

Биолог. журн. Армении, 3-4 (59), 2007

УДК 577.021

ДЕЙСТВИЕ НЕБЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ НА ИХ ОСНОВЕ НА МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

М.Б. ЧИГЧЯН, М.А. МЕЛКУМЯН Н.С. АВЕТИСЯН, Г.Г. ОГАНЕЗОВА,
А.М. ОГАНЕСЯН, А.А. АМБАРՇՄՅԱՆ, Н.А. ОГАНЕСЯН

ЗАО "НИИ Биотехнологии", 0056, Ереван

Изучено действие оптически активных небелковых α-аминокислот и пептидов на их основе на рост грамположительных и грамотрицательных бактерий и дрожжей. Показано, что рост всех тест-культур подавляется в присутствии β-гидроксиалейцина, о-метилсерина, алло-0-этилтиреонина, ВОО-аланил-аллилглицина и N-формил-метионил-аллилглицина. В случае β-гидроксиалейцина активность проявляет 2S-3R стереоизомер этой аминокислоты. Показано, что R и S формы аллилглицина ингибируют рост грамотрицательных бактерий и дрожжей, на грамположительных бактериях подавление роста не отмечено.

Դետազոտով է օպտիկական ակտիվ ոչ սպիտակուցային α-ամինաթթուների և քրամաց հիման վրա ստացված պեպտիդների ազդեցությունը գրամդրական, գրամբացասական բակտերիաների և շաքարասնկերի աճի վրա: Ցույց է տրված, որ β-հիդրօքսիլեյցինի, օ-մեթիլսերինի, ալլո-օ-էթիլտրեոնինի, ալլիլգլիցինի, ВОО-ալանիլ-ալլիլ-գլիցինի և N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-ալլիլգլիցինի ներկայությունը միջավայրում ճնշում է փոքրարկված մանրէների աճը: β-հիդրօքսիլեյցինի դեպքում ակտիվ է միայն նրա 2S-3R ստերեոիզոմերը: Ցույց է տրված նաև, որ ալլիլգլիցինի R և S ձևերը ճնշում են գրամբացասական բակտերիաների և շաքարասնկերի աճը, սակայն չեն ազդում գրամդրական բակտերիաների աճի վրա:

Inhibition of growth of grampositive and gramnegative bacteria and yeast with optically active non-protein α-amino acids and peptides on their base has been investigated. β-hydroxyaleucine, o-methyl-serine, allo-o-ethylthreonine, allyllycine, ВОО-alanyl-allyllycine and N-formyl-methionine-allyllycine inhibit the growth of all tested microorganisms. In the case of β-hydroxyaleucine inhibition is observed only with of 2S-3R stereoisomer. R and S forms of β-allyllycine inhibit the growth of gramnegative bacteria and yeast, but not the growth of grampositive bacteria.

Небелковые аминокислоты - микроорганизмы - ингибирование роста - мутагенез

Небелковые аминокислоты достаточно широко распространены в природе, известно около 700 небелковых аминокислот, большинство из которых выделено из растений и микроорганизмов [4]. Они не включаются в полипептидные цепи либо вследствие отсутствия специфической тРНК и кодонового триплета, либо из-за того, что образование их не связано с посттрансляционной модификацией белковых аминокислот [4].

В настоящее время химически синтезированные оптически активные небелковые α-аминокислоты необычного строения успешно применяются в

медицине, фармакологии, микробиологии и других областях науки. Так, оптически активные α -аминокислоты небелкового происхождения являются важными компонентами многих антиканцерогенных препаратов, антибиотиков, фармакологически и физиологически активных пептидов и других лекарственных препаратов [5, 8, 10, 12, 15]. Изотонно-меченые α -аминокислоты используются в медицинской диагностике в позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и качестве радиофармпрепаратов [9]. Известен иммуностимулирующий пептид-сонметид, стимулирующий фагоцитоз полиморфноядерных лейкоцитов и ингибирующий апоптозу, индуцированную антиканцерогенными препаратами [13, 14].

