

УДК 575.22.224.2 : 582.282.23

Яак КАЛЬДМА, Ану ТИЙДЕМА

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПРИРОДНОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ИНГИБИТОРАМ РОСТА У ДРОЖЖЕЙ *PICHA QUILLERMONDII*

Генетический признак устойчивости/чувствительности дрожжей к разным ингибиторам роста, действующим на различные биологически важные структуры в клетке, эффективно используется для изучения их функций. Классическим объектом для проведения таких работ являются факультативные анаэробы, сахаромицеты.

Большинство работ посвящено исследованию спонтанных и индуцированных разными мутагенами мутаций, вызывающих устойчивость к ингибиторам роста. По характеру генетической детерминации устойчивые мутации могут делиться на ядерные и в малом количестве на неядерные (в основном, митохондриальные). В детерминации участвует один или несколько генов, которые могут быть доминантными или рецессивными.

Кроме вызванной в эксперименте устойчивости существует еще природная устойчивость штаммов, генетическая детерминация которых недостаточно изучена. Целью настоящей работы было изучение особенностей генетической детерминации природной множественной устойчивости, обнаруженной нами на облигаторных аэробных дрожжах *Pichia quillermondii* Wickerham.

Материал и методика

Материалом для исследования послужили гаплоидные ауксотрофные дрожжи *Pichia quillermondii* Wickerham следующих генотипов: L1mat⁺ade2/19, L2mat⁻hisx, где mat⁺ и mat⁻ обозначают противоположные типы спаривания, ade и his ауксотрофность к аденину и гистидину. Штаммы были нам любезно предоставлены канд. биол. наук А. Сибирным (Львовский ГУ).

Опыты проводили на стандартных средах. Состав различных сред описан ранее (Захаров и др., 1976): полная — п, минимальная — м, полная, с замененной на 2% этиловый спирт глюкозой — псп, псп с ингибиторами — эритромицином (3 мг/мл), неомицином (0,5 мг/мл), олигомицином (4 мг/мл), диуроном (12 мкг/мл), хлорамфениколом (5 мг/мл), тетрациклином (1,3 мг/мл), канававином (150 мкг/мл) и нистатином (3 мг/мл).

Критерием наличия устойчивости/чувствительности у штаммов *Pichia quillermondii* служило сравнение их роста с соответствующими штаммами *Saccharomyces cerevisiae*. Рост культур на средах с ингибиторами определяли на 3-й и 6-й день инкубации.

Отсутствие необходимых для проведения скрещивания чувствительных к ингибиторам штаммов потребовало создания чувствительных к ингибиторам мутантов. Для этого культуру штамма *P. quillermondii* подвергали УФ-облучению (выживаемость около 1%). Облученную суспензию после разбавления пересевали на чашки Петри с п-средой. Выросшие колонии печатали при помощи бархата на селективные среды с эритромицином, олигомицином и неомицином. Колонии, не выросшие на селективных средах, отбирали с матричных чашек и клонировали. У каждого предполагаемого мутанта, чувствительного к ингибиторам, проверяли 10 субклонов на все 9 ингибиторов. Первоначально чувствительные мутанты реагировали по-разному — у некоторых мутантов все 10 субклонов обладали одинаковой устойчивостью/чувствительностью к ингибиторам, а у остальных происходила митотическая сегрегация и чувствительной была только часть субклонов.

