



Биолог. журн. Армении, 1 (66), 2014

МУТАГЕННЫЕ СВОЙСТВА ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННЫХ НЕБЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

М.Б. ЧИТЧЯН, А.С. САРКИСЯН, М.А. МЕЛКУМЯН,
Н.С. АВЕТИСЯН, Г.Г. ОГАНЕЗОВА, А.М. ОГАНЕСЯН, Н.А. ОГАНЕСЯН

НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА
arm_biotech@yahoo.com, nelliog@yahoo.fr

Исследовано влияние ряда гетероциклически замещенных небелковых аминокислот и пептидов на частоту спонтанного и индуцированного N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ) мутагенеза. В качестве тест-культуры использован ауксотрофный по метионину и треонину штамм *Corynebacterium flavum* E531. Показано, что трипептид N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил]-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин обладает мутагенным свойством. Аминокислоты (S)-β-[4-аллил-3-(3'-гидроксипропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, (S)-β-[4-аллил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, (S)-β-[4-пропил-3-изобутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и (S)-метокси-5-нитрофенилаланин обладают способностью понижать частоту индуцированных НГ мутаций, т.е. обладают антимутагенными свойствами. Обсуждаются возможные причины мутагенного/антимутагенного действия исследованных соединений.

Небелковая аминокислота – пептид – N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин – мутагенез

Չեստագրովել է մի շարք հետերոցիկլիկ տեղակալված ամինաթթուների և պեպտիդների ազդեցությունը սպոնտան և N-մեթիլ -N'-նիտրո- N-նիտրո- N-նիտրոզո-գուադիլինով (ՆԳ) ինդուցված մուտագենեզի հաճախականության վրա: Որպես թեստ կուլտուրա օգտագործվել է *Corynebacterium flavum* E531-ի շտամը, որը աուքսոտրոֆ է մեթիոնինի և թրեոնինի նկատմամբ: Ցույց է տրվել, որ N-ֆորմիլ-մեթիոնիլ-գլիցիլ-(S)-β-[4-ֆենիլ-3-պրոպիլ]-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը օժտված է մու-տագեն հատկությամբ: Իսկ (S)-β-[4-ալիլ-3-(3'-հիդրօքսիպրօպիլ)-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-ալիլ-3-բուտիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը, (S)-β-[4-պրօպիլ-3-իզօբուտիլ-5-թիօքս-1,2,4-տրիազոլ-1-իլ]-α-ալանինը և (S)-մեթօքսի-5-նիտրօֆենիլալանինը ՆԳ-ի միջոցով ինդուցված մուտագենեզի հաճախականությունը իջեցնում են՝ այսինքն ունեն հակամուտագեն հատկություններ: Քննարկվում են հետազոտված միացությունների մուտագեն/հակամուտագեն ազդեցության հնարավոր պատճառները:

Ոչ սպիտակուցային ամինաթթու – պեպտիդ – N-մեթիլ - N'-նիտրո- N-նիտրոզո-գուադիլին – մուտագենեզ

The influence of the number of heterocycle substituted nonprotein amino acids and peptides on the frequency of spontaneous and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG)-induced mutagenesis has been studied. The methionine and threonine auxotrophic *Corynebacterium flavum* E531 strain was used as test culture in mutagenesis experiments. It has been demonstrated that tripeptide N-formyl-methionyl-glycyl-(S)-β-[4-phenyl-3-propyl]-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]-α-alanine possesses mutagenic property. Amino acids (S)-β-[4-allyl-3-(3'-hydroxypropyl)-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]-α-alanine, (S)-β-[4-allyl-3-buthyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]-α-alanine, (S)-β-[4-propyl-3-isobuthyl-5-thioxo-1,2,4-triazol-1-yl]-α-alanine and (S)-methoxy-5-nitrophenyl have decreased the frequency of NG-induced mutagenesis. Thus these compounds have demon-

strated antimutagenic properties. The possible reasons of mutagenic/antimutagenic action of the considered compounds have been discussed.

Nonprotein amino acids – peptide – N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine – mutagenesis

Небелковые аминокислоты и пептиды природного происхождения обладают широким спектром различных функций [10]. Синтез новых небелковых аминокислот и пептидов на их основе значительно расширяет возможности усовершенствования биологически активных препаратов. Например, введение в состав пептидов небелковых аминокислот усиливает действие пептидов, возможно, за счет повышения их устойчивости к протеолитической деградации [6,7].