Небелковые аминокислоты и пептиды на их основе обладают антимикробным действием. Показано, что ряд триазолсодержащих небелковых аминокислот оказывают антибактериальное действие как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии [11]. Производные пептида пилорицилина, состоящие из небелковых аминокислот, обладают антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori* [7].

В настоящей работе представлены результаты исследования действия ряда оптически активных α -замещенных небелковых аминокислот и пептидов на их основе на различные микроорганизмы. В качестве тест-культур были отобраны грамположительные, грамотрицательные бактерии и дрожжи.

Материал и методика. Используемые в работе штаммы микроорганизмов и питательные среды культивирования приведены в табл. 1.

В работе использованы полноценные среды: мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон и синтетические среды Гловера и М9 [1].

Оптически активные небелковые аминокислоты и пептиды: β -имидазол-5-аланин (β -И-5-А), R- α -метил- β -фенилаланин (R-M- β -Ф) и S- α -метил- β -фенилаланин (S-M- β -Ф), R- α -аллилаланин (R- α -АГ) и S- α -аллилаланин (S- α -АГ), R- α -аллилаланин (R- α -АА), R- α -аллилизалин (S- α -АА), R- α -изовалин (R- α -ИВ) и S- α -изовалин (S- α -ИВ), 2S-3R- β -гидроксизалин (2S-3R- β -ГЛ) и 2R-3S- β -гидроксизалин (2R-3S- β -ГЛ), R- α -метилсерин (R- α -МС) и S- α -метилсерин (S- α -МС), алло- α -этилпролин (алло- α -ЭТ), ВОО-(S)-изанил-(S)-аллилаланин (В-S-ААГ), ВОО-аланил-(R)-аллилаланин (В-R-ААГ), N-формил-(S)-метилонил-(S)-аллилаланин (ФМ-S-АГ) и N-формил-(S)-метилонил-(R)-аллилаланин (ФМ-S-АГ). Эти соединения синтезированы в лаборатории синтеза небелковых аминокислот (ИИИ Биотехнология).

Хранение и культивирование микроорганизмов, нитрозоглициды индуцированной мутагенез проводили согласно стандартным методикам [1, 2].

Результаты и обсуждение. Действие небелковых аминокислот и пептидов на их основе на рост тестируемых микроорганизмов. Суточную культуру, выращенную в мясо-пептонном бульоне (МПБ), высевали газонном на чашки с соответствующей средой. Затем наносили кристаллик испытуемых соединений, либо 10 мкл 50 мМ раствора испытуемого небелкового соединения. Зону подавления (отсутствие газона в зоне нанесения вещества) начинали регистрировать после суточного инкубирования при соответствующей температуре. Как показали результаты исследований, из

14-и проверенных небелковых аминокислот ингибирующее действие на рост тестируемых культур оказывают β -гидроксипейцин, о-метилсерин, алло-о-этилтреонин и аллилглицин, а также дипептиды ВОС-аланил-аллил-глицина и N-формил-метионил-аллилглицина, содержащие S и R формы аллилглицина.

Таблица 1. Тест-культуры микроорганизмов

Культуры	Генотип и источник	t	Среда М9 ¹ [1]	Среда Гловер ¹ [1]	МПА
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA1, endA1, hsdR, argF</i> (НИИ Биотехнологии) [6]	37	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	37	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	37	+	+	+
<i>Salmonella typhimurim</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	37	-	+	+
<i>Corynebacterium lactofermentum</i> НИТИА88	<i>FP, AEC, leu, ser</i> (НИИ Биотехнологии) [3]	30	-	+	+
<i>C. flavum</i> E531	<i>AEC, met, thr</i> (НИИ Биотехнологии)	30	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	Дикий тип (ЕГУ)	30	+	-	+
<i>Bacillus sp.</i> (термофил)	Дикий тип (ЕГУ)	60	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	30	+	+	+
<i>S. fermenti</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	30	+	+	+
<i>Candida lipolytica</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	30	-	+	+
<i>Rhodotorula rubra</i>	Дикий тип (НИИ Биотехнологии)	30	+	+	+

