

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

© 2020 г. А.Б. Узденский

Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета,
344090, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

E-mail: auzd@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 03.02.2020 г.

Удивительно небольшое количество генов человека (19–20 тысяч) не согласуется с намного большим числом белков и количеством их функций. Один из факторов функционального разнообразия – многофункциональность белков. Важным подвидом таких белков являются moonlighting белки, у которых одна полипептидная цепь в разных условиях выполняет две и более функций. Часто это избыточные белки домашнего хозяйства – гликолитические, рибосомные и т.д. В обзоре рассмотрены структуры и функции нескольких таких белков – рибосомного белка рS3, цитохрома с, глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназы, факторов транскрипции STAT3, β-катенина и р53. Важную роль в переключении их функций играют нарушение баланса процессов синтеза, использования и деградации, изменение внутриклеточной локализации, посттрансляционные модификации. Отмечена существенная роль внутренне неупорядоченных участков в формировании межмолекулярных комплексов с другими белками и нуклеиновыми кислотами. Обсуждается вопрос о возникновении многофункциональных белков в ходе эволюции.

Ключевые слова: многофункциональные белки, цитохром с, GAPDH, β-катенин, STAT3, р53.

DOI: 10.31857/S0006302920030059

Молекулярная биология двадцатого столетия базировалась на ряде классических постулатов, таких как «В ДНК содержится информация о структуре всех белков и РНК организма». К ним также относилось утверждение Бидла и Тэйтума (1941): «Один ген – один фермент» [1], которое позднее трансформировалось в постулат «Один ген – один белок», а после уточнения – «Один цистрон – одна полипептидная цепь». Другой важнейший постулат сформулирован Анфинсеном [2]: «Первичная структура белка, т.е. последовательность аминокислот, которая однозначно определяет последовательность нуклеотидов в ДНК, однозначно определяет его пространственную структуру и функциональную активность».

Но факты, полученные в последнее время, показали, что эти положения не вполне соответствуют современному состоянию молекулярной

биологии. Сначала предполагали, что у человека порядка миллиона генов. Потом эту оценку снизили до 40–100 тысяч. Но секвенирование геномов человека и других организмов в начале XXI века привело к ошеломляющему открытию: у человека всего около 20 тысяч генов, кодирующих белки [3]. Это величина того же порядка, что у примитивной нематоды *Caenorhabditis elegans*. Откуда же берется сложность организма? В чем, если не в генах, причина отличия человека от червя? Вероятно, дело не столько в генах, сколько в белках. Действительно, количество белков значительно больше числа генов. Тут нет никакого однозначного соответствия. Точное количество белков неизвестно. В базе данных UniProtKB/Swiss-Prot на 2014 г. зафиксировано около 500 тысяч белковых аминокислотных последовательностей [4]. В банке данных Protein Data Bank представлены более 150 тысяч трехмерных структур белков [5]. Количество структурных протеоформ, т.е. локальных вариаций исходной аминокислотной последовательности, которые определяются в тканях с помощью масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии, двухмерно-го или капиллярного электрофореза и других методов, составляет несколько миллионов [6, 7]. А число идентифицированных полиморфизмов в

Сокращения: MLP – moonlighting proteins, Araf-1 – Aporotic protease-activating factor 1, GAPDH – глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназа, STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3, DBD – DNA-binding domain (домен, связывающийся со специфическими участками ДНК), TAD – transactivation domain (трансактивационный домен), р53RE – р53-response element, TET – tetramerization domain (домен, ответственный за тетрамеризацию), IDR – intrinsically disordered regions (внутренне неупорядоченные участки).

человеческом геноме превышает 150 миллионов [7]. Несомненно, что информация о всех клеточных белках содержится в геноме. Но почему количество белков в разы превышает количество генов?

Основными источниками разнообразия протеоформ являются: альтернативный сплайсинг мРНК, аминокислотные замены в белках в результате однонуклеотидного полиморфизма (SNP – single nucleotide polymorphism) и ковалентные посттрансляционные модификации. В случае посттрансляционных модификаций к белкам присоединяются небольшие молекулярные группы – метильные, ацетильные, фосфатные и т. п. или большие полимерные цепи – липидные, углеводные (гликозилирование), белковые (убиквитинирование), нуклеотидные (поли-АДФ-рибозилирование). От белков также могут отщепляться небольшие ингибирующие пептиды. Все же, несмотря на огромное разнообразие протеоформ, количество канонических белков, которые встречаются чаще альтернативных форм, и которые наиболее похожи на ортологические формы белков у других организмов [7], значительно превосходит число генов. В каждой клетке есть свой набор белков, состав и количество которых (белковый профиль) динамичны и определяются сложнейшей сетью сигнальных каскадов, реагирующих на внешние воздействия, меняющих метаболизм и гомеостаз.

Белковое разнообразие можно условно разделить на разнообразие структур и разнообразие функций. Различные белковые структуры, например, разные сплайсоформы, могут, хотя и с разной эффективностью, выполнять одну и ту же функцию. С другой стороны, один белок может в разных условиях выполнять разные функции. Тем не менее большое число структурных протеоформ не означает такое же большое число выполняемых ими функций. Многие протеоформы не активны и ликвидируются в клетке. Замены аминокислот могут носить безразличный характер и не влиять на активность белка, хотя во многих случаях они приводят к нарушениям функций и гибели клетки [7].

Важнейший механизм белкового разнообразия и происхождения новых белков – альтернативный сплайсинг, при котором из пре-мРНК вырезаются значительные фрагменты – интроны, а оставшиеся фрагменты – экзоны – сшиваются и после дополнительного процессинга формируют зрелую мРНК. В среднем, в каждом гене содержится четыре-пять экзонов, иногда их больше десятка, и разные их комбинации могут в принципе дать начало новым белкам [8]. Количество сплайсоформ, т.е. РНК-транскриптов, в клетках человека оценивалось в 80–200 тысяч, т.е. от четырех до десяти на каждый ген [9]. Однако изучение реально существующих сплайсо-

форм показывает, что в результате экспрессии большинства генов реализуется одна основная белковая изоформа, которая оптимально соответствует биологическому предназначению, более консервативна и не имеет нарушений в функциональных доменах. Альтернативный сплайсинг ткане- и видоспецифичен: в других тканях или в других организмах могут преобладать альтернативные сплайсоформы, но обычно их количество ограничено. Хотя многие пре-мРНК могут подвергаться альтернативному сплайсингу, большинство возможных сплайсоформ в клетках не образуется и не транслируется [9]. Например, ген белка-предшественника амилоида (APP – amyloid precursor protein) содержит 18 экзонов. Однако из множества возможных комбинаций в клетках встречаются только три похожие альтернативные изоформы: APP695, APP751 и APP770, из которых в мозге преобладает APP695 [10]. По всей видимости, альтернативный сплайсинг играет ограниченную роль в сложности клеточного протеома, в его белковом разнообразии.

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Многофункциональность белков обеспечивается их структурой, доменной организацией. Переключение функций может происходить при связывании аллостерических регуляторов, посттрансляционных модификациях, изменении внутриклеточной локализации и микроокружения, при внешних воздействиях и т.д. Это в разы увеличивает функциональную предопределенность, задаваемую генами. В базе данных Multi-taskProtDBII на декабрь 2018 г. собраны данные о почти 700 многофункциональных белках (табл. 1) [11, 12].

Схематично белки можно разделить на две категории:

1. «Ферменты», в активном центре которых осуществляются биохимические или биофизические процессы, т.е. разрыв или образование химических связей в результате перестройки электронных оболочек атомов; переноса заряженных частиц (электронов, протонов, ионов) или фрагментов молекул и т.д.

2. «Платформы», у которых поверхностные участки распознают комплементарные поверхности других молекул при сборке надмолекулярных комплексов. Процессы сборки включают поиск и сближение взаимодействующих молекул за счет дальнедействующих сил (электростатических, ван-дер-ваальсовых); причаливание (докинг), связывание комплементарных поверхностей с участием электростатических, ван-дер-ваальсовых, водородных и гидрофобных взаимодействий; конформационную подстройку и активацию комплекса. На распознавании и взаимо-

Таблица 1. Базы данных о moonlighting-белках

Базы данных MLP	Число MLP белков (на декабрь 2018)	URL
MultitaskProtDB-II (мультифункциональные белки, включая MLP)	694	http://wallace.uab.es/multi taskII
MoonProt	361	http://moonlightingproteins.org/
MoonDB v2.0	351	http://moondb.hb.univ-amu.fr/

действию «платформ» основана самосборка белковых комплексов и комплексов белков с нуклеиновыми кислотами (рибосомы, нуклеосомы, транскрипционные и репарационные комплексы и т.п.). В зависимости от прочности взаимодействия такие комплексы могут быть стабильными или короткоживущими.