Наряду с исследованиями фармакологических свойств синтетических соединений важно также проводить оценку их генетической безопасности. Схема тестирования мутагенных свойств химических соединений, опубликованная в рамках Международной программы по химической безопасности (International Program on Chemical Safety IPCS), предполагает также проведение корреляции между мутагенными и канцерогенными свойствами соединений [4]. Известно, что большинство препаратов, применяемых для лечения онкологических заболеваний, являются мутагенами. Поэтому выявление новых мутагенов и механизмов их действия является важным этапом на пути создания более эффективных противоопухолевых препаратов.

При изучении мутагенных свойств небелковых аминокислот и пептидов нами ранее было показано, что β -имидазолилаланин снижает частоту НГ-индуцированного мутагенеза у *Corynebacterium flavum*, в то время как исследованные алифатические синтетические аминокислоты не влияют на частоту спонтанного и индуцированного мутагенеза [3]. В настоящей работе исследованы мутагенные/антимутагенные свойства гетероциклически замещенных небелковых аминокислот и синтезированных на их основе пептидов. В качестве тест-культуры выбран штамм *C.flavum* E531, ауксотрофный по метионину и треонину [2].

Материал и методика. Небелковые аминокислоты: (S)- β -[4-аллил-3-(3'-гидрокси-пропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин(393), (S)- β -[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (473), (S)- β -[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (472), (S)- β -[4-аллил-3-(2'-хлорфенил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (523), (S)- β -[4-аллил-3-(2'-метоксифенил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (524), (S)- β -[4-аллил-3-бензил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (476), (S)- β -[4-аллил-3-(фуран-2-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (478), (S)- β -[4-пропил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (789), (S)- β -[4-металлил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (787), (S)- β -[4-пропил-3-изобутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин (790), (S)-метокси-5-нитрофенилаланин ((DOS1). Исследовались также пептиды, состав которых приведен в табл. 1 и 2. Небелковые аминокислоты и пептиды синтезированы в НТЦ "Армбиотехнология" НАН РА [6,7].

Мутаген. В экспериментах использовался N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) (Sigma).

Штаммы и среды: В качестве тест культуры использовался штамм *C. flavum* E531 (met-, thr-, aescr). Клетки *C.flavum* E531 выращивались в полноценной жидкой или агаризованной питательной среде LB и синтетической среде, следующего состава: NH₄Cl - 0,5%, NH₄NO₃ - 0,1%, Na₂SO₄ - 0,2%, K₂HPO₄ - 0,3%, MgSO₄ - 0,01%, тиамин-100 мкг/мл, биотин -200 мкг/мл, глюкоза - 1%, pH 7,5. Плотные среды содержали 2% агара. Метионин, треонин и гомосерин добавляли в концентрации 20-40 мкг/мл.

N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина индуцированный мутагенез. Мутагенез проводился согласно стандартному методу [5]. НГ растворяли в 0,05 М ацетатном буфере, pH5,6. Клетки, находящиеся в лог-фазе, осаждались, промывались и ресуспендировались в 1/10 объема 0,05 М ацетатного буфера, содержащего испытуемые соединения.

Обработка культуры *C.flavum* E531 испытуемыми соединениями проводилась при температуре 37°C, в течение 15-20 мин. Обработанная культура осаждалась центрифугированием, промывалась, ресуспендировалась в 1 мл 0,9%-ном NaCl и высевалась на чашки с агаризованной синтетической средой без метионина и/или треонина. Для определения титра клеток культура высевалась на чашки с полноценной средой. Для определения частоты спонтанных реверсий клетки высевались на синтетическую среду, не содержащую метионин и треонин, или гомосерин.

Результаты и обсуждение. Мутагенные свойства небелковых аминокислот и пептидов исследовались вышеописанным методом. В эксперименте регистрировалось число ревертантов штамма *C. flavum* E531, полученных после обработки НГ (3,5 мМ), после обработки исследуемыми соединениями и после обработки совместно с исследуемым соединением и НГ. Результаты экспериментов приведены в табл. 1 и 2. Согласно полученным данным, после обработки клеток штамма *C. flavum* E531 N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланином (0,5 мг/мл) число ревертантов по всем трем маркерам возрастает. При этом титр клеток *C.flavum* E531 падает. Следует отметить, что трипептид N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин повышает также число НГ-индуцированных реверсий. Аминокислота (S)-β-[4-фенил-3-пропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин не влияет на частоту НГ-индуцированного мутагенеза. Не обладают таким свойством содержащий данную аминокислоту дипептид, трипептиды различного состава и трипептид N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (Мет-гли-472) (табл.1). Остальные исследованные соединения на частоту мутагенеза влияния не оказывают (данные не приведены). Однако некоторые соединения подавляют рост клеток. После обработки тест культуры N-формил-метионил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланином и N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланином титр клеток падает (табл.1).