¹ Для роста ауксотрофных штаммов в среды добавлялись соответствующие аминокислоты в концентрации 20 мкг/мл: для *E. coli* DH5 α - аргинин, для *C. lactofermentum* НИТИА-88 - лейцин, серин, для *C. flavum* E531 - метионин, треонин. (+) - рост микроорганизмов, (-) - отсутствие роста. FP - фтор пириват, AEC - аминокэтил цистенин.

Интерес представляют результаты испытания двух стереоизомеров β -гидроксипейцина, действие которых носит стереоселективный характер: подавление роста всех тест-культур на синтетических средах наблюдается только в присутствии 2S-3R- β -ГЛ, который является R энантиомером в отношении гидроксильной группы. 2R-3S- β -ГЛ - S энантиомер в отношении гидроксильной группы ингибирующего воздействия на рост исследуемых культур не оказывает (табл.2). Возможность снятия ингибирующего действия 2S-3R- β -ГЛ при культивировании на синтетических средах, содержащих различные сочетания аминокислот, определяли на следующих штаммах: *E. coli* DH5 α , *C. freundii*, *C. lactofermentum* НИТИА-88. Рост культур восстанавливается при добавлении в среду аминокислот семейства пировиноградной кислоты (аланин, валин, лейцин). Возможно, что 2-S-3-

R-ГЛ оказывает ингибирующее действие на фермент (ы), которые находятся под контролем этих аминокислот.

Таблица 2. Рост тест-культур в присутствии энантиомеров гидроксипролина

Культуры	2S-3R-β-ГЛ			2R-3S-β-ГЛ	
	СС	СС'	МПА	СС	МПА
<i>E. coli</i> DH5α		-	+	+	+
<i>C. freundii</i>	-	-	+	+	-
<i>C. lactofermentum</i> НИИТА 88	-	-	+	+	+

СС' - Синтетическая среда, содержащая валин, валин и лейцин.

Подавление роста всех тест-культур 2S-3R-β-ГЛ, R-о-МС, S-о-МС и алло-о-ЭТ свидетельствует о том, что в пределах выбранной нами модели действие их не является видоспецифическим (табл. 3). Можно предположить, что во всех тестируемых микроорганизмах имеются некие общие мишени для данных соединений. В случае тестирования АГ показано, что R и S энантиомеры этой аминокислоты подавляют рост проверенных грамотрицательных бактерий и дрожжей, а рост исследованных грамположительных бактерий энантиомерами АГ не подавляется (табл. 3).

Таблица 3. Рост тест-культур в присутствии небелковых аминокислот и пептидов

Культуры	R-о-МС		S-о-МС		алло-о-ЭТ		R-о-АГ		S-о-АГ		B-S-ААГ		ФМ-S-АГ	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>E. coli</i> DH5α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lactofermentum</i> НИИТА88	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. flavum</i> E531	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. (термофильн.)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. fermentii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. rubra</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1 - МПА, 2 - Синтетическая среда. Та же картина ингибирования роста тест-культур выявлена при проверке S-изомеров B-R ААГ и ФМ-R-АГ.

Изучение действия дипептидов, включающих аллилглицин, на рост тест-культур показало, что все проверенные пептиды ингибируют рост тестируемых микроорганизмов при культивировании как на полноценных, так и на синтетических средах, что свидетельствует о их антимикробной активности (табл. 3).