С физиологической точки зрения, многие сигнальные белки, такие как протеинкиназы, фосфатазы, ацетилтрансферазы или деацетилазы, многофункциональны. Осуществляя посттрансляционные модификации (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и т.п.), они активируют или ингибируют разные белки, включают, выключают или переключают их функции и тем самым регулируют разнообразные клеточные процессы. Более высокий уровень регуляции — факторы транскрипции, регулирующие экспрессию целых комплексов функционально связанных белков. Они осуществляют сложные, комплексные реакции клеток: изменение функциональной активности, переключение метаболизма, деление, апоптоз и т.д. Физиологические функции таких регуляторных белков опосреду-

ются тем набором белков, который они модифицируют.

Мы рассмотрим белки, функции которых не опосредуются другими белками. Они непосредственно трансформируют субстраты или осуществляют молекулярное узнавание при сборке надмолекулярных комплексов. Их функции переключаются при изменении условий.

MOONLIGHTING PROTEINS

В последние годы привлекают внимание moonlighting proteins (MLP, от термина moonlighting — работа по совместительству). MLP — подгруппа многофункциональных белков, у которых одна полипептидная цепь, кодируемая одним геном, может образовывать разные пространственные структуры и в разных условиях выполнять две и более биохимических или биофизических функций. У них каждая функция регулируется независимо от других, а инактивация одной не влияет на другие [13–18]. Функционально MLP — комбинация доменов типа «фермент» и/или участков распознавания типа «платформа» (рис. 1).

Таких MLP уже найдено несколько сотен на всех ступенях эволюционного дерева от бактерий до высших организмов, причем многие из них весьма консервативны [11, 12]. Функции MLP разнообразны. Часто это избыточные белки домашнего хозяйства, экспрессирующиеся в клетках в больших количествах, как, например, некоторые компоненты гликолиза, цикла Кребса, шапероны, белки рибосом, факторы транскрипции, компоненты цитоскелета, рецепторы клеточной поверхности, белки клеточной адгезии и т.д. [13–17]. Так, семь из десяти белков гликолиза, семь из восьми белков цикла Кребса, ряд белков рибосом (gpS3, gpL10A, gpL13a и др.) — это MLP. Информация о более 350 MLP представлена в базах данных MultitaskProtDB-II, MoonProt и MoonDB v2.0 (табл. 1) [11, 12]. Примеры разных MLP приведены в табл. 2. Рассмотрим некоторые из них.

Рибосомный белок gpS3. Более десятка рибосомных белков, участвуют также в других белковых комплексах в клеточном ядре и задействованы в репарации ДНК и регуляции транскрипции.

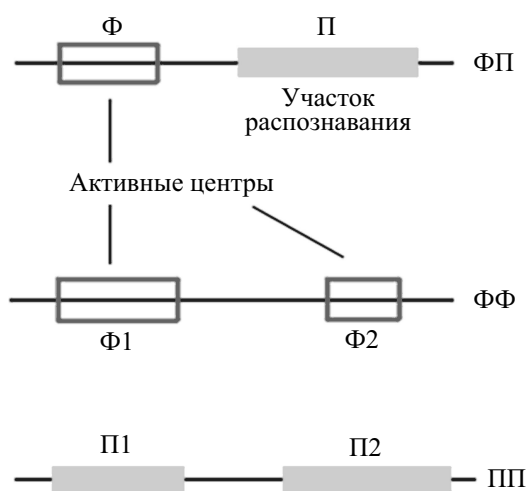


Рис. 1. Комбинации доменов типа фермент (Ф) и/или участков распознавания типа платформа (П) в MLP-белках: (а) — белок типа «фермент»-«платформа», (б) — белок типа «фермент»-«фермент», (в) — белок типа «платформа»-«платформа».

Таблица 2. Некоторые примеры MLP-белков

Белок	Функция 1	Функции 2 +	Тип
ε-Кристаллин	Структурный компонент хрусталика	Лактатдегидрогеназа (гликолиз)	ПФ
τ-Кристаллин	Структурный компонент хрусталика	Энолаза (гликолиз)	ПФ
Лактатдегидрогеназа	Гликолиз	ssDNA-связывающийся белок	ФП
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Гликолиз	15–20 разных функций, в т.ч. трансферриновый рецептор, опосредующий поглощение Fe, тимидингидроксилаза, контроль везикулярного транспорта, экспорт тРНК из ядра, ssDNA-связывающийся белок и др. У бактерий – адгезин, токсин, инвазин	ФФ, ФП
Аконитаза	Цикл Кребса (цитрат → изоцитрат)	Гомеостаз Fe: при недостатке Fe активирует экспрессию генов регулирующих поглощение Fe; поддерживает стабильность мтДНК	ФФ, ФП
Цитохром c	Переносчик электронов в митохондриях	В цитозоле в комплексе с Araf-1, dATP и прокаспазой 9 инициирует апоптоз	ФП
grS3	Белок малой субъединицы рибосомы	Фосфорилируется РКСδ, приобретает эндонуклеазную активность и участвует в репарации ДНК; связываясь с NF-κB, участвует в регуляции экспрессии генов	ПФ, ПП
STAT3	Фактор транскрипции	Активатор электронного транспорта в митохондриях	ПП
β-Катенин	Клеточная адгезия	Фактор транскрипции	ПП
p53	Фактор транскрипции	Регулирует клеточный цикл и репарацию ДНК; в митохондриях стимулирует апоптоз	ПП

Примечание. Типы MLP-белков: ПФ – «платформа»–«фермент», ФП – «фермент»–«платформа», ФФ – «фермент»–«фермент», ПП – «платформа»–«платформа».

Так, белок grS3, входящий в состав малой субъединицы рибосомы 40S, может выполнять ряд дополнительных функций [19–21]. После синтеза в цитоплазме он с помощью импортина-α переносится в ядро. Большая его часть идет на синтез малой субъединицы рибосомы, но некоторое количество участвует в реализации транскрипционной функции фактора NF-κB. Белок grS3 усиливает аффинность к промоторам субъединицы p65 белка NF-κB, которая связывается с доменом КН (рис. 2) и направляет NF-κB к контролируемым им генам. С-концевой домен grS3 (рис. 2) участвует в репарации ДНК [21]. Разные функции grS3 обусловлены фосфорилированием ряда аминокислот и связыванием различных белков с его доменами. После фосфорилирования серина 209 и треонинов 42 и 221 протеинкиназами ИККβ, ERK и РКСδ соответственно (рис. 2) grS3 участвует в распознавании повреждений ДНК и, благодаря эндонуклеазной активности, вносит вклад в эксцизионную репарацию. При избытке grS3 его до-

мен КН может связывать p53 и стимулировать апоптоз. Сверхэкспрессия grS3 приводит к конденсации ДНК, деградации белков PARG и ламин A/C, а также к экспрессии проапоптотических каспаз 3, 8 и 9 [21]. Также grS3 может связываться с бактериальными белками NleH1 и NleH2, регулируя ответ клетки на микробный патогенез [29]. Белок grS3 проявляет MLP-функции скорее по типу «платформа»–«платформа» или «платформа»–«платформа»–«платформа», чем по типу «фермент»–«платформа».

Другие рибосомные белки также проявляют MLP-свойства. Так, при рибосомном стрессе, когда в клетке нарушен синтез рибосом, белки рибосом grL5, grL11 и другие подавляют активность убиквитинлигазы MDM2, которая инициирует протеасомную деградацию белка p53. Это приводит к стабилизации и активации p53 и стимуляции апоптоза. В последнее время такое свойство обнаружено уже у четырнадцати рибосомных белков. Предполагается, что это связано с выра-

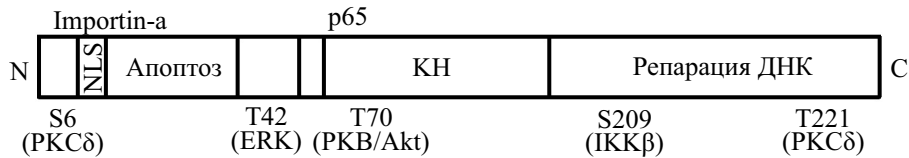
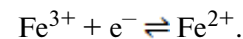


Рис. 2. Структурная схема и места посттрансляционных модификаций рибосомного белка рpS3. Указаны сайты фосфорилирования серина S6 и треонина T221 протеинкиназой PKCδ, серина S209 – киназой IKKβ, треонина T42 – киназой ERK и треонина T70 – киназами PKB/Akt.

ботавшейся в ходе эволюции реакции организмов на нестабильность генома. В эукариотических клетках гены, кодирующие различные рибосомные белки, разбросаны по разным хромосомам. Но в рибосомы эти белки должны поступать в одинаковом количестве. При геномной нестабильности возможен дисбаланс, нарушающий сборку функционирующих рибосом. Таким образом, влияя на способность белков MDM2 и p53 регулировать апоптоз, организм избавляется от клеток с нестабильностью генома [22].

