БЕЛКИ МЕМБРАНЫ МОЛОЧНОЙ ЖИРОВОЙ ГЛОБУЛЫ.
8. БЕЛОК, СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ (FABP)

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

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

Продолжение серии обзорных статей, посвященных структуре и функциям белков молочной жировой глобулы коровьего молока. Цель данной публикации – анализ и систематизация литературных данных, посвященных биохимической характеристике одного из полипептидных компонентов мембраны молочной жировой глобулы – белка, связывающего жирные кислоты (FABP). Структура работы включает следующие разделы: общая характеристика семейства белков, связывающих гидрофобные лиганды; способы идентификации FABP в препаратах мембран молочных жировых глобул; краткая история открытия FABP; изоформы и современная номенклатура белков семейства FABP; анализ аминокислотной последовательности, известных реакций посттрансляционной модификации; обсуждение особенностей пространственной организации белков семейства FABP и возможного механизма связывания жирных кислот и липидов; известные и предполагаемые физиологические функции; влияние гаплотипов FABP на профиль жирных кислот молока, молочную продуктивность и содержание белка в молоке.

Ключевые слова: молоко, мембрана молочной жировой глобулы, белок, связывающий жирные кислоты, структура, функции

Для цитирования: Белки мембраны молочной жировой глобулы. 8. Белок, связывающий жирные кислоты (FABP) / В. В. Ельчанинов // Молочная промышленность. 2024. № 1. С. 30–35. https://www.doi.org/10.21603/1019-8946-2024-1-6

Гидрофобные лиганды, такие как жирные кислоты и их производные, выполняют множество биологические функций в клетке. Они служат субстратами и источниками метаболической энергии, а также сигнальными и регуляторными молекулами. Высокоаффинная сорбция и перенос жирных кислот осуществляется семейством специфических внутриклеточных белков, связывающих жирные кислоты (FABP – fatty acids bindig protein, *англ.*). Белки семейства FABP экспрессируются во многих метаболически-активных тканях и существуют в виде нескольких изоформ.

При электрофорезе, в присутствии додецлсульфата натрия (ДСН-ЭФ), препаратов мембран молочных жировых глобул (ММЖГ), полученных из молока коровы, белок связывающий жирные кислоты (FABP), идентифицируется как компонент с молекулярной массой ~13 кДа, окрашиваемый Coomassie Brilliant Blue и серебряными красителями. Реагентами для выявления гликопротеинов FABP не визуализируется [1]. Для выявления FABP в мембране молочных жировых глобул (МЖГ) методом ДСН-ЭФ необходимо использовать гели с концентрацией полиакриламида не менее 10 %, в противном случае этот белок мигрирует одной полосой вместе с низкомолекулярными компонентами ММЖГ, в зоне лидирующего красителя.

Белок, связывающий жирные кислоты, открыт в 1984 г. F. D. Böhmer с соавторами, во время проведения скрининговых исследований, направленных на поиск ингибиторов роста клеток рака молочной железы. В ходе скрининга было обнаружено, что очищенные супернатантные фракции гомогенатов лактирующей молочной железы коровы содержат белковый ингибитор, способный подавлять рост клеток карциномы молочной железы *in vitro*. Из фракции, обладавшей ингибиторной активностью, выделили, очистили и секвенировали белок с молекулярной массой ~13 кДа, который назвали ингибитор роста из молочной железы (MDGI – mammary-derived growth inhibitor, *англ.*) [2, 3]. Сравнение первичной структуры MDGI с библиотеками аминокислотных последовательностей показало, что белок принадлежит к семейству протеинов, связывающих жирные кислоты, а его ближайшим структурным гомологом является FABP из клеток сердца (кардиомиоцитов) крысы [2]. Дальнейшие работы по изучению распределения этого белка в ткани молочной железы коровы установили, что MDGI сосредоточен в растворимых клеточных экстрактах и в ММЖГ (как в мембранной, так и в супернатантной фракции), а в молочной сыворотке обнаруживается лишь в следовых количествах [1].

Известно несколько изоформ ЖК-связывающих протеинов. Во-первых, это белки из молочных желез млекопитающих (коровы, крысы и мыши), которые идентичны FABP из сердечной мышцы. Во-вторых, это FABP, выделенные из адипоцитов молочной железы не рожавших мышей [4]. Наличие этого бел-

Источник изображения: Freepik.com

ка в нелактирующих молочных железах связывают с наличием в них большого количества жировой ткани. Вместе с тем адипоцитарная форма FABP экспрессируется и во время лактации, например у коровы [5]. В третьих, кроме адипоцитов и сердечной мышцы, тканеспецифичные FABP были идентифицированы в печени, кишечнике, эпидермисе, миелине, мозге, подвздошной кишке и тестикулах [6]. В соответствии с ранней номенклатурой, названия белков этого семейства включали буквенное обозначение ткани, для которой они специфичны: печеночные FABP обозначались как L(liver)-FABP, адипоцитарные как A(adipocite)-FABP, сердечные – H (heart)-FABP и т.п. [6].

Комитет по номенклатуре белков молока (ADSA) рекомендовал использовать для обозначения белка, связывающего жирные кислоты, из ММЖГ коровы аббревиатуру FABP [7]. Однако в связи с пересмотром номенклатуры белков семейства FABP буквенные обозначения тканевой принадлежности были заменены на аббревиатуры FABP (или Fabp) с нумерацией арабскими цифрами, например: FABP3 (или Fabp3) – белок сердечного типа, FABP4 – белок адипоцитарного типа, FABP5 – белок эпидермального типа и так далее [8].

