PRO SPIS

48

POPIS OBJAVU

K DIPLOMU ČÍS.

Prihlásené: 20.03.79 (PO 17-79)
Právo prednosti od 30.11.75
Zverejnené: FEBS Lett.59,1975:
273-275

Udelené: 07.12.89

Vydané:

MDT 615.779.931

Autor objavu: Šubík Július RNDr. CSc., Bratislava

Názov objavu: Mitochondriálne gény kontrolujúce špecifickú rezistenciu buniek kvasiniek k antibiotiku mucidinu

Predmet objavu:

Jav spočívajúci v tom, že špecifická rezistencia k mucidinu u kvasiniek Saccharomyces cerevisiae je kontrolovaná mitochondriálnym génom podieľajúcim sa na biogenéze ubichinol-cytochróm c oxidoreduktázového komplexu.

Biogenéza mitochondrií eukaryotických buniek je pod kontrolou jadrových a mitochondriálnych génov a zúčastňuje sa jej cytoplazmatický a mitochondriálny systém syntézy bielkovín. Mitochondriálne gény nesú informáciu pre jednu mitoribozomálnu bielkovinu, ribozomálne a transférové ribonukleové kyseliny mitochondriálneho proteosyntetického systému

a špecifikujú naviac štruktúru niektorých bielkovín vnútornej mitochondriálnej membrány, ktoré sú nevyhnutné pre funkciu takých mitochnodriálnych procesov ako sú transport elektrónov a transformácia energie /Schatz, G., Mason, T.L.: Ann. Rev. Biochem. 43,51, 1974/.

V posledných rokoch popri biogenéze mitochondrií intenzívna pozornosť sa venuje aj ich genetike. V centre záujmu je predovšetkým identifikácia mitochondriálnych génov, stanovenia ich relatívneho zoskupenia na genome a odhalenie mechanizmov kontrolujúcich ich expresiu. V štúdiu biogenézy a genetiky mitochondrií významnú úlohu zohrali mutanty kvasiniek Saccharomyces cerevisiae a antibiotiká inhibujúce mitochondriálne funkcie. Pomocou nich boli identifikované nové gény na mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseline a priradili sa im vhodné, dobre definované a fenotypicky rozlíšiteľné genetické znaky. ~~/Šubík, J.: Biolo. listy 43, 144,1978/.~~ Izolácia a charakterizácia početných mitochondriálnych mutantov rezistentných k inhibítorom mitochondriálnej proteosyntézy /chloramfenikol, erytromycín, paromomycín/ a adenozíntrifosfát-syntetázy /oligomycín/ umožnila detailne rozpracovať metodiku genetickej analýzy mitochondriálneho genomu a vypracovať na základe jej výsledkov všeobecne platný model rekombinácie a segregácie mitochondriálnych génov /Dujon, B., Slonimski, P.P., Weill, L.: Genetics 78, 415, 1974/.

Popri zložkách mitochondriálneho proteosyntetického systému a adenozíntrifosfát-syntetázy /ATP-ázy/ i niektoré komponenty respiračného reťazca ako ubichinol-cytochróm c oxidoreduktázy a cytochrómoxidázy sa ukázali byť tiež syntetizované vo vnútri mitochondrií /Schatz, G., Mason, T.L.: Ann. Rev. Biochem. 43, 51, 1974/. Ich genetická špecifikácia až do roku zverejnenia podstaty ~~predloženého~~ objavu však objasnená

nebola. Rovnako nezodpovedané boli aj otázky týkajúce sa biochemického a genetického pozadia rezistencie húb proti klinicky používanému antibiotiku mucidinu /Mucidermin - SPOFA/.

Predmetom objavu je jav spočívajúci v tom, že špecifická rezistencia k mucidinu u eukaryotických buniek citlivých k tomuto antibiotiku je kontrolovaná génmi lokalizovanými na mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseline. Mitochondriálne gény kontrolujúce rezistenciu k mucidinu sa podieľajú na biogenéze mitochondriálnej ubichinol-cytochróm c oxidoreduktázy.

