УДК 637.325:543.54
DOI: 10.31515/1019-8946-2023-04-33-35

Белки мембраны молочной жировой глобулы

7. Белок PAS 6/7

Вадим Валентинович Ельчанинов, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, отдел СибНИИС
E-mail: ve3636@yandex.ru

Представлена биохимическая характеристика одного из основных полипептидных компонентов мембраны молочной жировой глобулы – белка PAS 6/7. Рассмотрена история его идентификации, молекулярная структура, затронуты известные и возможные биологические функции, дан анализ аминокислотной последовательности и реакций посттрансляционной модификации белка PAS 6/7.

Ключевые слова: *мембрана молочной жировой глобулы, белок PAS 6/7, структура, домены, посттрансляционные модификации.*

Elchaninov V. V. Proteins of the membrane of the milk fat globule. 7. Protein PAS 6/7
Federal Altay Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making Department

The biochemical characteristics of one of the main polypeptide components of the membrane of a milk fat globule – the protein PAS 6/7, are presented. The history of its identification, molecular structure, known and possible biological functions are considered, the amino acid sequence and reactions of posttranslational modification of the PAS 6/7 protein are analyzed.

Key words: *milk fat globule membrane, PAS 6/7 protein, structure, domains, posttranslational modifications.*

Идентификация белка 6/7, окрашиваемого периодной кислотой/основанием Шиффа (PAS) (PAS 6/7), имеет сложную и продолжительную историю. При электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия в препаратах белков мембраны молочной жировой глобулы (ММЖГ) коровы (*Bos taurus*) в диапазоне молекулярных масс (ММ) 43–59 кДа выявляются две полосы, которые окрашиваются как красителем Coomassie Blue, так и PAS-реагентами [1–5]. Поскольку были основания полагать, что это, как минимум, два белка с близкими физико-химическими свойствами, они получили название белки 6 и 7, окрашиваемые периодной кислотой/основанием Шиффа, или сокращенно PAS 6/7. Компоненты PAS 6/7 входят в пул основных белков ММЖГ, а также присутствуют в растворимой форме в обезжиренном молоке. Некоторое время PAS 6/7 коровы считались гомологами мышиного белка MFG-E8 (белок 8, подобный эпидермальному фактору роста), открытого в 1990 г. [6].

Еще в 1980 г. установлено, что иммунологически белки PAS 6/7 одинаковы [4], но их окончательная идентификация выполнена только в 1990-х гг. после клонирования и секвенирования кДНК [3, 7]. Длительный период идентификации отчасти объясняется наличием нескольких изоэлектрических вариантов [4, 5] и близостью ММ этих белков к ММ адипофилина. В 1994–1996 гг. три независимые исследовательские группы подтвердили, что две основные полосы белка PAS 6/7, имеющие различные ММ и pI, — это **одна и та же полипептидная цепь** (продукт одного гена), подвергшаяся дифференцированной посттрансляционной модификации [3, 7, 8].

Сегодня очевидно, что у различных млекопитающих белок PAS 6/7 и подобные ему протеины — это основные компоненты ММЖГ. Зачастую их гетерогенность по pI и ММ объясняется разной степенью посттрансляционной модификации (ПТМ) **одного и того же белка**. Компоненты PAS 6/7 являются периферическими протеинами ММЖГ, поскольку их легко выделить при промывке препаратов молочных жировых глобул (МЖГ) водными растворами с высоким содержанием солей и хаотропных агентов [2, 3, 5].

В 1997 г. белок человека, гомологичный коровьему белку PAS 6/7, получил название «лактадгерин» (lactadherin), что подчеркивает его «молочное» происхождение и адгезивные свойства [9]. Сегодня в базе данных UniProtKB рекомендуемое название белка PAS 6/7 коровы — лактадгерин, а наименование «гликопротеин PAS-6/PAS-7» приводится как одно из восьми альтернативных [10]. В дальнейшем будем называть этот компонент ММЖГ коровы так, как рекомендует Американская ассоциация молочной науки (ADSA), — белок (гликопротеин) PAS 6/7.

Предполагается, что крысиный гомолог коровьего гликопротеина PAS 6/7 является ферментом О-ацетилганглиозид синтетазой. Этот фермент катализирует ацетилирование гидроксильной группы С9 терминальной α2,8-связанной сиаловой кислоты в ганглиозиде GD3. Обладает ли белок PAS 6/7 коровы ацетилтрансферазной активностью, неизвестно. С учетом вышеизложенного Комитет по номенклатуре белков молока при ADSA рекомендовал сохранить за коровьим белком название PAS 6/7 до тех пор, пока его физиологические функции и возможные ферментативные свойства не будут установлены окончательно. Если подтвердится, что белок PAS 6/7 коровы является ацетилтрансферазой, ему будет присвоено наименование, соответствующее международной классификации ферментов [1, 6].