Цитохром с. Цитохром с – древний белок, распространенный на всех уровнях эволюционного дерева от микроорганизмов до эукариот. Он играет важнейшую роль в биоэнергетике клетки. В

митохондриях он переносит электроны, а после перемещения в цитозоль стимулирует апоптоз [23, 24]. В эукариотических клетках после синтеза в цитозоле апоцитохром с переносится в межмембранное пространство митохондрий. Там два его цистеиновых остатка связывают гем, создавая цитохром с, который диффундирует по поверхности внутренней митохондриальной мембраны и переносит электроны от цитохрома c_1 комплекса III к цитохромоксидазе в комплексе IV благодаря окислительно-восстановительным превращениям гемового железа:



Митохондриальный цитохром с имеет консервативную трехмерную структуру. Его простота, стабильность и доступность позволила тщательно изучить на атомном уровне процессы электронного транспорта с его участием. Но его moonlighting-свойства и структурные перестройки в разных ситуациях пока изучены не так детально. Цитохром с имеет сравнительно гибкую структуру, легко перестраивающуюся при разных молекулярных взаимодействиях и изменении локализации. Выявлен ряд структурных модификаций цитохрома с в разных условиях. Он также может подвергаться разным посттрансляционным модификациям: фосфорилированию, нитрозилированию, и др. Показано, что кроме нативной конформации цитохром с может переходить в альтернативную, частично развернутую форму, в которой он не переносит электроны, а вовлекается в moonlighting-функции [23].

Если цитохром с выходит из митохондрий в цитозоль через разрывы или мегаканалы в наружной митохондриальной мембране, образованные белками Bax и Bak, он инициирует образование апоптосомы – мультибелкового комплекса, стимулирующего апоптоз [23–25]. За счет электростатических взаимодействий он связывается с двумя «пропеллерными» доменами цитозольного мономерного белка Araf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1). Это приводит к изменению конформации Araf-1, ведущему к замене связанного ADP на dATP, и образуется апоптосома – стабильный гептамерный комплекс из семи субъединиц «Araf-1–dATP–цитохром с» (рис. 3) [23–26]. Апоптосома отщепляет от прокаспазы 9 ин-

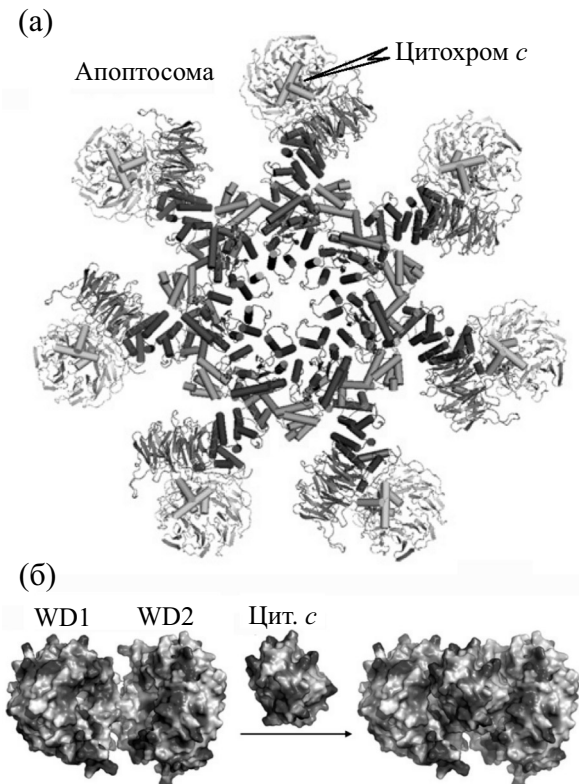


Рис. 3. Структура апоптосомы, образованной семью белками Araf-1 со встроенными цитохромами с (а). Комплементарное связывание цитохрома с доменами WD1 и WD2 белка Araf-1 (согласно работе [24]).

гибиторный фрагмент. Получившаяся каспаза 9 активирует каспазу 3, запускающую дальнейшие апоптотические процессы. Интересно, что такая структура апоптосомы – позднее эволюционное приобретение. У нематоды *C. elegans* апоптосомы состоят из четырех белков CED-4, гомологов Araf-1, а у дрозофилы – из восьми белков Dronc. Эти апоптосомы не содержат цитохрома *c*, который присутствует только в апоптосомах позвоночных животных [25, 27]. Недавно показано, что при повреждении ДНК цитохром *c* может транслоцироваться в ядро, где он препятствует сборке нуклеосом, что снижает выживаемость клеток. Правда, молекулярные механизмы этой транслокации и структурные превращения цитохрома *c* пока не выяснены [23].

Таким образом, цитохром *c* представляет собой MLP типа «фермент»–«платформа».

Бифункциональные белки. У бифункциональных белков, кодируемых одним геном, обычно имеются два активных центра в разделенных полипептидной цепью доменах, которые выполняют разные функции. Это MLP типа «фермент»–«фермент». Часто они катализируют последовательные реакции одного метаболического пути с переносом между ними субстрата или интермедиата (substrate channeling) для того, чтобы сократить его путь, предотвратить взаимодействие с внешними метаболитами и утечку в среду. При этом каталитический акт в центре А стимулирует перенос интермедиата и вызывает открывание «ворот» для интермедиата в центре Б и/или его активацию. Линкер, соединяющий домены, играет важную роль в стабилизации конформации одного из доменов и передаче сигнала об активации одного домена к другому [28–32]. В механизме «ворот» часто участвуют ароматические аминокислоты, благодаря их способности к ротации. Их небольшой поворот может вызвать существенное перемещение боковых цепей и конформационный переход, увеличивающий ширину «ворот» [29, 30].

Примером такого бифункционального белка является триптофансинтаза. В ней домен α расщепляет индол-3-глицеролфосфат на индол и D-глицеральдегид-3-фосфат. После конформационного перехода и перемещения индола по 25-ангстремному туннелю домен β катализирует соединение индола и серина в триптофан. В середине туннеля, в домене β , стенки туннеля содержат Tyr279 и Phe280. Повороты их ароматических колец обуславливают динамическое равновесие между альтернативными конформациями, открывающими или закрывающими туннель. Связывание субстрата с α -субъединицей приводит к закрыванию туннеля, а после расщепления субстрата равновесие между открытой и закрытой

формами восстанавливается, и индол передается в β -субъединицу [29].

Еще один бифункциональный фермент – глюкозамин-6-фосфатсинтаза. В ее N-доме (*i*) из глутамина высвобождается NH_3 , и это вызывает конформационный переход с открыванием 18-ангстремного туннеля, по которому NH_3 переносится в C-домен (*ii*) на фруктозо-6-фосфат, в результате чего синтезируется глюкозамин-6-фосфат [29].

Метаморфные белки. Так называемые метаморфные белки в физиологических условиях могут обратимо переключаться между фиксированными конформациями. Это возможно, если потенциальный барьер для перехода не очень большой и глубина потенциальных ям не сильно различается, в отличие от необратимого перехода в более глубокую потенциальную яму, ловушку, характерную для стабильной конформации неправильно свернутого белка (misfolding trap). Между этими формами устанавливается динамическое равновесие. Структурные переходы облегчаются наличием гибкого участка в середине полипептидной цепи.

Хорошо изученный пример метаморфного белка – сверочный белок Mad2, который контролирует правильность сборки митотического веретена и инициирует остановку митоза [33]. В отсутствие лигандов неактивная открытая (O-Mad2) и активная закрытая (C-Mad2) конформации этого белка находятся в динамическом равновесии. Центральное ядро Mad2 сохраняет свою структуру, а фрагменты на C- и N-концах подвергаются значительной структурной перестройке. Переход между открытой и закрытой конформациями обеспечивает правильное прикрепление микротрубочек к кинетохорам, что необходимо для точного расхождения хромосом во время митоза [33].

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Паразитный пример MLP – гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Этот многофункциональный белок называют «квинтэссенцией MLP». Кроме гликолиза, он участвует в выполнении до двадцати разных функций. Многообразие его функций определяется олигомеризацией, межмолекулярными взаимодействиями, различным микроокружением в разных клеточных компартментах и посттрансляционными модификациями [34–40]. Так, на клеточной поверхности GAPDH образует комплекс с трансферриновым рецептором, который опосредует поглощение железа клетками [38]. Связывание GAPDH с клеточной мембраной способствует слиянию мембран и эндоцитозу. Цитоплазматическая GAPDH участвует в пузырьковом транспорте от эндоплазматического ретикулума к цистернам комплекса Гольджи. Она

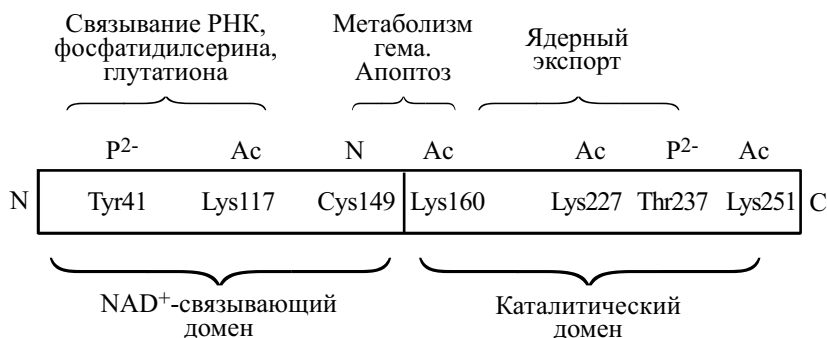


Рис. 4. Структура, функции и пост-трансляционные модификации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Обозначены аминокислоты, подвергающиеся фосфорилированию (P^{2-}), ацетилованию (Ac) и нитрозилованию (N).

