

Структурные основы функциональных дефектов митохондриальной пирогосфатазы PPA2 при мутациях, вызывающих кардиопатологии человека

Родина Е.В.^{1*}, Безпала Е.Ю.¹, Курилова С.А.^{1, 2}, Воробьева Н.Н.²

¹ Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* rodina@belozersky.msu.ru

Ключевые слова: неорганическая пирогосфатаза; митохондрия; структура; мутация; конформационные перестройки

Мотивация и цель: Неорганические пирогосфатазы (РРазы) катализируют гидролиз пирогосфата, обеспечивая протекание важнейших биосинтетических реакций. Ядерный геном животных и дрожжей кодирует две различные формы пирогосфатазы: РРА1 (цитоплазматическая) и РРА2 (митохондриальная). Цитоплазматические РРазы и их гомологи в микроорганизмах – хорошо изученные ферменты, в то время как о строении, функции и биологической роли митохондриальных гомологов известно очень мало. Из данных литературы известно, что РРА2 дрожжей *S. cerevisiae* необходима для аэробного метаболизма и сохранения целостности митохондриальной ДНК [1]. РРА2 человека, по-видимому, также играет критически важную роль в функционировании митохондрий. Так, природные биаллельные мутации в гене *ppa2* приводят к митохондриальным кардиопатологиям, для которых характерны дефекты в экспрессии и/или каталитической активности РРА2 [2, 3]. При этом мутированные остатки не имеют очевидной связи с функционально важными элементами белка, а спектр и тяжесть клинических проявлений варьируют у различных пациентов без корреляции с конкретными мутациями. Для выяснения молекулярных основ данного заболевания необходимо более полное понимание метаболической роли РРА2, ее регуляции в клетке, а также влияния конкретных мутаций на структуру и функцию фермента. Целью настоящей работы является характеристика *in vitro* каталитических свойств РРА2, получение и анализ структуры РРА2, а также характеристика изменений структуры и функции РРА2 при мутациях, соответствующих патогенным заменам фермента человека.

Методы и алгоритмы: Для функциональной характеристики РРА2 и мутантных вариантов *in vitro* исследовали стационарную кинетику гидролиза $MgPP_i$. Связывание лигандов и оценку влияния мутаций на структуру рекомбинантных белков характеризовали стандартным набором биохимических и расчетных методов, включая термофлуориметрию, изотермическую калориметрию и молекулярный докинг. Структурная характеристика РРА2 включала анализ полученной в рамках работы кристаллической структуры РРА2 из *O. parapolymorpha* (OpPPA2) и модели структуры РРА2 человека (hPPA2). Поведение структуры в растворе и влияние на нее мутаций исследовали с помощью симуляции молекулярной динамики.

Результаты: В работе были определены функциональные параметры hPPA2: каталитические параметры $V_{\max}$ и K_m , константы диссоциации комплексов ферментов с кофакторными ионами Mg^{2+} , константы ионизации каталитически важных групп фермента и фермент-субстратного комплекса. Также в работе исследован мутантный вариант Met94Val, соответствующий патогенному природному варианту. Этот вариант вызывает интерес, поскольку трудно представить, каким образом гомологичная замена гидрофобного остатка на такой же гидрофобный остаток приводит к столь серьезной митохондриальной дисфункции. Ранее в литературе было выдвинуто предположение, что такая замена приводит к дестабилизации белковой структуры [3], однако в нашей работе показано, что данная мутация не снижает стабильность белка, а изменяет именно его каталитические свойства. Согласно нашим результатам, в рекомбинантном белке замена Met94Val значительно снижает $V_{\max}$ и приводит к увеличению pK_a каталитического основания, необходимого для активации молекулы воды при образовании атакующего нуклеофила. Также значительно снижается сродство фермента к ингибитору – фторид-иону, имитирующему атакующий нуклеофил. Аналогичная замена в OrPPA2 (Met52Val) характеризуется такими же функциональными последствиями и дополнительно приводит к существенному снижению сродства фермента к кофактору Mg^{2+} и субстрату $MgPP_i$. Таким образом, причиной функциональных дефектов при мутации Met94Val (Met52Val в OrPPA2), вероятно, является нарушение образования атакующего нуклеофила. При этом изменения глобальной структуры белка в результате данной мутации не происходит.