Аминокислотная (а. к.) последовательность гликопротеина PAS 6/7 из ММЖГ коровы установлена [3, 7]. Первичная структура и дополнительная информация о свойствах белка PAS 6/7 размещены в базе данных UniProt (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q95114/entry), идентификационный номер — Q95114 MFGM_BOVIN [10]. Полипептидная цепь белка PAS 6/7 состоит из 427 а. к. остатков, вычисленная ММ — 47,411 кДа. Белок синтезируется в виде пре-белка PAS 6/7 (рис. 1). При процессинге удаляется сигнальный пептид (Met1-Ala18), после чего ММ белка PAS 6/7 становится равной 45,6 кДа, pI составляет 7,0 [1]. Другие известные ПТМ включают О-гликозилирование остатков Ser27 и Thr34, N-гликозилирование Asn59 и Asn227, а также образование семи дисульфидных связей — Cys24-Cys35,

```
        10         20         30         40         50         60
MPCPRLLAAL FCSSGLFAAS GDFCDSSLCL HGGTCLLNED RTPPFYCLCP EGFTGLLCNE
        70         80         90        100        110        120
TEHGPCFPNP CHNDAECQVT DDSHRGDVFI QYICKCPLGY VGIHCETTCT SPLGMQTGAI
       130        140        150        160        170        180
ADSQISASSM HLGFMGLQRW APELARLHQT GIVNAWTSGN YDKNPWIQVN LMRKMWVTGV
       190        200        210        220        230        240
VTQGASRAGS AEYLKTFKVA YSTDGRQFQF IQVAGRSGDK IFIGNVNNSG LKINLFDTPL
       250        260        270        280        290        300
ETQYVRLVPI ICHRGCTLRF ELLGCELNGC TEPLGLKDNT IPNKQITASS YYKTWGLSAF
       310        320        330        340        350        360
SWFPYYARLD NQGKFNAWTA QTNSASEWLQ IDLGSQKRVT GIITQGARDF GHIQYVAAYR
       370        380        390        400        410        420
VAYGDDGVTW TEYKDPGASE SKIFPGNMDN NSHKKNIFET PFQARFVRIQ PVAWHNRITL

RVELLGC
```

Рис. 1. Первичная структура пре-белка PAS 6/7 коровы [10]. Зеленым выделен сигнальный пептид, желтым – а.к. последовательность зрелого белка, бирюзовым – остатки Cys, образующие дисульфидные связи, черным – сайты N-гликозилирования, красным – сайты O-гликозилирования, синим – адгезивная последовательность (RGD), лиловым – C-концевая последовательность, участвующая в связывании фосфолипидов

Cys29-Cys47, Cys49-Cys58, Cys66-Cys77, Cys71-Cys94, Cys96-Cys105 и Cys109-Cys265 [10].

Характерной особенностью структуры белка PAS 6/7 коровы и его гомологов у других видов млекопитающих является наличие EGF-подобных (EGF — Epidermal Growth Factor, англ. — эпидермальный фактор роста) N-терминальных участков (доменов) и C-терминальных последовательностей, которые напоминают домены C1 и C2 факторов V и VIII свертывания крови человека. В каждом белке один из EGF-доменов содержит короткую адгезивную RGD-последовательность (рис. 1, 2), которая связывается с интегринами — поверхностными клеточными белками-рецепторами. Интегрины взаимодействуют с внеклеточным матриксом и передают различные межклеточные сигналы [3, 9]. Домены C2 несут участки связывания фосфолипидов [1]. Исследование топологии коровьего гликопротеина PAS 6/7 и его человеческого гомолога — лактадгерина показало, что они являются периферическими белками, которые своими C-терминальными участками связаны с анионными фосфолипидами клеточной мембраны (рис. 2) [11, 12].

В молекуле коровьего белка PAS 6/7 а. к. остатки, следующие за лидерной последовательностью, образуют два EGF-подобных домена — **EGF1** и **EGF2**. Участок (мотив) адгезии расположен внутри второго домена, его составляет последовательность Arg85-Gly86-Asp87 (адгезивная или **RGD**-последовательность). В каждом из EGF-доменов всех исследованных белков, подобных PAS 6/7, локализованы шесть консервативных остатков Cys, которые образуют внутримолекулярные дисульфидные связи [10].

