markerov (%)				Počet analyzovan. kolónii
	Cz	Ez	Mz	Oz	C—E	C—M	E—M	O—M	
3D \times IL8—8D $M_{3D}^R \times \omega^+ C_{321}^R E_{514}^R$ 3D \times IL126—1C	28,8	24,8	29,8		9,6	20,3	22,9		1139
$M_{3D}^R \times \omega^- C_{321}^R E_{221}^R$ 3D \times 55R5—3C/1	37,1	32,2	30,7		4,5	16,7	18,1		995
$M_{3D}^R \times \omega^- O_1^R$ 101—4B \times IL8—8D			19,1	17,5				10,5	2654
$M_{101}^R \times \omega^+ C_{321}^R E_{514}^R$ 101—4B \times IL126—1C	32,3	28,9	32,6		13,1	21,4	25,6		1172
$M_{101}^R \times \omega^- C_{321}^R E_{221}^R$ 101—4B \times 55R5—3C/1	36,7	34,6	35,5		6,6	23,0	24,1		1108
$M_{101}^R \times \omega^- O_1^R$			20,4	19,8				7,8	1628

Vysoké frekvencie rekombinácie (okolo 20 %) medzi M^R mutáciami a mutáciami C^R , E^R naznačujú, že lókusy MUC1 a MUC2 sa mapujú mimo tesne spätú C—E oblasť mitochondriálneho genómu [18]. Na druhej strane nižšie frekvencie rekombinantov (okolo 10 %) medzi M^R mutáciami a O^R mutáciou naznačujú, že lókusy MUC1 a MUC2 sa môžu nachádzať bližšie k OLI1 lókus. Tieto výsledky spolu s pozorovanou kovarianciou prenosnosti génov kontrolujúcich rezistenciu proti mucidínu, chloramfenikolu, erytromycínu a oligomycínu sú v súlade s predstavou, že mutácie M_{3D}^R a M_{101}^R sú umiestnené na tej istej molekule mitochondriálnej DNA ako mutácie lókusov RIB1, RIB3 a OLI1 [17, 18].

3. Synergická interakcia jadrových a mitochondriálnych mutácií podmieňujúca rezistenciu proti vysokým koncentráciám mucidínu

Ako sme už uviedli, mutant 101 je rezistentný proti vysokým koncentráciám mucidínu a súčasne je rezistentný aj proti mnohým funkčne a štruktúrne odlišným inhibítorm vrátane chloramfenikolu a oligomycínu. Keď sa tieto viacnásobne rezistentné haploidné kmene krížili s citlivým kmeňom 26-4, všetky vzniknuté diploidy v potomstve boli citlivé na chloramfenikol (4 mg/ml) a oligomycín (10 μ g/ml), ale popritom vykazovali mitotickú segregáciu pre rezistenciu proti mucidínu (diploidy tolerujúce maximum 1 μ g mucidínu/ml), resp. citlivosť naň (diploidy nerastúce pri 0,2 μ g mucidínu/ml).

Keď sa diploidy citlivé na mucidín podrobili tetradovej analýze (tab. 10), pozorovala sa jasná jadrová segregácia pre rezistenciu proti mucidínu (2R : 2S). Rezistencia proti mucidínu segregovala spolu s rezistenciou proti chloramfenikolu a oligomycínu. Pomer meiotickej segregácie tetrad odvodených od diploidov rezistentných proti mucidínu pri koncentrácii mucidínu 1 μ g/ml bol

Tab. 10. Segregačné pomery v tetrádach prislúchajúcich rôznym kríženiám dvojitéch mutantov rezistentných proti mucidínu