Mucidin je antifungálne antibiotikum produkované basídiomycétou Oudemansiella mucida /Musílek, V., Černá, J., Šašek, V., Semerdžieva, M., Vondráček, M.: Folia Microbiol. 14, 377, 1969/ inhibujúce rast kvasiniek a vláknitých húb. Primárnym účinkom mucidinu je inhibícia dýchania na úrovni mitochondriálnej ubichinol-cytochróm c oxidoreduktázy /Šubík, J., Behúň, M., Šmigáň, P., Musílek, V.: Biochim. Biophys. Acta 343, 363, 1974; Šubík, J., Behúň, M., Musílek, V.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 17, 1974/, ktorej biogenéza je pod kontrolou jadrových a mitochondriálnych génov. Základné informácie o povahe väzbových miest mucidinu na mitochondriálnej membráne, ich genetickom pôvode ako aj ich vzťahu k iným inhibítorom ubichinol-cytochróm c oxidoreduktázy poskytlo štúdium genetických a biochemických vlastností mutantov kvasiniek rezistentných k mucidinu.

Mutant kvasiniek rezistentný proti mucidinu, označený Saccharomyces cerevisiae 3D /α adel lys2 ρ^+ $C^S E^S O^S M^R$/ /Šubík, J.: (čs. aut. osvedčenie č. 184 089 / sa izoloval z buniek štandardného kmeňa D 225-5A /α adel lys2 ρ^+ $C^S E^S O^S M^S$/ vysiateho na povrch agarových médií obsahujúcich 2% agar, 2% glycerol, 1% kvasničný extrakt, 1% pepton, 0,01% adenín, minerálne

soli /Šubík, J., Behúň, M., Šmigáň, P., Musílek, V.: Biochim. Biophys. Acta 343, 363, 1974/ a 0,25 /ug mucidinu/ml. Kolónia mutanta, ktorá sa objavila po 7 dňoch inkubácie pri 30°C sa izolovala, vyčistila klonovaním a jej fenotyp sa opäť skontroloval. Rezistencia mutanta k rôznym inhibítorom mitochondriálnych funkcií sa stanovila postupom podľa Ranka a Bech-hansena /Rank, G.H., Bech-Hansen, N.T.: Mol. Gen. Genet. 126, 93,1973/. Publikované postupy sa použili aj pri krížení a tetrádovej analýze kvasiniek / Fowell, R.R.: v Rose, A.H. a Harrison, J.S., eds., The Yeasts, Vol. 1., Academic Press, New York 1969, s. 303; Mortimer, R.K., Hawthorne, D. C.: v Rose, A.H. a Harrison, J.S., eds., The Yeasts, Vol. 1., Academic Press. New York 1969, s. 385/ako aj pri kvantitatívnej analýze diploidov a analýze mitotických segregantov /Coen, D., Deutsch, J., Netter, P., Petrochilo, E., Slonimski, P.P.: v Miller, P.L., ad., Control of Organelle Development, Society of Experimental Biology Symposium, Vol. 24, Academic Press, New York 1970, s. 449; Howell, N., Trembath, M.K., Linnane, A.W., Lukins, H.B.: Mol. Gen. Genet. 122, 37, 1973 /. Spotreba kyslíka sa merala polarograficky pri 30°C.

Mucidin spôsoboval inhibíciu rastu kvasiniek Saccharomyces cerevisiae D 225-5A v koncentrácii 0,2 /ug/ml ak zdrojom uhlíka boli nefermentabilné substráty glycerol alebo etanol. Rast na glukóze mucidinom ovplyvnený nebol. Na druhej strane spontánne vzniknutý mutant 3D rezistentný k mucidinu toleroval až 2 /ug mucidinu/ml pevného glycerolového média a podrobil sa podrobnejšej analýze.

Štúdium krížovej rezistencie mutanta 3D k antimycínu A, chloramfenikolu, erytromycínu, karbonylkyanid-m-chlorfenylhydrazónu a kyseline bongkrekovej na pevných glycerolových médiách ukázalo, že tento kmeň je špecificky rezistentný iba proti mucidinu a nevyznačuje sa združenou rezistenciou k ostatným testovaným inhibítorom.