Таблица 1. Действие (S)-β-[4-фенил-3-пропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина и содержащих его пептидов на частоту образования мутаций.

Соединение* (0,5мг/мл) НГ (3,5мМ)	Титр клеток	Титр клеток после обработки соединением	Среднее число ревертантов			
			(мет ⁺)	(тре ⁺)	(гом ⁺)	
Н ₂ O	1,5x10 ⁹	-	24±2	13±0	15±1	
НГ	1,5x10 ⁹	1,2x10 ⁸	1950±15	1006±5	1165±2	
473	-	1,09x10 ⁹	0,8x10 ⁹	33±1	20±1	23±1
	НГ	1,09x10 ⁹	2,8x10 ⁸	1984±6	1116±3	1201±4
Мет-473	-	1,1x10 ⁹	0,2x10 ⁹	29±3	19±2	25±1
	НГ	1,1x10 ⁹	3,1x10 ⁸	2209±5	1199±7	1223±2
Мет-гли-473	-	2,1x10 ⁹	3,6x10 ⁸	189±4	115±4	161±3
	НГ	2,1x10 ⁹	2,4x10 ⁸	4208±10	3187±7	3791±8
Мет-ала-473	-	1,3x10 ⁹	0,7x10 ⁹	36±3	25±1	25±1
	НГ	1,3x10 ⁹	3,9x10 ⁸	1905±3	1122±2	1193±4
Мет-гли-472	-	1,3x10 ⁹	1,1x10 ⁹	6±1	4±1	6±2
	НГ	1,3x10 ⁹	2,4x10 ⁸	2110±3	1381±3	1182±6

Мет-473-N-формил-метионил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин; Мет-гли-473-N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин; Мет-ала-473-N-формил-метионил-аланил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин; Мет-гли-472-N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-аллил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин.

Таким образом, выявлено, что N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин обладает мутагенными свойствами.

Отсутствие такой способности у соответствующей небелковой аминокислоты и содержащих ее пептидов, но другого состава, отличного от состава трипептида N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина, свидетельствует о том, что мутагенные свойства последнего обусловлены его структурными особенностями (рис.1).

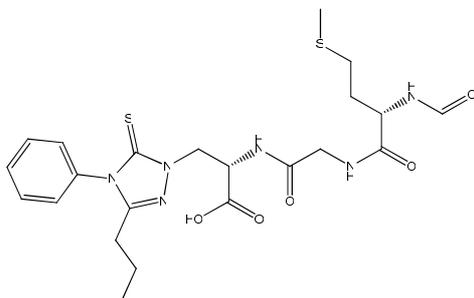


Рис.1. N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин.

У бактерий за появление мутаций ответственность несут главным образом O-6-алкил-гуанин-ДНК трансфераза и ферменты SOS системы [12]. В клетках *C. glutamicum* SOS регулон включает 48 генов, которые индуцируются в ответ на повреждение ДНК [8]. Одной из причин мутагенного действия N-формил-метионил-глицил-(S)-β-[4-фенил-3-пропил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина может оказаться индукция SOS ситемы, например, активацией ResA белка.

Частота индуцированных НГ-ном мутаций у штамма *C. flavum* E531 составляет приблизительно 1×10^{-5} . В ответ на действие некоторых исследованных нами аминокислот эта частота понижается от 3-х до 9-ти раз (табл.2). Согласно полученным данным, наиболее сильным антимуагенным действием обладает (S)-метокси-5-нитрофенилаланин (DOS1), формула которого приведена на рис.2.

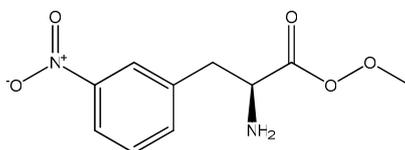


Рис.2. (S)-метокси-5-нитрофенилаланин (DOS1).