также регулирует стабильность мРНК. В ядре GAPDH участвует в поддержании целостности ДНК, регуляции экспрессии генов, экспорте тРНК из ядра, а также в регуляции апоптоза [34–37]. Это позволяет рассматривать GAPDH как центральный регулятор клеточного метаболизма и информационный центр [34–36, 39, 40].

GAPDH – вездесущий и изобильный белок, высококонсервативный на протяжении всей эволюционной лестницы. В соматических клетках он кодируется единственным геном; альтернативных транскриптов не обнаружено. GAPDH состоит из 335 аминокислот и имеет массу 37 кДа. Его кофакмент – NAD^+ . В структуре GAPDH выделяют NAD^+ -связывающий домен из 150 аминокислот и каталитический домен (аминокислоты 151–335) (рис. 4). NAD^+ -связывающий домен участвует в стабилизации мРНК и регуляции трансляции. Мембранные функции GAPDH основаны на связывании фосфатидилсерина в пределах NAD^+ -связывающего домена на внутренней стороне клеточной мембраны (аминокислоты 70–94). Связанная с мембраной GAPDH катализирует слияние мембран, а также регулирует поглощение, транспорт и метаболизм Fe^{2+} . GAPDH также связывает глутатион (аминокислоты 67–77). Каталитический домен участвует в экспорте тРНК из ядра (аминокислоты 258–270) [37, 38, 41].

Экспрессия GAPDH в клетках динамична и чувствительна к условиям внутри клетки – уровню Ca^{2+} , гипоксии, концентрации железа, стадии клеточного цикла и т.д. [37]. Функциональная активность GAPDH существенно регулируется. Имеется много данных о роли посттрансляционных модификаций, таких как ацетилирование лизинов 117, 160, 227 и 251, фосфорилирование треонина 237 и тирозина 41, нитрозилование цистеина 149 и др. (рис. 4) в множественности функций GAPDH. Например, цистеин 149 весьма чувствителен к окислению, что делает GAPDH одним из

редокс-сенсоров в клетке и регуляторов клеточного гомеостаза [39, 40]. Его окисление повышает способность GAPDH связываться с тРНК и ДНК [41], а нитрозилование оксидом азота регулирует метаболизм гема, клеточный ответ на окислительный стресс и апоптоз [38]. Ацетилирование лизина 160 влияет на экспрессию ряда генов, кодирующих проапоптотические белки p53, pUMA и Вах. Фосфорилирование GAPDH влияет на везикулярный транспорт, синаптическую передачу [34, 35]. Однако точные биофизические и биохимические механизмы такого разнообразия функций пока выяснены не полностью.

В настоящее время проведены более ста исследований трехмерной структуры GAPDH из разных организмов от микробов до человека, как отдельно, так и вместе с разными субстратами, интермедиатами, продуктами, ингибиторами и т.д. GAPDH обычно присутствует как гомотетрамер или, точнее, как димер из двух димеров, состоящий из четырех одинаковых субъединиц [37]. В трехмерной структуре тетрамера GAPDH выделяются две поперечные бороздки длиной 70 Å, которые охватывают участки связывания субстрата и кофактора NAD^+ . Предполагается, что эти области могут связывать нуклеиновые кислоты, так как в них находится много положительно заряженных остатков лизина и аргинина. Узкий центральный канал (4×10 Å) хорошо связывает небольшие молекулы. Несмотря на обилие структурных данных, еще многое необходимо выяснить для понимания биофизических и биохимических механизмов реакций, опосредованных GAPDH. В гликолизе GAPDH фосфорилирует D-глицеральдегид-3-фосфат и переводит его в 1,3-бисфосфоглицерат (BPG). Предполагается, что это происходит в два этапа. Сначала осуществляется нуклеофильная атака на D-глицеральдегид-3-фосфат цистеином C152 GAPDH с переносом гидрида на NAD^+ . При этом H179 является основным катализатором. Затем происходит нуклеофильная атака неорганического

фосфата на карбонильную группу тиоэфира с последующим ее фосфорилированием [37]. Механизмы других moonlighting-функций GAPDH еще предстоит выяснить. Пока неизвестно, как осуществляется переключение функций и изменение локализации GAPDH в клетках. Например, она не содержит сигнала ядерной локализации NSL, но обнаруживается в ядре. Оказалось, что протеинкиназа AMPK, фосфорилируя серин 122, индуцирует переход GAPDH в ядро, а фосфорилирование треонина 237 протеинкиназой Akt предотвращает это перемещение. Но механизмы этих процессов пока неясны [37].

ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Факторы транскрипции управляют целым комплексом клеточных реакций, инициируя экспрессию множества белков, выполняющих или регулирующих данную функцию. Среди них выделяются несколько мастер-регуляторов, которые, в отличие от сравнительно узконаправленных факторов транскрипции, как например Nrf-2, регулирующий экспрессию группы антиоксидатных генов, обладают невероятно широким спектром действия. К ним относятся такие белки, как c-Myc и p53, которые регулируют экспрессию до 10–15% всех генов [42, 43]. Но кроме регуляции экспрессии генов многие факторы транскрипции могут выполнять и другие функции, являясь moonlighting-белками. Рассмотрим несколько важных примеров.

Белок STAT3. Белок STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) играет ключевую роль в клеточном росте и выживании. Это фактор транскрипции, но перемещаясь в митохондрии, он регулирует окислительное фосфорилирование [44, 45]. Связывание интерлейкинов 6 или 10 с рецептором цитокинов на поверхности клетки активирует цитоплазматическую киназу JAK, которая фосфорилирует тирозин в STAT3. Это инициирует димеризацию STAT3 и перемещение его в клеточное ядро, где он как фактор транскрипции контролирует экспрессию ряда генов [45]. Если же под влиянием внутриклеточных сигнальных путей цитоплазматические протеинкиназы фосфорилируют сериновые остатки в STAT3, то он перемещается в митохондрии, где активирует перенос электронов от комплексов I и II на комплекс III, что повышает интенсивность окислительного фосфорилирования (рис. 5б). Так, с помощью STAT3 различные сигнальные пути могут регулировать биоэнергетические процессы в митохондриях [44].

Известны две изоформы STAT3 α и STAT3 β с молекулярной массой 770 и 705 Да соответственно. Основные домены в STAT3 α (рис. 5а): N-концевой домен NTD (аминокислоты 1–137), участ-

вующий в димеризации и даже тетрамеризации STAT3, которая усиливает его транскрипционную активность; суперспиральный домен CDD (аминокислоты 138–320), связывающийся с различными регуляторными белками; домен DBD (DNA-binding domain), связывающийся со специфическими участками ДНК (аминокислоты 321–493); линкерный домен LD (аминокислоты 494–582); SH2 домен (аминокислоты 583–687), связывающийся STAT3 с фосфорилированными рецепторами. Фосфорилирование тирозина в STAT3 киназами JAK и Src приводит к его димеризации и переносу в ядро. С-концевой транскрипционный домен TAD (transactivation domain, аминокислоты 688–770; у STAT3 β укорочен до 705-й аминокислоты). Он внутренне неупорядочен и по-разному сворачивается при взаимодействии с разными партнерами при формировании транскрипционных комплексов [45, 46]. При взаимодействии с ДНК белок STAT3 димеризуется так, что домены DBD охватывают ДНК. Также эти домены могут связываться с импортином или экспортином для импорта STAT3 в ядро или экспорта его в цитоплазму. Таким образом, STAT3 – moonlighting-белок типа «платформа»–«платформа».

β -Катенин. β -Катенин – высококонсервативный белок из 781 аминокислот – имеет интересную структуру [47–49]. Его центральная область содержит несколько повторов из примерно 40 аминокислот (например, у человека – двенадцать повторов), которые образуют жесткий удлиненный домен ARM (от слова armadillo – броненосец). Из-за сложной формы отдельных повторов домен ARM имеет небольшую кривизну (рис. 6). Его внутренняя поверхность может связывать различные белки и нуклеиновые кислоты. N-концевой и C-концевой фрагменты β -катенина внутренне неупорядочены. В растворе они не имеют определенной структуры. Но они играют решающую роль в связывании β -катенина с другими белками и ДНК. N-концевой фрагмент содержит консервативный короткий линейный мотив (SLiM – short linear motif), который после фосфорилирования связывается с убиквитинлигазой β -TrCP, стимулирующей его протеасомную деградацию. С-концевая область при взаимодействии с ДНК является сильным активатором транскрипции. Этот сегмент не полностью неупорядочен: его участок на С-конце образует стабильную спираль (HelixC), которая располагается вблизи домена ARM. Хотя эта спираль не необходима для участия β -катенина в клеточной адгезии, она важна для регуляции транскрипции [48, 49].