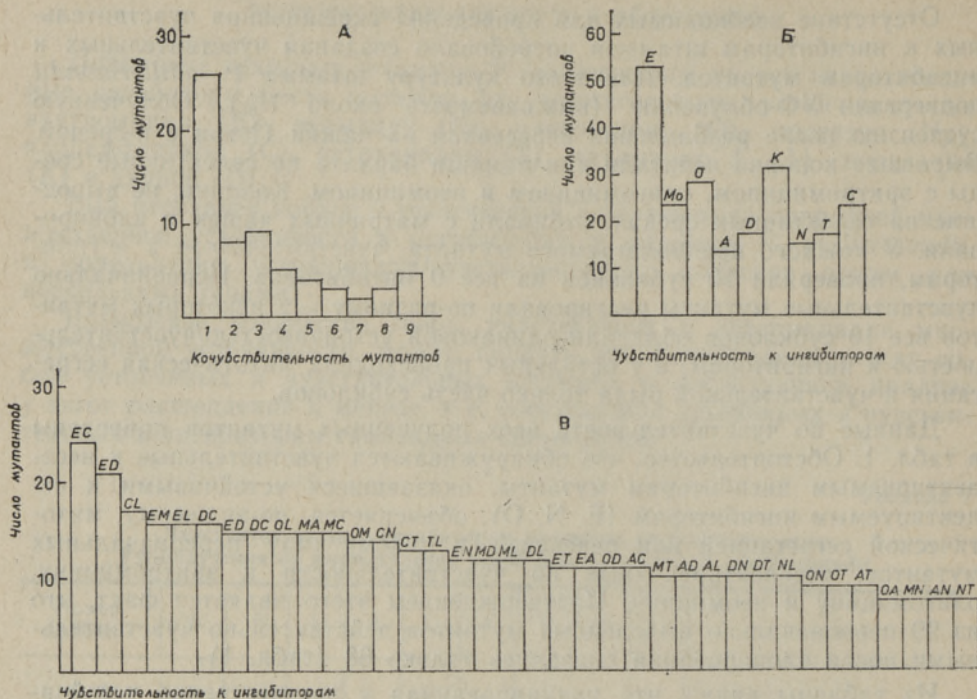
Данные по чувствительности всех полученных мутантов приведены в табл. 1. Обстоятельство, что обнаруживаются чувствительные к неселектируемым ингибиторам мутанты, оказавшиеся устойчивыми к селективируемым ингибиторам (E, N, O), объясняется, по-видимому, митотической сегрегацией или реверсией к дикому типу первоначальных мутантов, отсеleccionированных по чувствительности к эритромицину, олигомицину и неомицину. Подтверждением этого является факт, что из 99 первоначально выделенных мутантов действительно чувствительными после клонирования оказались только 68 (табл. 1).

Из таблицы видно, что индуцированная у множественно устойчивого штамма чувствительность часто носит плейотропный характер ко чувствительности, который варьирует у разных мутантов, обнаруживая разный спектр чувствительности к ингибиторам. При этом существенно варьирует степень чувствительности к разным ингибиторам, но корреляции между ними по предварительным опытам нам установить не удалось, т. е. высокая степень чувствительности к одному ингибитору часто сопровождалась низкой чувствительностью к другому.

По степени кочувствительности мутанты распределяются на всевозможные классы (рисунок А), т. е. встречаются мутанты с 2—9 кочувствительными мутациями. Интересно, что наряду с мутациями, показывающими плейотропный эффект кочувствительности, встречается довольно много чувствительных только к одному из девяти ингибиторов (26 из 68). Из них большинство (17) приходится на E^S-мутанты, а чувствительностью к остальным ингибиторам обладают только один-два мутанта. Рисунок Б иллюстрирует распределение по чувствительности к одному ингибитору. По чувствительности к селективируемым ингибиторам чувствительность мутантов к эритромицину превышает чувствительность к олигомицину и неомицину. количество E^S, O^S и N^S у мутантов составляет 52, 28 и 22. Среди неселектируемых ингибиторов кочувствительность к канаванину (30) встречается чаще, чем к антимицину (12), неомицину (14) или тетрациклину (15).

Поскольку первоначальную селекцию чувствительных мутантов проводили только по трем ингибиторам — эритромицину, олигомицину и неомицину, то полученные мутанты представляют лишь часть мутантного кочувствительного спектра. Рисунок В демонстрирует распределение кочувствительности среди мутантов, взятых по чувствительности к двум ингибиторам. Представлены всевозможные сочетания чувствительности к ингибиторам, предпочтень какую-либо комбинацию по этой выборке невозможно.

Наибольший интерес представляют пять мутантов, которые имеют плейотропный эффект кочувствительности ко всем испытанным ингибиторам. Наличие таких мутантов дает возможность изучить генети-



Распределение мутантов по степени чувствительности (А), чувствительности к одному ингибитору (Б), к двум ингибиторам (В).

ческую детерминацию множественной устойчивости и чувствительности при расщеплении этого признака в мейозе у гаплоидных сегрегантов.

Проводили скрещивание *P. quillermondii* mat⁺ ade2/19 E^SN^SO^SA^S D^SK^SNy^ST^SC^S × *P. quillermondii* mat⁻ his/17 E^RN^RO^RA^RD^RK^RNy^RT^RC^R. У полученных зигот изучалась проявившаяся в мейозе случайной выборки гаплоидных сегрегантов устойчивость. Данные по мейотическому расщеплению гаплоидных сегрегантов пяти мутантов приведены в табл. 2. Мутанты 1, 3, 4 и 5 характеризуются расщеплением устойчи-

Таблица 2

Расщепление мейотических гаплоидных сегрегантов у зигот, полученных при скрещивании пяти чувствительных к ингибиторам мутантов с устойчивым штаммом