Таблица 2. Антимутагенное действие небелковых аминокислот

Соединение, (1мг/мл) НГ (3,5мМ)	Титр клеток	Титр клеток после обработки соединением	Среднее число ревертантов			
			(мет ⁺)	(тре ⁺)	(гом ⁺)	
H ₂ O	2,8x10 ⁹	-	29±0	16±1	26±1	
НГ	1,5x10 ⁹	4,5x10 ⁸	1289±11	1038±9	1104±12	
393	-	2,0x10 ⁹	1,4x10 ⁹	34±4	23±2	24±1
	НГ	3,2x10 ⁸	1,4x10 ⁸	375±5	280±6	305±5
790	-	1,5x10 ⁹	1,3x10 ⁹	33±3	19±1	29±2
	НГ	2,2x10 ⁹	2,7x10 ⁸	498±8	370±5	441±5
788	-	3,6x10 ⁹	1,8x10 ⁹	41±2	32±3	34±2
	НГ	5,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸	531±10	323±22	429±10
DOS 1	-	1,8x10 ⁸	1,3x10 ⁸	35±0	23±1	23±1
	НГ	1,8x10 ⁸	1,3x10 ⁸	188±6	119±3	147±8

Известно, что НГ-индуцированный мутагенез обусловлен метилированием ДНК, что приводит к неправильному спариванию оснований во время репликации. В результате происходит замена пары ГЦ на АТ [9]. У многих микроорганизмов метильная группа удаляется из метилированного основания ферментативным путем с участием О-6-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы. Падение частоты НГ-индуцированных мутаций может быть связано с подавлением метилирования ДНК. У *S. flavum* фермент аналогичный О-6-алкилгуанин-ДНК-аликилтрансферазе пока не идентифицирован.

Таким образом, нами выявлены гетероциклически замещенные небелковые аминокислоты, способные подавлять НГ-индуцированный мутагенез, т.е. способные подавлять метилирование ДНК. Кроме того, показано, что трипептид N-формил-метионил-глицил - (S) - β - [4-фенил-3-пропил]-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- α -аланин обладает мутагенным свойством, которое обусловлено структурой пептида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дангян В.Т., Саргсян Т.О., Джамгарян С.М., Гюлумян Э.А., Оганесян Н.А., Оганесян А.М., Паносян Г.А., Дангян Ю.М., Сагиян А.С. Синтез N-формильных ди- и трипептидов с использованием гетероциклически замещенных небелковых аминокислот и изучение их влияния на активность сериновых протеаз. Химический журнал Армении. 65, 4, 491-499, 2012.
2. Жданова Н.И., Гусятинер М.М. Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот. М.,ВНИИ СЭНТИ, 6, 1985.
3. Читчян М.Б., Мелкумян М.А., Аветисян Н.С., Оганезова Г.Г., Оганесян А.М., Амбарцумян А.А., Оганесян Н.А. Действие небелковых аминокислот и пептидов на их основе на метаболизм микроорганизмов. Биолог. журн. Армении. 59, 3-4, 248-253, 2007.
4. Eastmond D.A., Hartwig A., Anderson D., Anwar W.A., Cimino M.C., Dobrev I., Douglas G.R., Nohmi T., Phillips D.H., Viscers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. Mutagenesis. 24, 4, 341-349, 2009.
5. Foster P. In Vivo Mutagenesis. Methods Enzymol. 204, 114-125, 1991.
6. Hsu, J.T.A., Wang, H-Ch, Chen, G-Wu, Shih, Sh-Ru. Antiviral drug discovery targeting to viral proteases. Curr. Pharm. Des., 12, 1301-1314, 2006.
7. Minervini F., Algaron F., Rizzello C. G., Fox P. F., Monnet V., Gobetti M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl. Environ. Microbiol. 69, 9, 5297-5305, 2003.
8. Nishimura T., Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Gene expression profiling of Corynebacterium glutamicum during anaerobic nitrate respiration: induction of the SOS response for cell survival. J. Bacteriol. 193, 6, 1327-1333, 2011.
9. Pegg A.E., Byers T.L. Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. FASEB Journal, 6, 3, 2302-2310, 1992.
10. Ryan J.Th., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. Nutrients 3, 765-791, 2011.
11. Saghyan A.S., Simonyan H.M., Stepanyan L.A. Ghazaryan S.G., Geolchanyan A.V., Manasyan L., Ghochikyan V.T., Ghochikyan T.V., Hovhannisyan N.A., Gevorgyan A., Iaroshenko V.O., Langer P. Asymmetric synthesis of new β -heterocyclic (S)- α -amino-propionic acids. Tetrahedron: Asymmetry. 23, 11-12, 891-897. 2012.
12. Walker G.C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol. rev. 48, 1, 1984.

Поступила 12.09.2013