**Влияние замены** **Met52/94Val на свойства митохондриальных пирофосфатаз**

***O. parapolymorpha* и человека**

***Безпалая Е.Ю.,1 Родина Е.В.,1Воробьева Н.Н.,2 Курилова С.А.2***

*Студентка, 6 курс специалитета*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

2*НИИ ФХБ МГУ имени М.В. Ломоносова*

*E-mail:* *bezpalaya.katya@gmail.com*

Неорганические пирофосфатазы (PPазы) – это ферменты, гидролизующие пирофосфат, который является продуктом многих биосинтетических реакций. M94V – одна из патогенных мутаций в человеческом гене митохондриальной пирофосфатазы PPA2. При наличии двух аллелей PPA2 с такой заменой человек становится подвержен различным кардиопатологиям [1].

Мы провели ряд экспериментов по характеристике белков дикого типа и мутантов M94V PPA2 из человека (hPPA2) и соответствующего остатка PPA2 дрожжей *O. parapolymorpha* (OpPPA2), полученных рекомбинантным способом. Сравнение ферментов из двух разных организмов позволило обнаружить, какие изменения свойств при мутации являются общими, что приблизило нас к пониманию влияния этой замены на функционирование митPPазы.

Судя по данным термофлуориметрического анализа, мутация не меняет термостабильность белков. Однако, исследование кинетики стационарного гидролиза пирофосфата магния показало ухудшение каталитических свойств в случае обоих организмов. Замена M52V в OpPPA2 приводит к снижению Vmax в 50 раз; также резко возрастает Km и ухудшается сродство к кофактору Mg2+. Замена M94V в hPPA2 также приводит к снижению Vmax, но не такому критическому; для этого белка значение Km и сродство к Mg2+ меняются несущественно. Исследование pH-зависимости Vmax показывает, что общей чертой влияния мутаций Met52/94Val на оба белка является увеличение pKa остатка, который выступает в качестве general base в катализе, депротонируя атакующую молекулу воды.

Была проведена симуляция молекулярной динамики белков дикого типа OpPPA2 (кристаллическая структура) и hPPA2 (получена гомологичным моделированием), а также мутантов Met52/94V. Данные расчетов показывают снижение подвижности полипептидной цепи в результате мутации у обоих белков. Также обнаружено нарушение взаимодействий с участием важных остатков активного центра.

Таким образом, вероятной причиной уменьшения активности мутантного белка является снижение гибкости цепи и нарушение позиции остатков активного центра, а также затруднение конформационных изменений, необходимых для образования атакующего нуклеофила. Известно, что метионин, находясь в гидрофобном коре, может положительно влиять на подвижность белка [2], что служит объяснением такого эффекта мутации на функционирование ферментов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00177.*

**Литература**

1. Guimier A., Gordon C.T., Godard F.. Biallelic PPA2 Mutations Cause Sudden Unexpected Cardiac Arrest in Infancy // The American Journal of Human Genetics. 2016. Vol. 99(3). P. 666-673.

2. Heiby J.C., Goretzki B., Johnson C.M. Methionine in a protein hydrophobic core drives tight interactions required for assembly of spider silk // Nature Communications. 2019. Vol. 10. A. 4378.