Genetická analýza popri objasňovaní vzájomných vzťahov medzi jadrom a cytoplazmou pri biogenéze mitochondrií, umožňuje rozlíšením medzi jadrovou a mimojadrovou dedičnosťou definovať aj miesto mutácie. Genetická analýza mutanta 3D, výsledky ktorej sú zhrnuté v Tab. 1 ukázala, že mutácia podmieňujúca rezistenciu k mucidinu podlieha zákonitostiam cytoplazmatickej dedičnosti a splňuje všetky kritériá nutné k jej umiestneniu do mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny /Coen, D., Deutsch, J., Netter, P., Petrochilo, E., Slonimski, P.P.: v Miller, P.L., ed., Control of Organelle Development, Society of Experimental Biology Symposium, Vol. 24, Academic Press, New York 1970, s. 449/.

Tab. 1. Genetická charakterizácia mutanta 3D. Diploidy z krížení vyznačených v tabuľke sa testovali na mitotickú segregáciu replikovým výsevom na médiá obsahujúce glycerol a na médiá obsahujúce glycerol a príslušné antibiotiká /mucidin: 0,5 /ug/ml, chloramfenikol: 4 mg/ml, erytromycin: 2 mg/ml, oligomycin: 10 /ug/ml/. Testery: Saccharomyces cerevisiae 26-4 /a leu1 thr2-1 ρ^+ $C^S E^S O^S M^S$/, IL 8-8D /a ura1 ρ^+ $C^R_{321} E^R_{514}$ $O^S M^S$/, IL 126-1C /a ura1 ρ^+ $C^R_{321} E^R_{221} O^S M^S$/, 55R5-3C/1 /a ura1 ρ^+ $C^S E^S O^R_1 M^S$/. Vyznačené petity /ρ^-/ /pravdepodobne ρ^0/ sa izolovali po 24 hodinovej mutagenéze s etídium bromidom /25 /uM/. C^R/C^S, E^R/E^S, O^R/O^S, M^R/M^S : rezistentné a senzitívne alely mutačných miest determinujúcich citlivosť k chloramfenikolu, erytromycínu, oligomycínu a mucidinu.

Mitotická segregácia M^R/M^S medzi diploidmi po krížení				
ρ^+M^R	x	ρ^+M^S	Áno	/32-69 % M^R/
ρ^- z M^R	x	ρ^+M^S	Nie	/všetky M^S/
ρ^+M^R	x	ρ^- z M^S	Nie	/všetky M^R/
Meiotická segregácia v tetrádach			M^R/M^S	
Z diploidov rezistentných k mucidinu			4:0 /3:0/	
Z diploidov citlivých k mucidinu			0:4	
Rekombinácia medzi pármi znakov				
C - M			Áno	
E - M			Áno	
O - M			Áno	

V mucidín rezistentných mutantoch kvasiniek rezistencia mitochondriálneho elektrónového transportu k mucidinu in vivo môže byť dôsledkom buď zníženej priepustnosti plazmatickej membrány pre mucidin alebo dôsledkom zmien v samotnej mitochondriálnej membráne. Iným avšak menej pravdepodobným mechanizmom môže byť detoxifikácia. K objasneniu biochemického pozadia rezistencie preštudoval sa vplyv mucidinu na dýchanie intaktných buniek a izolovaných mitochondrií. Vplyv mucidínu na dýchanie izolovaných mitochondrií udáva [illegible] kde na ose x c je koncentrácia mucidinu v /ug/mg bielkovín a na ose y p je spotreba kyslíka vyjadrená ako percento kontroly /bez mucidinu/. Polarografická nádobka obsahovala v 2 ml: 0.6 M manitol, 20 mM KCl, 1,5 mM EDTA, 10 mM Tris-maleát, 10 mM KH_2PO_4, 10 mM citrát, 0,48 % etanol, 0,25 mM adenozíndifosfát, mitochondrie

/1,16 - 3,18 mg bielkovín/ a inhibítor ako je udané. Mitochondrie sa pripravili z protoplastov postupom Kováča a spol. /Kováč, L., Groot, G.S.P., Racker, E.: Biochim. Biophys. Acta 256, 55, 1972/. A -štandardný kmeň D 225-5A, B - mutant 3D.