После синтеза β -катенин встраивается в плазматическую мембрану, где вместе с винкулином, α -катенином и катенином p120 образует платформу для связывания цитоплазматического

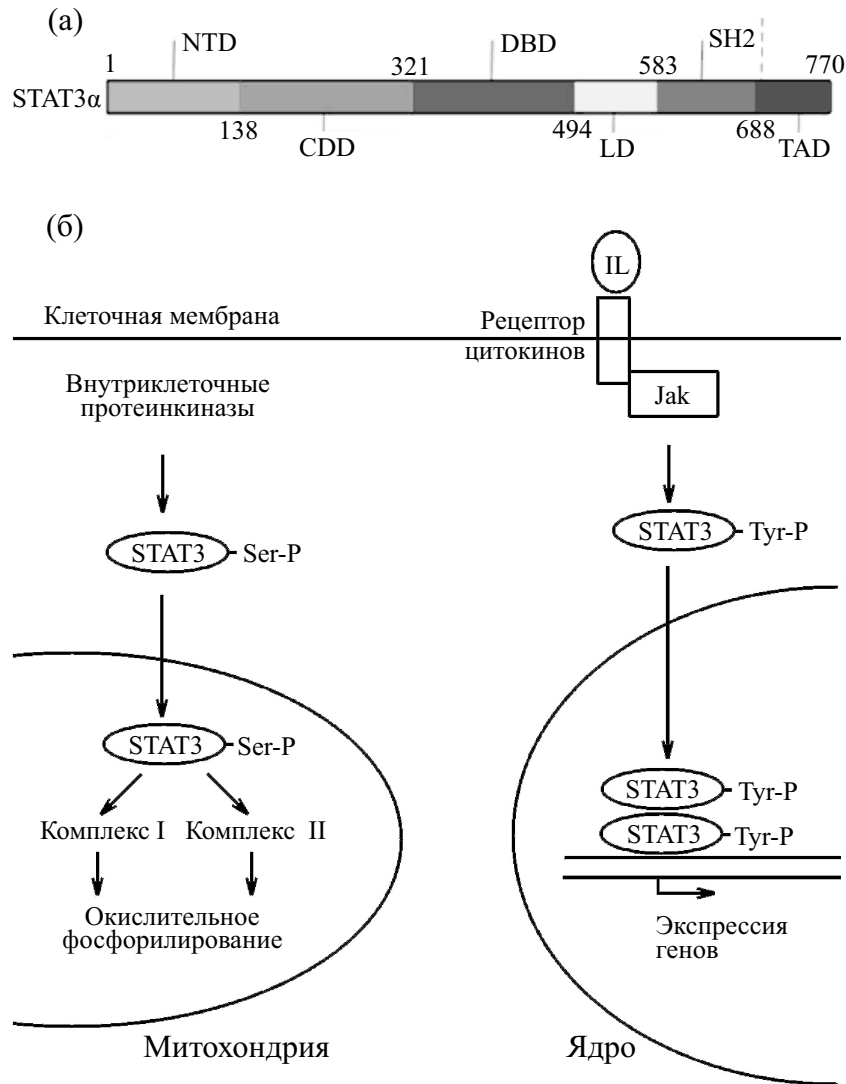


Рис. 5. Структура и функции STAT3. (а) – Схема основных структурных доменов STAT3: NTD – N-концевой домен, CDD – суперспиральный домен, DBD – ДНК-связывающий домен, LD – линкерный домен, SH2 – SH2-домен, TAD – трансаKTиваторный домен. (б) – Альтернативные функции STAT3. При активации интерлейкинами цитокенинового рецептора на клеточной мембране белок JAK фосфорилирует тирозин в STAT3. Это вызывает димеризацию STAT3, транслокацию в ядро и стимуляцию экспрессии генов. Если цитоплазматические протеинкиназы фосфорилируют серин в STAT3, то он транслоцируется в митохондрии, где активирует транспорт электронов от комплексов I и II на комплекс III, повышая скорость окислительного фосфорилирования.

фрагмента кадгерина, участвующего в межклеточной адгезии, с внутриклеточным актиновым цитоскелетом. Свободный β -катенин в цитоплазме практически отсутствует. Он связывается с мультиферментным комплексом белков APC, axin1, GSK3 и CK1, в котором протеинкиназы GSK3 и CK1 фосфорилируют его, после чего β -катенин убиквитинируется лигазой β -TrCP и деградирует. Но под влиянием внеклеточного сигнала Wnt, APC-комплекс распадается, и в цитоплазме появляется свободный β -катенин. Он транслоцируется в ядро, где как фактор транскрипции регулирует экспрессию различных генов, которые кодируют компоненты сигнального

пути Wnt, белки c-Myc, COX и т.п. [47]. Таким образом, β -катенин – MLP типа «платформа»–«платформа».

Белок p53. Белок p53 исключительно важен и интересен. Он экспрессируется во всех клетках организма и регулирует основные клеточные функции, включая метаболизм, клеточный цикл, репарацию ДНК, выживаемость и апоптоз [50–52]. В качестве фактора транскрипции он регулирует экспрессию сотен генов [43, 53]. В клетках с нерепарируемыми повреждениями ДНК p53 стимулирует апоптоз [54–57]. Это позволяет устранять злокачественные клетки и защищать орга-

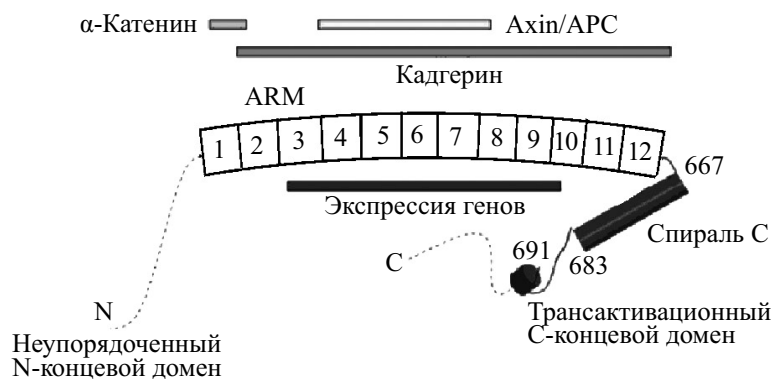


Рис. 6. Структура β-катенина человека с двенадцатью повторами (ARM-домен), внутренне неупорядоченными N-доменом и трансактивационным C-доменом.

низм от раковых опухолей. Поэтому его называют супрессором опухолей и стражем генома. Мутации гена *TP53*, инактивирующие p53, найдены в половине случаев рака человека. Однако p53 не только регулирует экспрессию генов, но также, независимо от транскрипции, регулирует митохондриальные функции и индуцирует апоптоз в клетках с митохондриальной недостаточностью [58–60]. Этот древний консервативный белок найден у организмов на ранних эволюционных стадиях у простейших и губок, намного раньше, чем возникли раковые опухоли. Поэтому предполагается, что истинная роль белков семейства p53 заключается в поддержании целостности генома при неблагоприятных воздействиях на организм [61, 62].

Обычно уровень белка p53 в цитоплазме поддерживается на низком уровне. После синтеза в цитоплазме он транспортируется в ядро, где связывается с ДНК. Несвязанный p53 образует комплекс с MDM2, который моноубиквитинирует его и транспортирует обратно в цитоплазму, где он дополнительно убиквитинируется и быстро деградирует в протеасомах [63]. При активации онкогенов, радиационном повреждении ДНК или окислительном стрессе p53 фосфорилируется протеинкиназами JNK, p38, ERK и т.п. [57], что предотвращает его взаимодействие с MDM2, препятствует деградации и значительно повышает его уровень в ядре [51, 62, 64, 65]. Белок p53 тетрамеризуется, связывается с ДНК и стимулирует

транскрипцию целой группы генов, содержащих в регуляторной области специальную нуклеотидную последовательность p53RE (p53-response element). Уже известно более 600 таких p53RE [53]. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК, репарация повреждений ДНК, а при сильном стрессовом сигнале – запуск апоптоза [57, 58, 64]. Белок p53 также обнаруживается в клеточных ядрышках, являющихся «фабриками рибосом». Нарушение синтеза рибосом в ядрышке повышает уровень p53, что передает сигнал о повреждении клетки в системы, контролирующие клеточный метаболизм, гомеостаз и выживание [66, 67].