Следом за EGF-подобными доменами в белке PAS 6/7 коровы располагаются домены **C1** и **C2**. Первичная структура домена C2 на 43 и 38 % идентична структуре домена C2 факторов свертывания крови V и VIII соответственно [3, 11, 12]. Установлено, что домен C2 факторов свертывания крови V и VIII и аналогичные им последовательности белка PAS 6/7 с высокой аффинностью связывают анионные фосфатидилсеринсодержащие участки плазматических мембран [11]. Связывание с фосфолипидами происходит при участии последовательности Pro411-Leu425 [3, 10]. Контакт C-терминального домена гликопротеина PAS 6/7 с фосфолипидным бислоем МЖГ оставляет значительную часть молекулы свободной, что позволяет белку

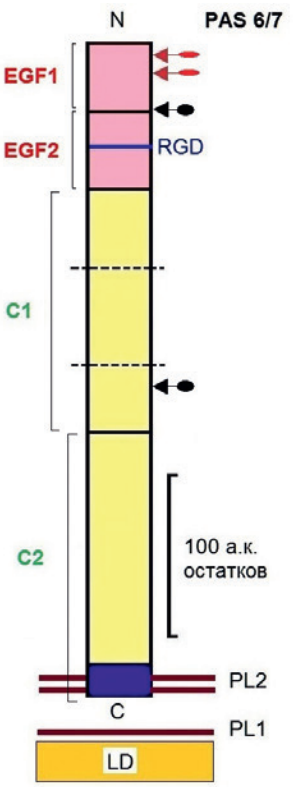

*Рис. 2. Схема предполагаемой структуры и топографии белка PAS 6/7 в мембране МЖГ [6]: **N** — N-конец полипептидной цепи; **RGD** — положение адгезивной последовательности; ◄ — сайты O-гликозилирования; ◄ — сайты N-гликозилирования; ---- — положение участка из 52 а.к. остатков, отсутствующего в альтернативно сплайсированном варианте белка; **EGF1** — домен, последовательность 20–59; **EGF2** — домен, последовательность 62–106; **C1** — домен, последовательность 109–265; **C2** — домен, последовательность 270–427; **PL2** — бислойная фосфолипидная мембрана молочной жировой глобулы; **PL1** — монослойная фосфолипидная мембрана липидной капли; **LD** – липидная капля; **C** — C-конец полипептидной цепи; ■ — C-терминальная последовательность, связывающая анионные фосфатидилсеринсодержащие участки плазматической мембраны*

PAS 6/7 взаимодействовать с интегриновыми рецепторами через консервативные адгезивные RGD-последовательности домена EGF2 [6, 9].

При исследовании кДНК обнаружен альтернативно сплайсированный вариант гликопротеина PAS 6/7 с «вырезанным» участком из 52 а. к. остатков внутри домена C1 на участке Gln168---Ile211 (рис. 2) [3]. Вероятно, этот молекулярный вариант белка PAS 6/7 является результатом потери одного экзона при синтезе мРНК.

Несмотря на то что все известные аналоги белка PAS 6/7 содержат EGF- и C1/C2-подобные домены, существуют и межвидовые различия в структуре этих протеинов. Молекула белка PAS 6/7 человека утратила домен EGF1, но в остальном очень похожа на гомологичные белки коровы, крысы и свиньи. Гомолог белка PAS 6/7 морской свинки (GP-55) содержит по меньшей мере один EGF-подобный домен и последовательности C1/C2, похожие на аналогичные структуры белков коровы, свиньи, крысы и мыши. Функциональная основа межвидовых различий в структуре доменов гликопротеинов PAS 6/7 неясна, хотя все известные белки этого семейства содержат адгезивную последовательность в EGF-подобном домене и C-терминальный участок потенциального связывания анионных фосфолипидов [1, 6].

Кристаллическая структура домена C2 (Cys270-Cys427) белка PAS 6/7 коровы исследована методом дифракции рентгеновских лучей с разрешением 1,67 и 2,40 Å [11, 12]. Данные о рентгеноструктурном анализе полноразмерного коровьего гликопротеина PAS 6/7 отсутствуют. Модель трехмерной структуры полноразмерного белка PAS 6/7 *B. taurus*, построенная сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0., представлена на рис. 3.

Основным типом ПТМ белка PAS 6/7 является O- и N-гликозилирование. Удаление гликанов превращает изоформы PAS 6/7 в белок с ММ ~50 кДа [8], что достаточ-

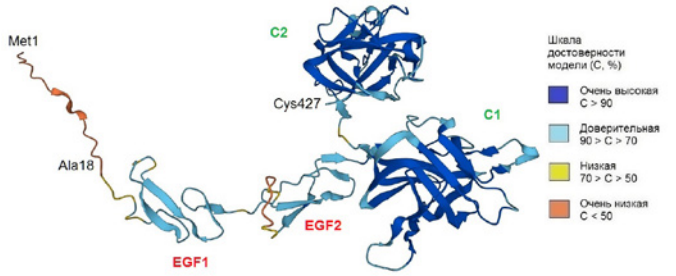

Рис. 3. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-белка PAS 6/7 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. (https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q95114). Показаны а.к. остатки, ограничивающие сигнальный пептид (1–18), и структурно-функциональные домены EGF1, EGF2, C1 и C2

но близко к предсказываемому значению ММ основного полипептида — 45,6 кДа.