Zistilo sa, že k mucidinu sú rezistentné nielen celé bunky ale aj izolované mitochondrie. Napriek tejto skutočnosti však mutant 3D nevykazoval žiadnu významnú zmenu v citlivosti k antimycínu A meranú tak in vivo ako aj in vitro /Tab. 2/. Znamená to, že v dôsledku mitochondriálnej mutácie došlo k zmene väzbových resp. inhibičných miest mucidinu na mitochondriálnej membráne,,pričom tieto miesta sa zdajú byť odlišné od odpovedajúcich miest pre antimycín A.

Tab. 2. Inhibícia dýchania celých buniek a izolovaných mitochondrií s mucidinom a antimycínom A. Polarografická nádobka obsahovala v 2 ml: 50 mM glutarát draselný, 10 mM KH_2PO_4, 10 mM KCl, 0,25% glukózu, 0,48% etanol, inhibítor a bunky kvasiniek /1,5 - 4,5 mg sušiny/ vyrastené do stacionárnej fázy v semisyntetickom médiu obsahujúcom 0,5 % glukózu ako zdroj uhlíka. Spotreba kyslíka izolovaných mitochondrií sa stanovila postupom uvedeným v [illegible]. Pred zmeraním respiračnej aktivity bunky alebo mitochondrie sa predinkubovali s antimycínom A na dobu 7 minút. Hodnoty I_{50} sú definované ako množstvo inhibítora potrebného k inhibícii dýchania na 50 % maxima kontrolnej aktivity bez inhibítora.

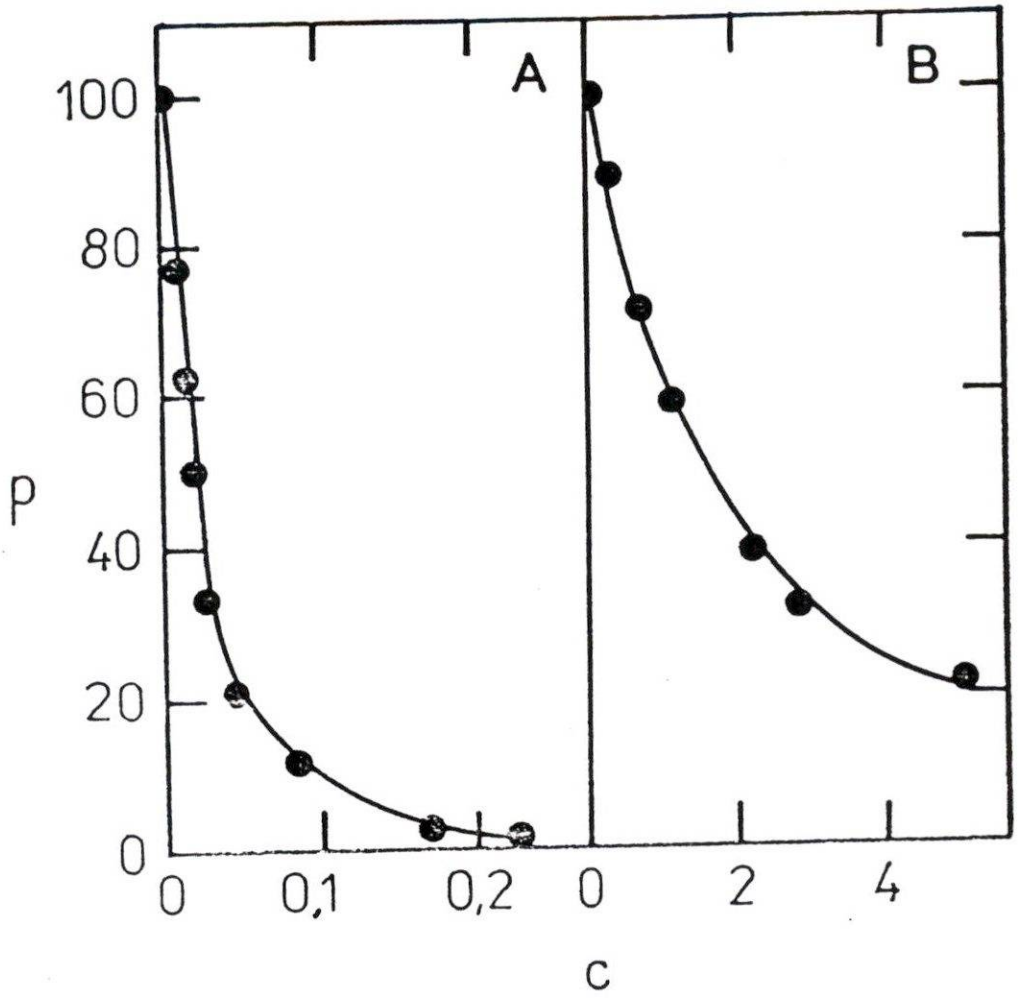
Kmeň	I_{50} Mucidin		I_{50} Antimycin A	
	Bunky /ug/ml	Mitochondrie /ug/mg bielkovín	Bunky /ug/ml	Mitochondrie /ug/mg bielkovín
D 225-5A	0,016	0,015	0,0045	0,035
3D	2,4	1,5	0,0050	0,042