Ранее в работе была получена кристаллическая структура OrPPA2 в холоформе (комплексе с кофакторными ионами Mg^{2+}) с разрешением 1.8 Å. Анализ этой структуры, а также модельной структуры hPPA2 показывает, что остаток Met52 (как и аналогичный ему Met94 в hPPA2) расположен в гидрофобном коре белковой глобулы и участвует в заякоривании пептидных групп каталитически важных остатков активного центра – лигандов кофакторных Mg^{2+} и субстрата (остатки Glu97 и Tyr142 в hPPA2). Замена Met на более короткий Val может ухудшать связи между этими каталитическими остатками и гидрофобным кором, тем самым приводя к нарушению пре-организации активного центра и, как следствие, к снижению каталитической эффективности. Симуляция молекулярной динамики, выполненная как на OrPPA2 и его мутантном варианте Met52Val, так и на белке человека hPPA2 и его мутантном варианте Met94Val, подтверждает это предположение. Кроме того, обнаружено, что в результате данной мутации в обоих ферментах снижается общая подвижность полипептидной цепи. Анализ полученных в динамике данных методом PCA (анализа главных компонент) также показывает, что характер конформационных изменений изменяется в результате мутации. Согласно данным литературы [4], замена метионина на валин часто снижает структурную адаптабельность белкового кора, которая требуется для функционально важных конформационных изменений; вероятно, в случае PPA2 это приводит к затруднению тех перестроек, которые необходимы для получения и активации атакующего нуклеофила.

Анализ других остатков, мутаций которых в hPPA2 приводят к кардиопатологиям, показывает, что консервативные и полуконсервативные позиции (Ser61, Met106, Arg127, Pro167, Glu172, Pro228) сохраняются и в цитоплазматических гомологах PPA1. Предположительно, их роль в структуре и функции белка не специфична

именно для митохондриальной формы фермента, а их замены имеют схожие проявления во всех гомологичных РРazaх, как это наблюдается для Met94. Симуляция молекулярной динамики позволяет предсказать, какое влияние эти мутации могут оказывать на структуру и свойства белка.

Кристаллическая структура OpPPA2 и модельная структура hPPA2 также были использованы для картирования группоспецифичных аминокислотных остатков и анализа структурных детерминант, отличающих митохондриальный фермент от цитоплазматических гомологов. Согласно этому анализу, структура PPA1 более компактна, в то время как в PPA2 содержатся дополнительные структурные элементы (в основном петли), которые, по-видимому, участвуют в молекулярном узнавании PPA2 клеточными партнерами. Группоспецифичные аминокислотные остатки, отличающие PPA2 от PPA1, расположены в основном на поверхности белка и кластеризуются в области, которая предсказана как аллостерический центр, что также может иметь отношение к функциональным различиям PPA2 и PPA1.

Выводы: Проведенный анализ позволил выявить структурные основы каталитической несостоятельности мутантного варианта Met94Val в митохондриальной пирогосфатазе человека hPPA2. Полученные данные также позволяют предсказать функциональные дефекты и в результате других замен, соответствующих патогенным мутантным вариантам hPPA2.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ (№ 23-24-00177).

Structural basis for the functional defects in mitochondrial inorganic pyrophosphatase PPA2 caused by mutations responsible for human cardio pathologies

Rodina E.^{1*}, Bezpalaya E.¹, Kurilova S.^{1, 2}, Vorobyeva N.²

¹ Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia

* rodina@belozersky.msu.ru

Key words: inorganic pyrophosphatase; mitochondria; structure; mutation; conformational changes

Motivation and Aim: Inorganic pyrophosphatase (PPase) catalyze hydrolysis of inorganic pyrophosphate thereby supporting the key biosynthetic reactions. The nuclear genome of animals and yeast codes for the two forms of pyrophosphatase: cytoplasmic (PPA1) and mitochondrial (PPA2). Cytoplasmic pyrophosphatases and their homologs from microorganisms are well studied enzymes, whereas the knowledge on the structure, function, and metabolic role of mitochondrial homologs is scarce. PPA2 from yeast *S. cerevisiae* is necessary for the aerobic metabolism and maintaining mitochondrial DNA [1]. In human, PPA2 is thought to be critically important for the mitochondrial function. Biallelic mutations in the gene *ppa2* are responsible for the mitochondrial cardio pathologies with impaired expression and/or catalytic activity of PPA2 [2, 3]. The affected patients demonstrate a wide spectrum of clinical manifestations of varying severity without correlation with particular mutations, while mutated residues have no obvious connection to the functionally important protein elements. Identification of the

molecular basis of this disease requires a detailed understanding of PPA2 metabolic role, regulation, and the impact of particular mutations on the enzyme structure and function. This work is aimed at the *in vitro* characterization of the catalytic properties of PPA2, analysis of its structure, and the characterization of the effects of mutations responsible for human cardio pathologies on the protein structure and function.

Methods and Algorithms: *In vitro* functional characterization of PPA2 and its mutant variants included steady-state kinetics of MgPP_i hydrolysis. Ligand binding and the effects of mutations on the recombinant proteins structure was studied by a standard set of biochemical and computational methods including Thermofluor, ITC, molecular docking etc. Structural characterization of PPA2 included the analysis of a crystal structure of *O. parapolymorpha* PPA2 (OpPPA2) obtained earlier in this work, and of the modelled structure of human PPA2 (hPPA2). The solution dynamics of these structures and the effects of mutations was studied by the molecular dynamic simulation.

