

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-129

**НОВЫЕ ПОЛИАМИНОКСИДАЗЫ ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИАМИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ*****NEW POLYAMINE OXIDASES FROM THERMOTOLERANT YEAST
FOR THE DETERMINATION OF POLYAMINES IN BIOLOGICAL FLUIDS**Е. П. Сергеев^{1,2}, Д. И. Головина^{1,2}, Д. Л. Атрошенко¹⁻³¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва³Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, МоскваE. P. Sergeev^{1,2}, D. I. Golovina^{1,2}, D. L. Atroshenko¹⁻³¹Lomonosov Moscow State University²Research Center of Biotechnology RAS, Moscow³Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow

✉ egor.sergeev@chemistry.msu.ru

Аннотация

Полиамины — низкомолекулярные соединения, являющиеся перспективным биомаркером различных патологий, в том числе при различных видах рака, нейродегенеративных заболеваниях. Одним из перспективных способов их анализа является ферментативное определение. В ходе нашей работы мы получили новые оксидазы полиаминов из дрожжей, перспективные для определения полиаминов в биологических жидкостях.

Abstract

Polyamines are low-molecular compounds that are promising biomarkers for various pathologies, including various types of cancer and neurodegenerative diseases. One of the suitable methods for their analysis is enzymatic determination. In the course of our work, we obtained new polyamine oxidases from yeast that have appropriate properties for determining polyamines in biological fluids.

Полиамины — продукты катаболизма аминокислот, участвующие в различных клеточных процессах. Их концентрация в биологических жидкостях человека может служить сигналом различных заболеваний, включая различные виды рака [1] и нейродегенеративные процессы [2]. На сегодняшний день наиболее распространенным методом их анализа является ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. Однако данный способ не позволяет работать с большим количеством образцов и требует дорогостоящего оборудования. В качестве альтернативы можно предложить ферментативный способ определения, основанный на использовании двух ферментов: оксидазы полиаминов и пероксидазы. Первый позволяет селективно окислять полиамины растворенным кислородом с образованием перекиси, второй — окислять при помощи перекиси фото- и флуорогенные субстраты.

В ходе работы мы клонировали гены, потенциально кодирующие полиаминоксидазы, из *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (3 гена), *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Lachancea thermotolerans* CBS 6340, *Sporopachyderma lactivora* Y-1647, *Cyberlindnera jadinii* Y-74, *Candida blankii* Y-2100. Из них при экспрессии в *Escherichia coli* нам удалось получить 5 ферментов в растворимой форме — все ферменты из *O. parapolymorpha* (ОраРАО1–3), фермент из *K. marxianus* (КмаРАО) и фермент из *L. thermotolerans* (ЛтеРАО). Из них один из ферментов *O. parapolymorpha* — ОраРАО2 — не проявлял активности с типичными субстратами полиаминоксидаз, а фермент из *L. thermotolerans* синтезировался в крайне малом количестве и выделялся с низкой чистотой на металл-аффинной хроматографии. При этом ферменты ОраРАО1 и ОраРАО3 обладают специфичностью к ацилированным полиаминам, в то время как КмаРАО показал активность со всеми распространенными полиаминами. Исходя из этого, мы изучили основные физико-химические свойства этих трех ферментов.

Все ферменты обладают умеренной термостабильностью (температура плавления глобулы для всех ферментов выше 55 °С по данным анализа ThermoFAD [3]). ОраРАО1 показала высокую удельную активность и каталитические константы (более 100 с⁻¹ для каждого субстрата), в то время как ОраРАО3 и КмаРАО проявили более низкие активности со своими субстратами (каталитические константы в диапазоне 1–10 с⁻¹). Все ферменты

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00121).

© Е. П. Сергеев, Д. И. Головина, Д. Л. Атрошенко, 2025

наиболее активны при pH, близком к 9. Кроме того, нами было замечено, что при окислении N^{1,12}-диацетилспермина нашими ферментами образуется путресцин, что повышает эффективную чувствительность для данного соединения и требует дальнейшего учета при количественном анализе полиаминов, поскольку из одной молекулы субстрата получается две молекулы перекиси. Таким образом, ОраРАО1 наиболее хорошо подходит для анализа общего уровня ацилированных полиаминов, а КмаРАО — общего уровня полиаминов. В ходе дальнейшей работы мы планируем оптимизировать методику пробоподготовки и определения полиаминов в таких биологических жидкостях, как слюна и моча.

Литература

1. Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities // *Nature Reviews Cancer*. 2018. Vol. 18, Iss. 11. P. 681–695.
2. Saiki S., Sasazawa Y., Fujimaki M. et al. A metabolic profile of polyamines in Parkinson disease: a promising biomarker // *Annals of Neurology*. 2019. Vol. 86, Iss. 2. P. 251–263.
3. Forneris F., Orru R., Bonivento D. et al. Thermo FAD, a ThermoFluor®-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding // *The FEBS Journal*. 2009. Vol. 276. P. 2833–2840.