Изоэлектрические точки различных вариантов гликопротеина PAS 6/7 лежат в диапазоне 5,6–7,6 [8]. Удаление остатков сиаловой кислоты с применением нейраминидазы приводит к превращению многокомпонентной смеси микрогетерогенных по заряду белков в две изоформы с pI 6,2 и 6,5 [5]. Это означает, что в основе микрогетерогенности препаратов белка PAS 6/7 лежит модификация белка сиализированными гликанами [1]. Имеются данные, указывающие на то, что состав O- и N-связанных с белком PAS 6/7 и другими гликопротеинами ММЖГ гликанов значительно варьирует, в особенности на ранних стадиях лактации [8]. Установлено, что гликаны, связанные с белком PAS 6/7 человека, могут взаимодействовать с ротавирусами и предохранять кишечник новорожденного от вирусной инфекции [6]. На сегодняшний день нет данных о таких ПТМ белка PAS 6/7, как ацилирование или фосфорилирование.

Структура и топология PAS 6/7-подобных белков предполагают, что они функционируют как протеины адгезии [3]. Белок PAS 6/7 является также компонентом плазматической мембраны сперматозоидов и способен прочно присоединяться к гликопротеинам *zona pellucida* (гликопротеиновая оболочка вокруг плазматической мембраны яйцеклетки), что предполагает его возможное участие в процессе оплодотворения [6].

Почему белок PAS 6/7, обладающий высокой адгезивной способностью, экспрессируется на внешней стороне апикальной мембраны секреторных клеток молочной железы и на поверхности МЖГ, неясно. Как уже отмечалось, гликопротеин PAS 6/7 человека (лактадгерин) связывает ротавирусные частицы и может участвовать в защите ЖКТ новорожденного от вирусных инфекций. Это означает, что первичной функцией белка PAS 6/7 в молочной железе может быть поддержание иммунного статуса новорожденного, а не участие в физиологии лактации [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Mather, I. H.** *A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane/I. H. Mather// J. Dairy Sci. 2000. V. 83. P. 203–247.*
2. **Mather, I. H.** *Studies on the structure of milk fat globule membrane/I. H. Mather, T. W. Keenan// J. Membr. Biol. 1975. V. 21. P. 65–85.*
3. **Hvarregaard, J.** *Characterization of glycoprotein PAS — 6/7 from membranes of bovine milk fat globules/J. Hvarregaard [et al.]// Eur. J. Biochem. 1996. V. 240. P. 628–636.*
4. **Mather, I. H.** *Separation of the proteins of bovine milk — fat — globule membrane by electrofocusing with retention of enzymatic and immunological activity/I. H. Mather, C. B. Tamplin, M. G. Irving// Eur. J. Biochem. 1980. V. 110. P. 327–336.*
5. **Kim, D. H.** *Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane/D. H. Kim, C. Kanno, Y. Mizokami// Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1122. P. 203–211.*
6. **Ельчанинов, В. В.** *Номенклатура и свойства белков молока коровы (Bos taurus): монография/В. В. Ельчанинов. — Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та, 2022. — 300 с.*
7. **Aoki, N.** *Molecular cloning of glycoprotein antigens MGP57/53 recognized by monoclonal antibodies raised against bovine milk fat globule membrane/N. Aoki [et al.]// Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1245. P. 385–391.*
8. **Aoki, N.** *Immunologically crossreactive 57 kDa and 53 kDa glycoprotein antigens of bovine milk fat globule membrane: isoforms with different N-linked sugar chains and differential glycosylation at early stages of lactation/N. Aoki [et al.]// Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1200. P. 227–234.*
9. **Taylor, M. R.** *Lactadherin (formerly BA46), a membraneassociated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes arg-gly-asp (RGD) — dependent cell adhesion/M. R. Taylor [et al.]// DNA Cell Biol. 1997. V. 16. P. 861–869.*
10. **UniProt KB** *— открытая база данных последовательностей белков. Q95114 MFGM_BOVIN — Lactadherin Bos taurus (Bovine), Gene: MFGE8, 427 amino acids 2022. — URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q95114/entry (дата обращения: 04.03.2023).*
11. **Lin, L.** *Crystal Structure of the Bovine Lactadherin C2 Domain, a Membrane Binding Motif, Shows Similarity to the C2 Domains of Factor V and Factor VII/L. Lin [et al.]// J. Mol. Biol. 2007. V. 371 (3). P. 717–724.*
12. **Shao, C.** *Crystal Structure of Lactadherin C2 Domain at 1.7Å Resolution with Mutational and Computational Analyses of Its Membrane-binding Motif/C. Shao [et al.]// J. Biol. Chem. 2008. V. 283 (11). P. 7230–7241.*