Номер мутанта	Сегреганты		
	изучено клонов	чувствительные	устойчивые
1	178	93 52,2% ± 3,7	85 47,8% ± 3,7
2	162	69 42,6% ± 3,9	93 57,4% ± 3,9
3	177	82 46,5% ± 3,8	95 53,5% ± 8,8
4	177	82 46,3% ± 3,7	95 53,7% ± 3,7
5	183	85 46,4% ± 3,7	98 53,6% ± 3,7

вости/чувствительности среди сегрегантов, соответствующим 1:1, что свидетельствует о моногенном наследовании признака. Исключение представляет мутант 2, где расщепление не соответствует 1:1, что говорит в пользу участия нескольких генов в детерминации признака.

Мутанты 1, 3, 4 и 5 были скрещены между собой для выяснения аллельности мутации. Скрещивающиеся генотипы мутантов были отобраны из сегрегантов предыдущих скрещиваний. Выяснилось, что все четыре мутации неаллельны между собой (все комбинации при скрещивании мутантов дали устойчивые зиготы), следовательно все они детерминируются отдельными неаллельными генами.

У всех пяти мутантов, чувствительных ко всем девяти ингибиторам, были получены спонтанные реверсии устойчивости к эритромицину. Данные по кочувствительности E-ревертантов приведены в табл. 3. Мутанты различаются между собой по относительному количеству появления ревертантов (все мутанты были посеяны на равное количество чашек с эритромицином из суспензии с приблизительно одинаковой густотой). У мутанта 2, чувствительность которого детерминируется

Таблица 3

Устойчивость к ингибиторам E^R-ревертантов, выделенных из пяти множественно чувствительных мутантов

Номер мутанта	Число ревертантов	E	N	O	A	D	C	Ny	T	L	Spv
1	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"	2	+	+	+/+*	+	+	+/+*	+/+*	+/+*	+/+*	+
"	1	+	+	+*	+*	-	+*	+*	+*	-	+
"	3	+	-	+	+/+*	+	+	+	+/+*	+/+*	+
"	1	+	+	-	+*	+*	-	+*	+*	+*	+
"	1	+	-	+*	+*	+*	-	+*	+*	+*	+
"	31	+*	+*	+/+*	+/+*	+/+*	+/+*	+/+*	+/+*	+/+*	+
"	3	+*	+/+*	+*	+*	+*	-	+*	+*	+*	+
"	10	+*	+*	-	+/+*	+*	+*	+/+*	+*	+*	+
"	1	+*	-	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+
"	7	+*	+/+*	-	+*	+*	-	+*	+*	+*	+
"	1	+*	-	+*	+*	-	+*	+*	+*	+*	+
"	1	+*	-	+*	+*	+*	-	+*	+*	+*	+
"	1	+*	-	+*	+*	-	-	+*	+*	+*	+
"	1	+*	+*	-	+*	+*	-	-	+*	-	+
"	2	+*	-	-	+*	+	-	-	+*	+*	+
"	1	+*	-	-	+*	+*	-	-	+*	-	+
"	1	+*	-	+*	-	+*	-	-	-	+*	+
"	2	+*	-	+*	-	+*	-	-	-	-	+
"	1	-	-	+*	+*	+	-	+*	+*	+*	+
"	1	-	-	+*	+*	+*	-	+*	+*	+*	+
"	1	-	-	+*	+*	+*	-	-	-	-	+
"	1	-	-	+*	+*	+*	-	-	-	-	+
"	1	-	-	+*	+*	+*	-	-	-	-	+
"	2	-	-	-	+*	-	-	-	-	-	+
"	1	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	+

Примечание: (-) — отсутствие устойчивости, (+) — нормальная степень устойчивости, (+*) — пониженная степень устойчивости, (+/+*) — часть ревертантов имеют нормальную, часть пониженную устойчивость.

несколькими генами, наблюдается наибольшая частота появления E-ревертантов — около 200, из которых 94 было проанализировано на коустойчивость ко всем ингибиторам. Остальные четыре мутанта давали сравнительно мало (11—40) ревертантов, которые вели себя однообразно; ревертанты этих четырех мутантов приобретали множественную устойчивость ко всем девяти ингибиторам — восстанавливался исходный фенотип устойчивости штамма *P. quillermondii*. Иначе вели себя ревертанты мутанта 2, которые расщепляются по устойчивости к разным ингибиторам. Надо отметить, что большинство E-ревертантов, показавших сначала нормальную степень устойчивости к эритромицину (по сравнению с исходным штаммом), показали потом низкую степень устойчивости или оказались чувствительными к эритромицину. Эти две группы E^R-ревертантов (с нормальной и пониженной устойчивостью) различаются по распределению средней кочувствительности. Для E^R-ревертантов первой группы с нормальной устойчивостью характерно, что большинство из них (14 из 22) устойчивы ко всем ингибиторам; E^R-ревертанты другой группы не имеют, как правило, четко выраженной устойчивости к ингибиторам, их устойчивость варьирует, показывая для одних ингибиторов нормальную, а для других низкую степень устойчивости.