Белок p53 состоит из одной полипептидной цепи из 393 аминокислот. В клетках он образует тетрамер из двух одинаковых димеров. Как у многих факторов транскрипции, в первичной структуре p53 можно выделить ряд функциональных модулей (рис. 7). На N-конце располагается трансактивационный домен TAD (transactivation domain), подразделяющийся на два субдомена TAD1 и TAD2 (аминокислоты 1–43 и 44–63). За ними следует богатый пролином участок PRR (proline-rich region, аминокислоты 64–92), ДНК-связывающий домен DBD (аминокислоты 102–292), который распознает p53RE и связывается с ним, сигнал ядерной локализации NLS (nuclear localization sequence); домен TET (tetramerization domain, аминокислоты 320–355), ответственный за тетрамеризацию p53, и C-концевой домен (аминокислоты 356–393). Домены DBD и TET

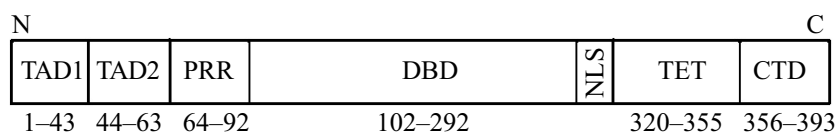


Рис. 7. Схема основных структурных доменов p53: TAD1 и TAD2 – внутренне неупорядоченные трансактиваторные домены, PRR – богатый пролином домен, DBD – ДНК-связывающий домен, NLS – сигнал ядерной локализации, TET – домен, ответственный за тетрамеризацию, CTD – внутренне неупорядоченный C-концевой домен.

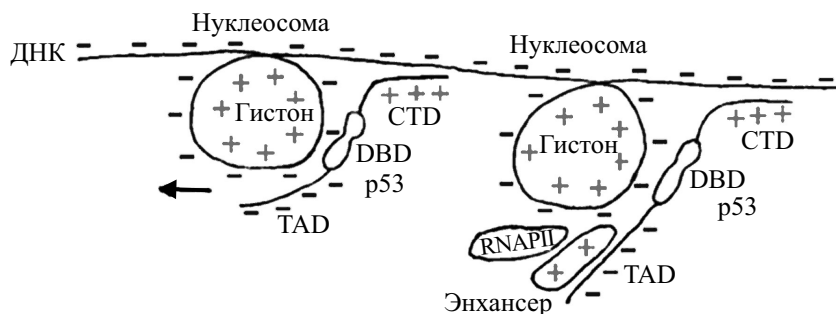


Рис. 8. Предполагаемое взаимодействие p53 с нуклеосомой: «качение» нуклеосомы и взаимодействие с положительно заряженными доменами белков, связывающихся с ДНК.

высококонсервативны, тогда как внутренне неупорядоченные домены TAD и С-концевой домен более изменчивы, что позволяет белку p53 гибко взаимодействовать со многими партнерами [53, 68–71].

Домены DBD в тетрамерах p53 при взаимодействии с p53RE сгибают ДНК, причем по-разному в участках с разными последовательностями нуклеотидов [72]. При этом ДНК частично расплетается, что облегчает связывание белков.

Домен TAD (TAD1+TAD2) из 63 аминокислот несет значительный отрицательный заряд благодаря 17 остаткам глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Он внутренне неупорядочен. Его конформация определяется взаимодействием с ДНК или другими белками. Известно, что p53 человека может взаимодействовать более, чем с 1000 различных белков, включая коактиваторы, энхансеры и другие регуляторы транскрипции, а также белки, осуществляющие посттрансляционные модификации – протеинкиназы, ацетилтрансферазы и т.п. [73].

С-концевой домен из 29 аминокислот также внутренне неупорядочен. В отличие от отрицательного TAD, он содержит семь положительно заряженных аминокислотных остатков (шесть остатков лизина и один – аргинина). Это позволяет ему неспецифически взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатами ДНК независимо от ее формы – с изогнутыми участками, сверхспиральными, намотанными на нуклеосомы и т.п. [69]. С-концевой домен играет важную роль в активации, клеточной локализации и деградации p53 [62]. Предполагается, что благодаря сравнительно непрочному и неспецифическому электростатическому связыванию положительно заряженного С-концевого домена с отрицательно заряженной ДНК, p53 может скользить вдоль молекулы ДНК в поисках нужного сайта, где домены DBD, также несущие положительные заряды, более прочно и специфично связываются с p53RE [74]. Это облегчает проблему навигации фактора транскрипции, заменяя трехмерную диффузию

одномерной [68, 75–77]. (Источник энергии и механизм выбора направления движения p53 и других белков по ДНК неизвестны. При диффузии направление движения определяется градиентом концентрации, который отсутствует в случае отдельных молекул). Еще одна проблема: неясно, как белки, перемещающиеся по хромосоме (РНК-полимеразы, факторы транскрипции, репарационные комплексы), преодолевают нуклеосомы, на которые намотана ДНК. Можно предположить, что тогда как положительно заряженный С-концевой домен стабилизирует p53 на ДНК, отрицательно заряженный TAD за счет электростатического отталкивания может сдвигать нуклеосому, несущую на поверхности отрицательно заряженную ДНК. Это будет вызывать «качение» нуклеосомы по ДНК и освобождение участков для транскрипции или репарации. Известно, что p53 часто связывается с p53RE, расположенными на нуклеосомах, вероятно из-за того, что сгибание ДНК на нуклеосоме повышает сродство к p53 [53, 78, 79]. При этом между отрицательно заряженными ДНК и TAD могут встраиваться положительно заряженные участки взаимодействующих с ДНК белков, таких как РНК полимеразы, белки репарационных комплексов, коактиваторы или энхансеры транскрипции (рис. 8).

Способность некоторых факторов транскрипции, таких как p53 или с-Мус, неспецифически регулировать экспрессию многих сотен генов кажется загадочной. Предполагается, что регуляция множества генов может быть обусловлена не только специфическим связыванием p53 с p53RE в промоторах определенных генов, но и его связыванием с рядом сильных энхансеров, что повышает его общую транскрипционную активность [53]. Тем не менее активация экспрессии разных групп генов факторами транскрипции в определенной степени специфична [80]. Каковы структурные основы специфического связывания p53 с теми или иными p53RE? Еще вопрос: каким образом p53 по-разному реагирует на различные

стимулы? Возможно, это обеспечивается внутренне неупорядоченными участками (IDR, intrinsically disordered regions), которые могут взаимодействовать с разнообразными белками. Наличие IDR очень характерно для разных факторов транскрипции [81]. У p53 таким участком является TAD, способный взаимодействовать со множеством белков, что обеспечивает его чувствительность к разным стимулам и способность активировать экспрессию различных генов [53]. Благодаря жесткому линкерному пролиновому участку PRR, TAD высвобождается наружу из центрального комплекса DBD/ДНК и таким образом может взаимодействовать с разнообразными коактиваторными и энхансерными белками [70]. Сродство к разным партнерам p53 регулируется посттрансляционными модификациями, особенно фосфорилированием и ацетилированием TAD [70]. Также предполагается, что разная экспрессия p53-регулируемых групп генов, которые контролируют разные клеточные процессы, обусловлена локальными различиями в структуре хроматина: топологией ДНК, расположением p53RE, метилированием ДНК в промоторах, сближением далеких энхансеров, доступностью промоторов генов для RNAII и т.п. [53]. В частности, селективность действия p53 может быть связана со способностью по-разному изгибать ДНК в местах с разными последовательностями нуклеотидов [72, 74].

Разные посттрансляционные модификации регулируют активность p53, у которого 36 аминокислот могут подвергаться фосфорилированию, метилированию, ацетилированию, гликозилированию и т.д. [82]. Как отмечалось выше, фосфорилирование серинов 18 и 20 в TAD препятствует связыванию MDM2, ведущему к деградации p53 [57]. Ацетилирование различных лизинов дифференциально усиливает транскрипционную активность p53, приводя к экспрессии разных групп генов и разным клеточным ответам. Так, неацетилированный белок p53 стимулирует экспрессию MDM2 и других белков, препятствующих его чрезмерной активации. При повреждении ДНК p53 ацетилируется ацетилтрансферазой СВР/p300 и вместе с белками Tip 60 и MOF стимулирует экспрессию белков p21 и GADD45, вызывающих остановку клеточного цикла и индуцирующих репарацию ДНК [82]. При сильных, нерепарируемых повреждениях ДНК, вызванных такими вредными факторами, как гипоксия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, ионизирующее излучение или нарушение функции ядрышка, увеличивается экспрессия p53. При этом ацетилируются почти все лизиновые остатки, и p53 начинает стимулировать экспрессию генов, кодирующих апоптотические белки: каспазы 6, Araf-1, Htra2, Bax, Bid, NOXA, PUMA, Fas, DR4, DR5 и т.п. Это приводит к апоптотиче-

ской смерти клеток [64–67]. Но p53 может индуцировать апоптоз не только транскрипционным путем, но и независимо от транскрипции. Цитоплазматический p53 непосредственно связывается с наружной митохондриальной мембраной, ингибирует антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-XL, активировывает проапоптотические белки Bax и Bid и стимулирует Bax/Bak-опосредованное формирование мегапор в наружной митохондриальной мембране, через которые цитохром c, SMAC/Diablo, AIF и другие проапоптотические белки выходят в цитозоль и вызывают апоптоз [54, 58–60].