Križenie $\alpha \times \underline{a}$	Diploidy			Počet analyzova- ných tetrád		Segregácia v tetrádach ⁺ (R : S)					
	Fenotyp	(% z cel- kového počtu)	tolerancia na mu- cidín ($\mu\text{g/ml}$)			mucidín ($\mu\text{g/ml}$)				chloramfenikol (4 mg/ml)	oligo- mycín (10 $\mu\text{g}/$ /ml)
				úplné	neúplné	0,5	1,0	10,0	40,0		
101 \times 26—4	(27,7) senzitívny na mucidín		0,1	17		2 : 2	0 : 4	0 : 4	0 : 4	2 : 2	2 : 2
mucRPM ₁₀₁ ^R \times mucSMS	(72,3) rezistentný proti mucidínu	1,0		10		4 : 0	4 : 0	2 : 2	2 : 2	2 : 2	2 : 2
2D \times 3DC—1B	(43,0) rezistentný proti mucidínu	2,0		14		4 : 0	4 : 0	2 : 2		2 : 2	
101—7C \times 3DC—1B	(30,0) rezistentný proti mucidínu	2,0		++	8	3 : 0	3 : 0	2 : 1		2 : 1	
mucPRMS \times mucSM ₁₀₁ ^R					10	3 : 0	3 : 0	1 : 2		1 : 2	

4R : OS, ale pri koncentráciách mucidínu 10 alebo 40 $\mu\text{g/ml}$ bol 2R : 2S. Rezistencia proti chloramfenikolu a oligomycínu v týchto prípadoch segregovala spolu s rezistenciou proti vysokým koncentráciám mucidínu.

Najjednoduchším vysvetlením týchto výsledkov je, že existuje recesívna jednogénová mutácia (muc^{PR}), ktorá podmieňuje rezistenciu proti mnohým inhibítorom, zahŕňajúc chloramfenikol, oligomycín a mucidín (mucidín v koncentrácii do 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Diploidy rezistentné proti mucidínu a tetrády z nich odvodené obsahujú aj mitochondriálnu mutáciu M_{101}^{R} . V neprítomnosti jadrovej mutácie muc^{PR} , mitochondriálna mutácia M_{101}^{R} podmieňuje rezistenciu proti mucidínu do koncentrácie 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Keď sa obidve mutácie — jadrová muc^{PR} a mitochondriálna M_{101}^{R} — vyskytujú súčasne spolu v haploidnej kvasinkovej bunke, ich vzájomná interakcia je synergická (fenotypická interakcia nie je aditívna) a vytvára rezistenciu proti extrémne vysokým koncentráciám mucidínu (viac ako 40 $\mu\text{g/ml}$).

V súlade s uvádzaným modelom dvoch mutácií tvorili sa v kríženiach medzi kmeňmi nesúcimi mutácie muc^{PR} a M_{3D}^{R} tak diploidy citlivé na mucidín, ako aj diploidy rezistentné proti mucidínu (tab. 10). Segregačný pomer tetrád, odvodených od diploidov rezistentných proti mucidínu bol 4R : OS (3R : OS) pri koncentráciách mucidínu 1 $\mu\text{g/ml}$, ale 2R : 2S (1R : 2S, alebo 2R : 1S) pri koncentráciách mucidínu 10 $\mu\text{g/ml}$. Rezistencia proti vysokej koncentrácii mucidínu segregovala spolu s rezistenciou proti chloramfenikolu.

Diskusia

Výsledky práce ukazujú, že pri kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* rezistencia proti antifungálnemu antibiotiku mucidínu, ktorý inhibuje mitochondriálny transport elektrónov v mieste medzi cytochrómami *b* a *c* [6, 7], môže vznikáť v dôsledku mutácií jadrového i mitochondriálneho genómu. Mutácia jediného jadrového génu sa ukázala byť zodpovednou za rezistenciu proti mucidínu a súčasne aj za rezistenciu proti rôznym štruktúrne a funkčne odlišným inhibítorom mitochondriálnych funkcií. Pretože v prípade týchto mutantov tvoriacich 1. skupinu študovaných kmeňov sa rezistencia proti inhibítorom nepozorovala na úrovni izolovaných mitochondrií, je pravdepodobné, že za fenotyp združenej rezistencie mutantov 1. skupiny bude zodpovedná zmena permeability cytoplazmatickej membrány. Podobné jadrové mutanty súčasne rezistentné proti viacerým inhibítorom opísali aj iní autori [20—23]. Ostáva však objasniť, či vo všetkých nezávisle izolovaných mutantoch ide o mutáciu toho istého génu.