Mutant 3D je prvým mitochondriálnym mutantom kvasiniek Saccharomyces cerevisiae s funkčnou oxidatívnou fosforyláciou, ktorý je rezistentný k špecifickému inhibítoru mitochondriálneho dýchacieho reťazca. Rezistencia k mucidinu u tohto mutanta je demonštrovateľná s rastúcimi bunkami podobne ako s izolovanými mitochondriami. Rezistencia k mucidinu u mutanta 3D je výsledkom mutácie lokalizovanej v mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseline. Novo identifikovaný mitochondriálny lókus podľa mucidinu dostal označenie MUC1. Skutočnosť, že mucidin inhibuje mitochondriálny transport elektrónov v mieste medzi cytochrómami b a c viedla k záveru, že rezistencia k mucidinu v mutante 3D je spojená so špecifickou modifikáciou membránovo viazaného polypeptidu mitochondriálneho cytochróm bc_1 komplexu respiračného reťazca, ktorý je kódovaný mitochondriálnou dezoxyribonukleovou kyselinou a pravdepodobne syntetizovaný vo vnútri mitochondrií. Najpravdepodobnejším kandidátom mitochondriálne syntetizovaného polypeptidu ubichinol-cytochrómc reduktázy, ktorý je génovým produktom mitochondriálnej dezoxyribonukleovej kyseliny v úseku zahrňujúcom lókus MUC1, je samotný cytochróm b /Weiss, H.: Biochim. Biophys. Acta 456, 296, 1976; Šubík, J.: Biol. listy, 43, 144, 1978/.

Predmet ~~predloženého~~ objavu významne prispel k objasneniu základných biochemických a genetických mechanizmov nežiadúcej rezistencie húb proti klinicky používanému čs. antibiotiku mucidinu /Mucidermin- SPOFA/. Viedol k identifikácii nových, štruktúru ubichinol-cytochróm c reduktázy kódujúcich génov mitochondrialnej dezoxyribonukleovej kyseliny a súčasne otvoril nový smer vo výskume biogenézy a genetiky mitochondrií: dal podnet k hľadaniu nových nástrojov výskumu vo forme mitochondriálnych mutantov rezistentných k inhibítorom respiračného reťazca - mucidinu,

antimycínu A, diuronu, funiculozínu, /~~Šubík, J. : Biol. listy 43, 144, 1978~~/, ktoré sa s úspechom využívajú v bádateľskom výskume pri prehlbovaní základných poznatkov o štruktúre, funkcii, biogenéze a genetike energiu tranformujúcich organel eukaryotických buniek.

Poznatky objasnené zo sledovaných predstaviteľov myxe-
bakterií, ako ďalší bodli uvedení čs.
autorské osvedčenia č. 184 049, 197 796
a 234 884.



QBA.