Таким образом, p53 – многофункциональный moonlighting-белок, который действует как фактор транскрипции, функции которого опосредованы экспрессией множества белков, и как проапоптотический агент, непосредственно влияющий на митохондрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многофункциональность белков – не единичное явление. Она характерна для сотен белков, и это существенно расширяет функциональное разнообразие, которое, казалось бы, ограничено малым числом генов. Почему и как появились moonlighting и более сложные многофункциональные белки – волнующий вопрос, на который, как и на другие эволюционные проблемы, пока нет ответа. Согласно одному из предположений, «безразличные» мутации, затрагивающие поверхностные участки белков, которые не критичны для выполнения их канонической функции, могут приводить к появлению новых функций. Имеется немало примеров, когда точечные мутации, затрагивающие одну-две аминокислоты, могут существенно изменить свойства поверхности, изменяя тем самым участие данного белка в надмолекулярном комплексе или его клеточную локализацию. Такие мутации могут быть одним из механизмов возникновения MLP. Далее следует дупликация гена, амплификация и отбор, если эти мутации приводят к полезным свойствам [14]. Вероятность появления новых функций выше у избыточных белков, которых много в клетке, и чаще их столкновения с белками-партнерами. Возможно, именно поэтому многие белки домашнего хозяйства, такие как белки гликолиза, рибосом, молекулярных моторов и т.п., обладают moonlighting-функциями [83, 84]. Они найдены как у бактерий и дрожжей, так и у высших организмов [83–87]. Была высказана мысль о том, что широкая распространенность moonlighting белков в природе представляет собой резервуар функций для адаптации к изменяющейся среде [87].

Важным фактором этого процесса является несбалансированность синтеза и использования таких белков. Так, в случае рибосомных белков

возможно, что перепроизводство некоторых из них могло приводить к появлению в цитоплазме избыточных свободных белков, не встроившихся в рибосомы. Такие белки, как рассмотренный выше белок p53, приобрели способность использоваться для других процессов, таких как участие в репарации ДНК и регуляции экспрессии генов. Ярким и более сложным примером нарушения баланса процессов синтеза, использования и протеолиза является β -катенин: белок, не встроившийся в мембранный адгезионный комплекс, деградирует. Но приход внеклеточного сигнала Wnt на поверхностные рецепторы предотвращает деградацию β -катенина. Он переносится в ядро, где регулирует экспрессию генов. Важным регулятором изменения внутриклеточной локализации белков и, соответственно, переключения его функций являются посттрансляционные модификации. Это показано на примере белка STAT3, который после фосфорилирования тирозинов направляется в ядро, где служит фактором транскрипции, а после фосфорилирования серинов цитоплазматическими протеинкиназами перемещается в митохондрии, где активирует электрон-транспортные процессы. Таким образом, источником информации в клетке является не только зафиксированная в нуклеотидной последовательности ДНК информация о структуре белков, которая сообщает, какие белки будут синтезироваться, но и информационные сигналы, приходящие извне: изменение физико-химического состояния среды (температура, ионный и газовый состав, pH, свободные радикалы, контакты с соседними клетками и т.д.), а также сигнальные молекулы, поступающие от других клеток и запускающие внутриклеточные сигнальные каскады. Они регулируют экспрессию генов и определяют динамику и количество синтезируемых белков.

Классические представления о роли периферических аминокислотных последовательностей, не входящих в активный центр и его ближайшее окружение, в последнее время расширяются. Периферия белковой глобулы не только является комплементарной поверхностью при сборке надмолекулярных комплексов или встраивании белка в мембрану, но участвует в более широком круге межмолекулярных взаимодействий. Разработанные в последние годы компьютерные методы поиска, выявления и предсказания многофункциональных белков [88, 89] показали, что в белковых взаимодействиях, участвующих в образовании надмолекулярных комплексов и формировании сигнальных и метаболических цепочек и сетей, важную роль играют внутренне неупорядоченные участки белков (IDR). IDR широко распространены у многих сигнальных белков и факторов транскрипции [81, 90–95]. Часто они располагаются на N- или C-концах полипептидной цепи. На сегодняшний день обнаружено более

650 тысяч видов сетевых межбелковых взаимодействий [89, 95]. Вышеупомянутые факторы транскрипции STAT3, β -катенин и p53 тоже содержат IDR. Неупорядоченными могут быть и целые белки, такие как кальмодулин или шапероны. IDR более лабильны и чаще мутируют, поэтому они более изменчивы и могут играть важную роль в эволюционном происхождении MLP белков [96–98]. Как оказалось, в их взаимодействиях существенную роль играют консервативные короткие линейные последовательности (SLiM) из трех-десяти аминокислот [96–98]. Белковые взаимодействия в таких последовательностях сравнительно слабые, со сродством в микромолярном диапазоне. Поэтому они кратковременны и обратимы. Они легко модулируются посттрансляционными модификациями, которые переключают структуру и функции белка. При этом определяющую роль во взаимодействиях и изменениях конформации MLP и переключении их функций играют их белковые или нуклеиновые партнеры, находящиеся в зоне взаимодействия.