Results: In this work we determined functional parameters of hPPA2: catalytic parameters $V_{\max}$ and K_m , dissociation constants of the enzyme complexes with cofactor Mg^{2+} , ionization constants of the catalytically important ionizable groups of the enzyme and enzyme-substrate complex. Mutant variant Met94Val corresponding to a pathogenic natural variant has also been characterized. This variant was of especial interest: this is unclear how exactly a homologous substitution of a non-polar residue with another non-polar residue can cause a severe mitochondrial disfunction. It has earlier been suggested [3] that this mutation destabilizes protein structure; however, we found in the present work that this mutation affects catalytic properties of PPase without global changes in its structure or stability. We demonstrate here that the mutation Met94Val in recombinant enzyme significantly decreased $V_{\max}$ and increased pK_a of catalytic base required for the activation of a water molecule to become an attacking nucleophile. Another effect of mutation is a drastically decreased affinity for the fluoride ion inhibiting PPases by mimicking the attacking nucleophile. Analogous mutation in OpPPA2 (Met52Val) is characterized by similar functional defects; in addition, affinity for the cofactor Mg^{2+} and substrate MgPP_i is drastically decreased in this variant. Therefore, the impaired formation of the attacking nucleophile is presumably the leading cause of a functional incompetence of Met94Val (Met52Val in OpPPA2), while there is no evidence of this mutation causing global structural changes.

Within this work we have earlier obtained a crystal structure of OpPPA2 in a holoform (i. e. complexed with two cofactor Mg^{2+} ions) at 1.8 Å resolution. Analysis of this structure as well as of a model structure of hPPA2 demonstrates that Met94 in hPPA2 (similarly to Met52 in OpPPA2) is located in the protein core inside a beta-barrel and participated in anchoring peptide groups of catalytically important residues of the active site (Glu97 and Tyr142 in hPPA2) which coordinate cofactor Mg^{2+} and substrate. Substitution of Met with shorter Val may disrupt the connections between these catalytic residues and the protein core, thereby distorting the pre-organized active site architecture and as a consequence decreasing catalytic efficiency. Molecular dynamic simulation performed on four proteins (wild-type hPPA2 and Met94Val, wild-type OpPPA2 and Met52Val) confirmed this supposition. We additionally found that this mutation in both proteins caused the decrease in the global flexibility of a polypeptide chain. Analysis of molecular dynamics data by PCA (principal Component Analysis) showed that mutation changes the mode of conformational dynamics of a protein in solution. According to the modern views in protein structure, substitution of methionine with valine or other branched-chain aliphatic residues decrease the structural adaptability of protein core

required for the functionally important conformational rearrangements [4]. We suppose that in the case of PPA2 such a mutation may impair the rearrangements required for the formation and activation of an attacking nucleophile.

Analysis of other residues related to the pathogenic mutations in hPPA2 demonstrates that residues same or similar in both hPPA2 and OpPPA2 (Ser61, Met106, Arg127, Pro167, Glu172, Pro228) are also conserved in cytoplasmic homologs, PPA1. Presumably, their role in PPase structure and function is not specific for mitochondrial form PPA2, but rather their mutations would similarly affect all homologous PPases, as we observe for Met94 mutation. Molecular dynamic simulation allows an insight into these effects on the protein structure and function.

Crystal structure of OpPPA2 and a model structure of hPPA2 have also been used in this work for the mapping of group-specific amino acid residues and the analysis of the structural determinants that distinguish mitochondrial enzyme from cytoplasmic homologs. This analysis shows that PPA1-type structure is more compact while PPA2-type structures have additional structural elements (mostly loops) which, presumably, are involved in molecular recognition of PPA2 by cell partners. Most of group-specific amino acid residues distinct in PPA2-type and PPA1-type PPases are located at the protein surface and are clustered at a region predicted to be an allosteric site. This can also be related to a functional distinction between PPA2 and PPA1 proteins.

Conclusion: The combined analysis performed in the work allows an insight into the structural basis of the catalytic incompetence of a mutant variant Met94Val in human mitochondrial pyrophosphatase hPPA2. The data obtained in the work allow the prediction of functional defects caused by another pathogenic mutant variants of hPPA2.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (No. 23-24-00177).

Список литературы/References

1. Lundin M., Baltscheffsky H., Ronne H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J Biol Chem.* 1991;266:12168-12172
2. Guimier A., Gordon C.T., Godard F. et al. Biallelic PPA2 mutations cause sudden unexpected cardiac arrest in infancy. *Am J Hum Genet.* 2016;99:666-673. doi 10.1016/j.ajhg.2016.06.021
3. Kennedy H., Haack T.B., Hartill V. et al. Sudden cardiac death due to deficiency of the mitochondrial inorganic pyrophosphatase PPA2. *Am J Hum Genet.* 2016;99:674-682
4. Aledo J.C. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Sci.* 2019;28(10):1785-1796. doi 10.1002/pro.3698