До настоящего времени природная множественная устойчивость дрожжей не исследовалась другими авторами и вопрос о генетической детерминации этого явления не ясен. В данной работе была сделана попытка изучить на примере облигаторных дрожжей *P. quillermondii* особенности потери множественной устойчивости при индукции ее УФ-облучением, с одной стороны, и генетической детерминации множественной устойчивости и чувствительности, с другой.

Анализ индуцированных УФ-облучением мутантов, чувствительных к ингибиторам показал, что существуют различия при потере устойчивости к разным ингибиторам, в частности наблюдается преимущественная потеря устойчивости к эритромицину. Такие различия могут быть связаны с различиями в выбранных ингибиторами мишенях.

Известно, что у факультативных дрожжей *S. cerevisiae* эритромицин ингибирует преимущественно митохондриальную белок-синтезирующую систему, действуя на митохондриальные рибосомы (Grivell, 1971). Возможно, что высокая частота появления E^S-мутантов у облигаторных аэробов обуславливается действием этого антибиотика на митохондриальные рибосомы. Этим можно объяснить и отсутствие кочувствительности у 1/3 E-мутантов.

Мутации, вызывающие множественную устойчивость к ингибиторам, описаны в работах группы Г. Х. Рэнка (Rank и др., 1973, 1975, 1976, 1977). Этими авторами показано, что у дрожжей *S. cerevisiae* мутант, отобранный по признаку устойчивости к олигомицину, имеет перекрестную устойчивость к 17 ингибиторам и детерминируется одним ядерным геном. У таких мутантов изменена проницаемость митохондриальных и клеточных мембран. Изучая у устойчивых мутантов дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* аккумуляцию в клетках L-тирозина, который по своей структуре напоминает хлорамфеникол, было найдено (Johnston, Coddington, 1982), что устойчивость связана с изменением проницаемости мембран.

Для подтверждения возможной роли изменения проницаемости клеточных мембран все чувствительные мутанты в наших опытах были проанализированы на чувствительность роста при разных концентрациях этилового спирта. Предположением о существовании такой чувствительности служило обнаружение замедленного роста некоторых мутантов на среде со спиртом. Выяснилось, что большинство чувствительных мутантов обладали заметной чувствительностью к разным кон-

центрациям спирта (табл. 1). Если рост исходного устойчивого штамма ингибировался при 8% спирте, то часть мутантов не выростала уже при 3% спирте. Итак, чувствительностью к спирту обладают, как имеющие, так и не имеющие кочувствительность мутанты. Все мутанты, имеющие множественную чувствительность к семи, восьми и девяти ингибиторам, оказались чувствительными к спирту. Чувствительность к спирту проверяли и у всех устойчивых к эритромицину ревертантов. Как и следовало ожидать, нормальный рост всех ревертантов восстановился на среде со спиртом. О существовании чувствительных к ингибиторам, а также к спирту мутантов, в литературных источниках не упоминается, но сам факт наличия такой связи свидетельствует об изменении проницаемости мембран. Известно только (Бандас и др., 1980), что у дрожжей *S. cerevisiae* митохондриальная мутация, вызывающая устойчивость к неомицину, может вызывать устойчивость и к этиловому спирту. Мутации, вызывающие устойчивость к мономицину (имеют всегда плеiotропный эффект устойчивости к неомицину), связаны с уменьшением проницаемости мембран к структурно и функционально неродственным антибиотикам (Howell и др., 1974).

При скрещивании с природным множественно устойчивым штаммом *P. quillermondii* моногенное расщепление признака устойчивости/чувствительности показали четыре из чувствительных ко всем девяти ингибиторам мутантов. Отсюда следует, что природная множественная устойчивость *P. quillermondii* детерминируется только одним доминантным ядерным геном.

Широкий спектр чувствительности к разным ингибиторам среди выделенных мутантов указывает на различия в механизмах возникновения чувствительности/устойчивости у разных мутантов.