Pri mutantoch 2. skupiny rezistencia proti mucidínu sa zachovala aj na úrovni izolovaných mitochondrií a je dôsledkom mutácií umiestených na mitochondriálnom genóme. Genetická analýza odhalila existenciu dvoch nových mitochondriálnych genetických lokusov označených MUC1 a MUC2. Značí to, že minimálne dva génové produkty mitochondriálnej DNA špecifikujú rezistenciu proti mucidínu. Túto špecifickú rezistenciu spôsobuje modifikácia väzbových alebo inhibičných miest pre mucidín na mitochondriálnej membráne. Tieto miesta sa ukázali byť špecifické pre mucidín a zdanlivo odlišné od miest pre antimycín A, HQNO alebo 2,3-dimercaptopropanol. Výsledky biochemicko-genetickej analýzy rezistencie kvasiniek proti mucidínu

takto jednoznačne potvrdili, že špecifickým miestom účinku antifungálneho antibiotika mucidínu je mitochondriálna ubichinol: cytochróm *c* oxidoreduk-táza.

Zo získaných výsledkov pre praktické použitie mucidínu a iných antifungál-nych látok vyplývajú okrem iného tieto poznatky:

1. Spontánna mutačná rýchlosť vedúca k rezistencii mikroorganizmov proti mucidínu je pomerne malá. Kontinuálnu selekciu aj takto vzniknutých mikro-organizmov rezistentných proti mucidínu možno obmedziť vhodným strieda-ním fungicídov s odlišným spôsobom účinku.

2. Rezistentné kmeny tolerujú iba definované koncentrácie mucidínu a ich rast je úplne inhibovateľný vyššími koncentraciami antibiotika. Preto sa javí účelnejšie používať relatívne vyššie koncentrácie fungicídov.

3. Rýchlosť mutácií zodpovedných za rezistenciu mikroorganizmov proti mucidínu môže výrazne zvyšovať mutagénny účinok jednoduchých mangá-natých solí. Preto sa treba vyhýbať použitiu fungicídov v prostredí s možnou expozíciou mikroorganizmov mutagénom.

Súhrn

Izolovali sa mutanty kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* rezistentné proti antifungálnemu antibiotiku mucidínu. Biochemicko-genetickou analýzou tých-to mutantov sa zistilo, že rezistencia proti mucidínu môže vzniknúť v dô-sledku zníženej permeability plazmatickej membrány pre mucidín alebo v dôsledku zníženej afinity antibiotika k mitochondriálnej membráne. V prvom prípade rezistenciu podmieňovala mutácia jadrového genómu, v druhom prí-pade mutácie v mitochondriálnej DNA. Vzájomná interakcia jadrových a mitochondriálnych mutácií sa ukázala byť synergická.

Literatúra

1. GALE, E. F. — CUNDLIFE, E. — REYNOLDS, P. E. — RICHMOND, M. H. — WARNING, M. J.: The Molecular Basis of Antibiotic Action. London, Wiley and Sons 1972.
2. DEKKER, J.: Ann. Rev. Phytopathol., 14, 1976, s. 405.
3. WARREN, G. G. — SANDERS, P. — COLE, H.: Phytopathology, 64, 1974, s. 1139.
4. BRESLER, S. J.: Molekulární biologie. Praha, Academia 1966.
5. GARRAWAY, J. L.: Pestic. Sci., 3, 1972, s. 449.
6. ŠUBÍK, J. — BEHÚŇ, M. — ŠMIGÁŇ, P. — MUSÍLEK, V.: Biochim. biophys. Acta, 343, 1974, s. 363.
7. ŠUBÍK, J. — BEHÚŇ, M. — MUSÍLEK, V.: Biochem. biophys. Res. Commun., 57, 1974, s. 17.
8. ROSE, A. H. — HARRISON, J. S.: The Yeasts. Vol. 1. New York, Academic Press 1969.
9. ŠUBÍK, J.: Autorské osvedčenie č. 184 L89.
10. HOWELL, N. — TREMBATH, M. K. — LINNANE, A. W. — LUKINS, H. B.: Mol. Gen. Genet., 122, 1973, s. 37.
11. KOVÁČ, L. — GROOT, G. S. P. — RACKER, E.: Biochim. biophys. Acta, 256, 1972, s. 55.
12. JACOBS, E. F. — JACOB, M. — SANADI, D. R. — BRADLEY, L. B.: J. Biol. Chem., 223, 1956, s. 147.
13. SUMNER, J. B.: Science, 100, 1944, s. 413.

