**Роль DHHA2-домена в механизме регуляции нуклеотид-регулируемых пирофосфатаз**

***Замахов И.М.***

*Студент 6 курса специалитета*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,*

*химический факлуьтет, Москва, Россия*

*E-mail:* *izmozi1999@gmail.com*

Нуклеотид-связывающие CBS-домены (названые по белку cystathionine β-synthase) являются универсальными функциональными регуляторами, найденными во многих белках, в том числе в участвующих в патогенезе наследственных заболеваний. CBS-домены имеют высокое сродство к производным аденозина и опосредуют аллостерическую регуляцию активности ферментов и транспортных белков. Молекулярный механизм регуляции не установлен, поскольку сложная многодоменная структура и характерная конформационная подвижность большинства CBS-содержащих белков затрудняет получение структурной информации.

CBS-пирофосфатаза осуществляет гидролиз пирофосфата – побочного продукта большинства биосинтетических реакций [1] и состоит из двух каталитических доменов – DHH и DHHA2, и регуляторной части, образованной функциональной парой CBS-доменов и DRTGG-доменом. Активный центр белка расположен на границе каталитических доменов. Связывание AMP и ADP в регуляторной части ингибирует фермент, а связывание АTP и ApnA (n = 3-6) напротив активирует его. Разнообразие путей регуляции, относительно широкая эффекторная специфичность и налаженная методика выделения CBS-пирофосфатаз – делает их удобным модельным объектом для установления и дальнейшего изучения механизма регуляции CBS-содержащих белков.

Ранее было показано, что СBS-пирофосфатазы являются гомотетрамерами со сложными межсубъединичными контактами регуляторных и каталитических частей [2]. Из двух структур регуляторных частей в комплексе с активатором (Ap4A) или ингибитором (АМР) дополнительно известно о значимой конформационной подвижности CBS2-доменов. Также известно, что активность белка опосредуется движением DHHA2-домена в ходе каталитического цикла. На данных основаниях была предложена гипотеза, согласно которой, связывание CBS-доменами эффекторов формирует регуляторный сигнал, финальным акцептором которого выступает DHHA2-домен – чья значимая для активности подвижность модулируется в процессе регуляции конформационными перестройками тетрамера. Целью данной работы являлось установление роли DHHA2-домена в механизме регуляции CBS-пирофосфатаз.

В ходе работы была получена мутантная форма CBS-пирофосфатазы из *Desulfitobacterium hafniense* c делецией DHHA2-домена. Для неё было показано отсутствие активности с сохранением гомотетрамерной организации. Методом изотермического калориметрического титрования было выявлено влияние делеции на связывание активатора (Ар4А), а методом флуоресцентной спектроскопии на связывание флуоресцентного аналога ингибитора (Mant-AMP). Методом ThermoFluor было показано влияние делеции на термостабильность белка. С помощью методов моделирования (в Modeller и AlphaFold2) были предложены структурные объяснения.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-74-00031.*

**Литература**

1. Baykov A.A., Anashkin V.A., Salminen A., Lahti R. Inorganic pyrophosphatases of Family II: two decades after their discovery // FEBS Letters. 2017. Vol. 591. 20. P. 3225-3234.

2. Anashkin V.A., Salminen A., Orlov V.N., Lahti. R., Baykov A.A. The tetrameric structure of nucleotide-regulated pyrophosphatase and its modulation by deletion mutagenesis and ligand binding // Arch. Biochem. Biophys. 2020. Vol. 692. 108537. P. 1-10.