Изучение влияния небелковых аминокислот на НГ-индуцированный мутагенез. При определении возможной роли небелковых аминокислот в индуцированном мутагенезе тестировали только те аминокислоты, которые не проявляли ингибирующей активности в отношении тест-культур. Эксперименты проводили на штамме *S. flavum* E531, аукоотрофном по метионину и треонину (или гомосерину). В опытном образце в клеточную суспензию вместе с мутагеном добавляли раствор испытуемой небелковой аминокислоты в конечной концентрации 10 мг/мл. Обработанную культуру отмывали физиологическим раствором и с соответствующих разведений высевали на селективные среды. Как показали результаты экспериментов, добавление β-И-S-A к суспензии клеток при обработке мутагеном существенно снижает частоту НГ-индуцированных реверсий штамма по всем трем признакам (табл. 4). Все другие проверенные небелковые аминокислоты на частоты индуцированных реверсий не влияли.

Таблица 4. Частота НГ-индуцированных реверсий штамма *S. flavum* E531

Проба	Частота реверсии		
	метионин	треонин	гомосерин
НГ + β-имидазол-5-аланин	$4,2 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-6}$
контроль	$2,5 \times 10^{-1}$	$4,6 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$

Известно, что мутагенное действие НГ обусловлено алкилированием оснований в репликационной вилке. Полученные данные позволяют предположить, что влияние на НГ-индуцированный мутагенез может быть обусловлено взаимодействием β-И-S-A с ферментами репарации и репликации, участвующими в процессе НГ-индуцированного мутагенеза.

Таким образом, выявлено, что из ряда исследованных оптически активных небелковых аминокислот лишь 2-S-3-R-ГЛ, R-о-МС и алло-о-ЭТ одинаково ингибируют рост грамположительных, грамотрицательных бактерий и дрожжей. При этом 2-R-3-S-ГЛ стереоизомер таким свойством не обладает. R и S формы АГ проявляют определенную специфичность, подавляя рост только грамотрицательных бактерий и дрожжей. Что касается пептидов на основе небелковых аминокислот - все они ингибируют рост тестируемых культур. Действие на НГ-индуцированный мутагенез из всех тестируемых небелковых аминокислот оказывает только β-И-S-A.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. М., "Мир", 1983.
2. Клаус Р., Хейс У. Сборник методик по генетике микроорганизмов. М., 1970.
3. Читчан М.Б., Оганезова Г.Г., Агабекян Э.Л., Сакалян В.А., Карабекян Б.П., Бабасян Н.С., Кажоян С.В., Чахмахчян А.Г., Якимович Н.Н., Босенко А.М. Авторское свидетельство СССР No 1788011, 1992.

4. *Errett G.C.* Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids London., Chapmanand Hall,1985.
5. *Goulet M.T.* Annu. Rep.Med. Chem., 30, 169-177, 1995.
6. *Hanahan D. J.* Mol.Biol., 166, 557-580, 1985.
7. *Hasuoka A., Nashikimi Y., Kamiyama K. et al.* Antibiot. (Tokyo), 55, (3), 322-36, 2002.
8. *Janecka A.* Med. Chem. 38, 2922-2931, 1995.
9. *Nagren K., Halldin C.* J. of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals, 41, 831-841, 1998.
10. *Shio Y., Nakamori S.* Agric. Biol. Chem., 37, 2053-2061, 1973.
11. *Sanchev M., Pajpanova T., Golovinsky E.* Amino Acids, 18 (2), 77-91, 2000
12. *Takua T., Muraoka Y., Yoshioka T., Fuji A., Maeda K., Umezawa H.* Antibiot, 25, 755-780, 1972.
13. *Tsuruki T., Kishi K., Takahashi M. et al.* FEBS lett. 540, (1-3), 206-10, 2003.
14. *Tsuruki T., Takahata K., Yoshikawa M.* Peptides, 26, (5), 707-11, 2005.
15. *Van Der Vaan J., Barnik J., Bickelhaupt F.* Antibiot. 36, 784-790, 1983.

Поступила 15.VIII.2007