14. KANIUGA, Z. — BRYLA, J. — SLATER, E. C.: In: Bücher, Th. — Sies, H. (Eds), *Inhibitors — Tools in Cell Research*. New York, Springer Verlag 1969, s. 282.
15. COEN, D. — DEUTSCH, J. — NETTER, P. — PETROCHILLO, E. — SLONIMSKI, P. P.: In: Miller, P. L. (Ed.), *Control of Organelle Development. Symposium — Society of Experimental Biology*. Vol. 24. New York, Academic Press 1970, s. 449.
16. AVNER, P. R. — COEN, D. — DUJON, B. — SLONIMSKI, P. P.: *Mol. Gen. Genet.*, 125, 1973, s. 9.
17. DUJON, B. — SLONIMSKI, P. P. — WELL, L.: *Genetics*, 78, 1974, s. 415.
18. NETTER, P. — PETROCHILLO, E. — SLONIMSKI, P. P. — BOLOTIN-FUKUHARA, M. — COEN, D. — DEUTSCH, J. — DUJON, B.: *Genetics*, 78, 1974, s. 1063.
19. DUJON, B. — BOLOTIN-FUKUHARA, M. — COEN, D. — DEUTSCH, J. — NETTER, P. — SLONIMSKI, P. P. — WEIL, L.: *Mol. Gen. Genet.*, 143, 1976, s. 131.
20. RANK, G. H. — BECH-HANSEN, N. T.: *Mol. Gen. Genet.*, 126, 1973, s. 93.
21. RANK, G. H. — ROBERTSON, A. — PHILLIPS, K.: *J. Bacteriol.*, 122, 1975, s. 359.
22. AVNER, P. R. — GRIFFITHS, D. E.: *Eur. J. Biochem.*, 32, 1973, s. 312.
23. HOWELL, N. — MOLLOY, P. L. — LINNANE, A. W. — LUKINS, H. B.: *Mol. Gen. Genet.*, 128, 1974, s. 43.

Шубик, Ю. и Такачова, Г.

Сопротивляемость микроорганизмов антифугальным веществам:
биохимическое и генетическое основания сопротивляемости дрожжей
муцидину

Выводы

Изолированы мутанты дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, стойких к действию антифугального антибиотика муцидина. Биохимическо-генетическим анализом этих мутантов было установлено, что сопротивляемость муцидину может возникать вследствие пониженной проницаемости мембраны плазмы для муцидина или вследствие пониженного сродства антибиотика к мембране митохондрий. В первом случае сопротивляемость была обусловлена мутацией ядерного генома, во втором случае мутациями в ДНА митохондрий. Взаимодействие ядерных и митохондриальных мутаций оказалось синергичным.

Šubík J. — Takácsová G.

Resistance of microorganisms to antifungal agents: biochemical and genetic
background of resistance of yeast to mucidin

Summary

Mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antifungal antibiotic mucidin have been isolated. The biochemical-genetic analysis of these mutants revealed that resistance to mucidin can result either from reduced permeability of plasma membrane for mucidin or from the decreased affinity of antibiotic to the mitochondrial membrane. In the first case, resistance to mucidin was determined by mutation in nuclear gene while in the second case by mutations in the mitochondrial DNA. The mutual interaction of nuclear and mitochondrial mutations was shown to be synergistic.