Достаточно высокая частота появления среди выделенных мутантов таких, которые имеют чувствительность ко всем девяти ингибиторам (5 из 68) указывает на наличие множества локусов ответственных за мембранную проницаемость. То, что четыре из таких мутантов детерминируются моногенно и неаллельными генами, свидетельствует о кардинальном нарушении проницаемости целого мембранного комплекса, которое может быть вызвано нарушением его отдельных компонентов. Дальнейшее изучение функции и локализация таких мутаций, по-видимому, открывает перспективу использования их как метода для расшифровки молекулярной структуры мембранного комплекса, обуславливающего проницаемость.

Мутанты, обладающие множественной устойчивостью к ингибиторам, свойственны не только дрожжам, но и другим эукариотам (Ефимова, Игнатова, 1984; Vech-Hansen, Till, 1976), у которых тоже обнаруживаются изменения проницаемости мембран, затрагивающие многие, в том числе и компоненты энергезависимого активного транспорта через мембраны.

Распространенность среди разных организмов мутаций, вызывающих множественную устойчивость к ингибиторам роста и к природной устойчивости, придает этому явлению важное биологическое значение в эволюции видов как фактору, позволяющему организмам эффективно адаптироваться в ответ на внезапные изменения компонентов внешней среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Бандас Е. Л., Чепурная О. В., Захаров И. А. Митохондриальные мутации антибиотикоустойчивости у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, их рекомбинация и влияние на индукцию митохондриальных мутаций дыхательной недостаточности этиловым спиртом. — Генетика, 1980, 16, № 9, 1556—1563.

- Ефимова Е. В., Игнатова Т. А. Генетическая характеристика устойчивости клеток китайского хомячка к колхицину, актиномицину D и бромистому этидию. — *Генетика*, 1984, 20, № 7, 1148—1154.
- Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1976.
- Bech-Hansen, N. T., Till, I. E., Ling, V. Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO-cells: cross-resistance and collateral sensitivity. — *J. Cell. Physiol.*, 1976, 88, N 1, 23—28.
- Grivell, L. A., Reijnders, L. Altered mitochondrial ribosomes in a cytoplasmic mutant of yeast. — *FEBS Lett.*, 1971, 16, N 3, 159—163.
- Howell, N., Molloy, P. L., Linnane, A. W., Lukins, H. B. Biogenesis of Mitochondria 34. The synergistic interaction of nuclear and mitochondrial mutations to produce resistance to high levels of mikamycin in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1974, 128, N 11, 43—48.
- Johnston, P. A., Coddington, A. Multiple drug resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for the existence of pleiotropic mutations affecting energy-dependent transport systems. — *Molec. Gen. Genet.*, 1982, 185, N 2, 311—319.
- Rank, G. H., Bech-Hansen, N. T. Single nuclear gene inherited cross resistance and collateral sensitivity to 17 inhibitors of mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1973, 126, N 2, 93—102.
- Rank, G. H., Robertson, A., Philips, K. Reduced plasma membrane permeability in a multiple cross resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1975, 122, N 2, 359—366.
- Rank, G. H., Gerlach, J. H., Robertson, A. I. Some physiological alteration associated with pleiotropic cross resistance and collateral sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1976, 144, N 3, 281—288.
- Rank, G. H., Robertson, A. I., Gerlach, J. A. Single gene alteration of plasma and mitochondrial membrane function in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1977, 152, N 1, 13—18.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
11/VII 1985

Jaak KALDMA, Anu TIIDEMA

LOODUSLIKU POLÜRESISTENTSUSE GENEETILISE DETERMINATSIOONI UURIMINE PÄRMSEENTEL *PICHIA QUILLERMONDII*

Obligatoorsetel aeroobsetel pärmseentel *Pichia quillermondii*, mis on looduslikult resistentsete paljudele kasvuinhibiitoreile, uuriti selle nähtuse geneetilist determineeritust. Geneetilistes ristamistes resistentse tüvega kasutati indutseeritud, kõigile uuritud inhibiitoreile tundlikkust põhjustavaid mutatsioone. Leiti, et looduslik polüresistentsus kasvuinhibiitoreile ja indutseeritud mitmene tundlikkus (osal juhtudel) on determineeritud ühe tuumageeni poolt.

Jaak KALDMA, Anu TIIDEMA

GENETIC DETERMINATION OF NATURAL MULTIPLE DRUG RESISTANCE IN YEAST *PICHIA QUILLERMONDII*

The genetic determination of natural multiple drug resistance in the obligatory aerobic yeast *Pichia quillermondii* was examined. Induced multiple-sensitive mutants were selected for genetic crosses. It was found that the natural multiple resistance and in some cases the induced multiple sensitivity are under the control of a single nuclear gene.