Таким образом, хотя число генов весьма ограничено, у многих белков, кодируемых одним геном, развилась способность выполнять две и больше различных функций, реализующихся в зависимости от контекста: клеточной локализации, микроокружения, образования комплексов с другими белками, посттрансляционных модификаций и т.д. Наличие многофункциональных белков порождает целый ряд вопросов: об их первичной и третичной структуре, о связи структуры с функциями, о механизмах структурно-функционального переключения, о фолдинге белков из нескольких доменов и их рефолдинге при изменении клеточной локализации, о самосборке белковых и нуклеопротеиновых комплексов, о роли MLP в системе управления клеткой, о появлении и преобразованиях MLP в процессе эволюции, и т.д.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ БАЗ 0110/20-5-14АБ).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. W. Beadle and E. L. Tatum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**, 499 (1941).
2. C. B. Anfinsen, *Fed. Proc.* **16**, 783 (1957).
3. F. Moraes and A. Góes, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **44**, 215 (2016).
4. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucl. Acids Res.* **43** (Database issue), D204 (2015).
5. S. K. Burley, H. M. Berman, G. J. Kleywegt, et al., *Methods Mol. Biol.* **1607**, 627 (2017).
6. F. E. Regnier and J. H. Kim, *Anal. Chem.* **90**, 361 (2018).
7. O. I. Kiseleva, A. V. Lisitsa, and E. V. Poverennaya, *Mol. Biol. (Moscow)* **52**, 394 (2018).
8. S. Y. Chen, C. Li, X. Jia, and S. J. Lai, *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E3834 (2019).
9. M. L. Tress, F. Abascal, and A. Valencia, *Trends Biochem. Sci.* **42**, 98 (2017).
10. K. V. Nguyen, *Biomol. Concepts* **6**, 11 (2015).
11. Multitasking Proteins DataBase (moonlighting proteins database). <http://wallace.uab.es/multitaskII>.
12. M. Mani, C. Chen, V. Amblee, et al., *Nucl. Acids Res.* **43**, D277 (2015).
13. C. J. Jeffery, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **373**, 1738 (2018).
14. C. J. Jeffery, *J. Proteomics* **134**, 19 (2016).
15. K. W. Min, S. H. Lee, and S. J. Baek, *Cancer Lett.* **370**, 108 (2016).
16. S. D. Copley, *Bioessays* **34**, 578, (2012).
17. B. Henderson and A. C. Martin, *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1671 (2014).
18. C. E. Chapple and C. Brun, *Oncotarget* **6**, 16812 (2015).
19. F. Wan, D. E. Anderson, R. A. Barnitz, et al., *Cell* **131**, 9279 (2007).
20. B. Pertschy, *Microb. Cell* **4**, 140 (2017).
21. X. Gao and P. R. Hardwidge, *Front. Microbiol.* **2**, 137 (2011).
22. T. H. Kim, P. Leslie, and Y. Zhang, *Oncotarget* **5**, 860 (2014).
23. D. Alvarez-Paggi, L. Hannibal, M. Castro, et al., *Chem. Rev.* **117**, 13382 (2017).
24. M. Zhou, Y. Li, Q. Hu, et al., *Genes Dev.* **29**, 2349 (2015).
25. L. Dorstyn, C. W. Akey, and S. Kumar, *Cell Death Differ.* **25**, 1194 (2018).
26. Y. P. Ow, D. R. Green, Z. Hao, and T. W. Mak, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 532 (2008).
27. A. Oberst, C. Bender, and D. R. Green, *Cell Death Differ.* **15**, 1139 (2008).
28. H.-X. Zhou, S. T. Wlodek, and J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9280 (1998).
29. H.-X. Zhou and J. A. McCammon, *Trends Biochem. Sci.* **35**, 179.10.007 (2010).
30. F. M. Raushel, J. B. Thoden, and H. M. Holden, *Accounts Chem. Res.* **36**, 539 (2003).
31. N. K. Nagradova, *FEBS Lett.* **487**, 327 (2001).
32. N. Nagradova, *IUBMB Life* **55**, 459 (2003).
33. S. C. Goodchild, P. M. G. Curmi, and L. J. Brown, *Biophys. Rev.* **3**, 143 (2011).
34. M. A. Sirover, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* **1810**, 741 (2011).
35. M. A. Sirover, *Cancer Metastasis Rev.* **37**, 665 (2018).
36. H. He, M. Lee, L. L. Zheng, et al., *Biosci. Rep.* **33**, e00018 (2013).
37. M. R. White and E. D. Garcin, *Subcell. Biochem.* **83**, 413 (2017).
38. V. M. Boradia, M. Raje, and C. I. Raje, *Biochem. Soc. Transact.* **42**, 1796 (2014).
39. M. Schneider, J. Knuesting, O. Birkholz, et al., *BMC Plant Biol.* **18**, 184 (2018).
40. T. Hildebrandt, J. Knuesting, C. Berndt, et al., *Biol. Chem.* **396**, 523 (2015).
41. M. A. Sirover, *J. Biochem. Cell Biol.* **57**, 20 (2014).
42. P. S. Knoepfler, *Cancer Res.* **67**, 5061 (2007).
43. M. Fisher, *Oncogenes* **36**, 3943 (2017).
44. M. G. Myers, *Science* **323**, 723 (2009).
45. A. Subramaniam, M. K. Shanmugam, E. Perumal, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1835**, 46 (2013).
46. J. Sgrignani, M. Garofalo, M. Matkovic, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E1591 (2018). DOI: 10.3390/ijms19061591
47. B. T. MacDonald, K. Tamai, and X. He, *Dev. Cell* **17**, 9 (2009).
48. Y. Xing, K. Takemaru, J. Liu, et al., *Structure* **16**, 478 (2008).
49. C. J. Gottardi and M. Peifer, *Structure* **16**, 336 (2008).
50. M. Napoli and E. R. Flores, *Br. J. Cancer* **116**, 149 (2017).
51. V. Marcel, F. Nguyen Van Long, and J. J. Diaz, *Cancers (Basel)* **10**, E152 (2018).
52. F. M. Simabuco, M. G. Morale, I. C. B. Pavan, et al., *Oncotarget* **9**, 23780 (2018).
53. K. D. Sullivan, M. D. Galbraith, Z. Andrysik, and J. M. Espinosa, *Cell Death Differ.* **25**, 133 (2018).
54. B. J. Aubrey, G. L. Kelly, A. Janic, et al., *Cell Death Differ.* **25**, 104 (2018).
55. S. Nicolai, A. Rossi, N. Di Daniele, et al., *Aging (NY)* **7**, 1050 (2015).
56. L. J. Hofseth, S. P. Hussain, and C. C. Harris, *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 177 (2004).
57. C. Culmsee and M. P. Mattson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 761 (2005).
58. C. Wan, X. Ma, S. Shi, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **281**, 294 (2014).
59. D. B. Wang, C. Kinoshita, Y. Kinoshita, and R. S. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1186 (2014).

60. Q. Dai, T. T. Luo, S. C. Luo, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **48**, 337 (2016).
61. E. Åberg, F. Saccoccia, M. Grabherr, et al., *BMC Evol. Biol.* **17**, 177 (2017).
62. A. C. Joerger and A. R. Fersht, *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 375 (2016).
63. V. Gottifredi and C. Prives, *Science* **292**, 1851 (2001).
64. P. Bonini, S. Cicconi, A. Cardinale, et al., *J. Neurosci. Res.* **75**, 83 (2004).
65. S. Rashi-Elkeles, R. Elkon, S. Shavit, et al., *Mol. Oncol.* **5**, 336 (2011).
66. R. Parlato and G. Kreiner, *J. Mol. Med. (Berl.)* **91**, 541 (2013).
67. S. J. Woods, K. M. Hannan, R. B. Pearson, and R. D. Hannan, *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms* **1849**, 821 (2015).
68. M. Kitayner, H. Rozenberg, N. Kessler, et al., *Mol. Cell.* **22**, 741 (2006).
69. E. Fadda and M. G. Nixon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 21287 (2017).
70. A. C. Joerger and A. R. Fersht, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000919 (2010). DOI: 10.1101/cshperspect.a000919.
71. A. C. Joerger and A. R. Fersht, *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 557 (2008).
72. Y. Pan and R. Nussinov, *J. Biol. Chem.* **282**, 691 (2007).
73. Y. S. Tan, Y. Mhoumad, and C. S. Verma, *J. Mol. Cell Biol.* **11**, 306 (2019).
74. Y. Pan and R. Nussino, *J. Mol. Recognit.* **23**, 232 (2010).
75. K. McKinney, M. Mattia, V. Gottifredi, and C. Prives, *Mol. Cell.* **16**, 413 (2004).
76. A. Tafvizi, F. Huang, A. R. Fersht, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 563 (2011).
77. A. Murata, Y. Itoh, E. Mano, et al., *Biophys. J.* **112**, 2301 (2017).
78. N. E. Lidor, Y. Field, Y. Lubling, et al., *Genome Res.* **20**, 1361 (2010).
79. F. Cui and V. B. Zhurkin, *Nucl. Acids Res.* **42**, 836 (2014).
80. Y. Pan, C. J. Tsai, B. Ma, and R. Nussinov, *Trends Genet.* **26**, 75 (2010).
81. J. Liu, N. B. Perumal, C. J. Oldfield, et al., *Biochemistry* **45**, 6873 (2006).
82. J. P. Kruse and W. Gu, *Cell* **137**, 609 (2009).
83. S. D. Copley, *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1684 (2014).
84. W. Lu, V.I. Gelfand, *Trends Cell Biol.* **27**, 505 (2017).
85. B. Henderson, *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1720 (2014).
86. C. Gancedo, C. L. Flores, and J. M. Gancedo, *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1715 (2014).
87. M. A. Fares, *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1709 (2014).
88. C. E. Chapple, B. Robisson, L. Spinelli, et al., *Nat. Commun.* **6**, 7412 (2015).
89. G. Hu, Z. Wu, V. N. Uversky, and L. Kurgan, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2761 (2017).
90. L. M. Iakoucheva, C. J. Brown, J. D. Lawson, et al., *J. Mol. Biol.* **323**, 573 (2002).
91. R. van der Lee, M. Buljan, B. Lang, et al., *Chem. Rev.* **114**, 6589 (2014).
92. N. S. Latysheva, T. Flock, R. J. Weatheritt, et al., *Prot. Sci.* **24**, 909 (2015).
93. A. Balcerak, A. Trebinska-Stryjewska, R. Konopinski, et al., *Open Biol.* **9**, 190096 (2019). DOI: 10.1098/rsob.190096
94. E. A. Lemke, *J. Mol. Biol.* **428** (10, Pt A), 2011 (2016).
95. N. N. Sluchanko and D. M. Bustos, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **166**, 19 (2019).
96. A. Zanzoni, D. M. Ribeiro, and C. Brun, *Cell Mol. Life Sci.* **76**, 4407 (2019).
97. R. J. Weatheritt, N. E. Davey, and T. J. Gibson, *Nucl. Acids Res.* **40**, 7123 (2012).
98. K. Van Roey, B. Uyar, R. J. Weatheritt, et al., *Chem. Rev.* **114**, 6733 (2014).

Multifunctional Proteins

A.B. Uzdensky

*Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University,
prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

A surprisingly small number of human genes (19–20 thousand) are not consistent with a much larger number of proteins and the number of their functions. One of the factors of functional diversity is protein multifunctionality. Important subgroups of such proteins are moonlighting proteins, in which single polypeptide chain serves two or more functions under different conditions. They are often abundant housekeeping proteins: ribosomal proteins and other glycolytic enzymes. This review article deals with the aspect of structures and functions of some of these proteins such as ribosomal protein S3, cytochrome *c*, glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase, and STAT3, β -catenin and p53 proteins as transcription factors. Shifting balance of protein synthesis, utilization and degradation, protein localization-dependent changes, post-translational modifications play important role in switching protein functions. It was shown that the internal intrinsically disordered protein regions are significant in the formation of intermolecular complexes with other proteins and nucleic acids. The appearance of multifunctional proteins during evolution is discussed.

Keywords: multifunctional proteins; cytochrome c; GAPDH; β -catenin; STAT3; p53