В молочной железе коровы (*Bos taurus*) синтезируются FABP сердечного, адипоцитарного и эпидермального типа – FABP3 (133 аминокислот), FABP4 (132 аминокислот) и FABP5 (135 аминокислот) [8]. Во время лактации экспрессия всех этих белков значительно повышается [6, 9]. В лактирующих молочных железах крысы, мыши и коровы доминирует сердечная форма FABP [9].

Первичные структуры FABP3, FABP4 и FABP5 *B. taurus* установлены [8]. Рассмотрим, для примера, структуру FABP4 – белка адипоцитарного типа, который оказывает влияние на концентрацию и соотношение жирных кислот, молочную продуктивность и содержание белка в коровьем молоке [6, 10]. Аминокислотная последовательность FABP4 коровы и информация о свойствах этого белка, доступны в базе данных UniProt (https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48035/entry). Идентификационный номер FABP4 *B. taurus* – P48035 (FABP4_BOVIN) [11]. Полипептидная цепь FABP4 состоит из 132 аминокислот и имеет вычисленную молекулярную массу (без учета посттрансляционных модификаций) равную 14,678 кДа (рис. 1).

Белок синтезируется в виде предшественника – пре-FABP4, с инициирующим Met1, который удаляется при процессинге. Предположи-

```
        10         20         30         40         50
MCDAFVGTWK LVSSENFDDY MKEVGVGFAT RKVAGMAKPT LIISLNGGVV
        60         70         80         90        100
TIKSESTEKN TEISFKLGQE FDEITPDDRK VKSIVNLDEG ALVQVQNWDG
       110        120        130
KSTTIKRKLM DDKMVLECVM NGVTATRVYE RA
```

Рисунок 1. Первичная структура **пре-FABP4** коровы [11]. Зеленым фоном выделен Met1, желтым фоном обозначена аминокислотная последовательность зрелого FABP4. Лиловым фоном выделен сайт потенциального посттрансляционного ацетилирования. Бирюзовым фоном отмечены, предположительно, фосфорилированные остатки Ser и Tyr. Черным фоном обозначены аминокислоты, участвующие в связывании гидрофобных лигандов

тельно, в ходе ПТМ происходит ацетилирование Cys в положении 2, а также фосфорилирование Ser13 и Tyr20 (при участии Tyr-киназы) [11].

Несмотря на то, что данные о результатах исследования FABP4 коровы методами рентгеноструктурного анализа в базе данных 3-D структур белков UniProt (https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48035/entry#structure) отсутствуют, пространственная модель пре-FABP4 *B. taurus* предсказывается сервисом Alpha Fold Monomer v 2.0 с очень высокой достоверностью (> 90 %) (рис. 2). Предполагаемая пространственная структура пре-FABP4 *B. taurus* напоминает бочонок (barrel-like structure, *англ.*), внутри которого находится полость, образованная двумя участками антипараллельных *β*-складок [7].

Особенности трехмерной организации позволяют разделить семейство FABP-подобных белков на два подсемейства.

У внутриклеточных FABP «бочонок» сжат в структуру, которая имеет форму двустворчатого моллюска, а внутренняя полость накрыта последовательностями, которая образует мотив «спираль-поворот-спираль». У всех белков этого подсемейства R-группы гидрофобных аминокислот обращены в полость, а гидрофильные аминокислотные остатки *β*-складок и поворотов, соединяющих антипараллельные *β*-складки, экспонированы наружу. Положение гидрофобных и гидрофильных аминокислот высококонсервативно [12].

У внеклеточных ЖК-связывающих белков или липокалинов «бочонок» раздут до почти сферической формы, а мотив «спираль-поворот-спираль» отсут-

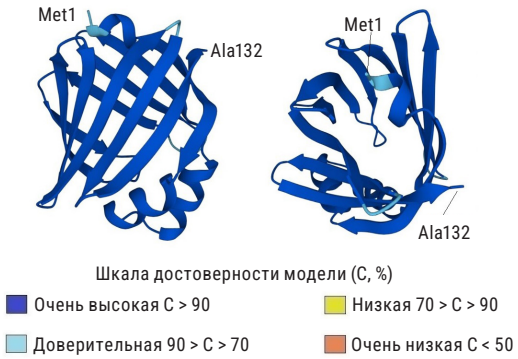

Рисунок 2. Модель предполагаемой трехмерной структуры пре-FABP4 коровы, построенная с использованием сервиса Alpha Fold Monomer v 2.0. Показаны две проекции модели, на правой видна полость, образованная двумя участками антипараллельных *β*-складок, которая участвует в связывании липидов

Источник изображения: unsplash.com

Источник изображения: unsplash.com

ствует [7]. В отличие от внутриклеточных FABP, состоящих из ≈132 аминокислот, первичная структура белков подсемейства липокалинов (внеклеточных FABP) включает ≈175 аминокислот. К липокалинам относятся: сывороточный ретинол-связывающий белок, билин-связывающие белки насекомых, *α*2-глобулин (основной белок мочи) и *β*-лактоглобулин из молочной сыворотки [13].

Удивительно, но внутренняя полость в молекулах FABP-подобных белков, участвующая в связывании липидов, не является строго гидрофобной. В ней присутствует некоторое количество упорядоченных молекул воды, а участки полипептидной цепи, обращенные в полость, содержат примерно равное количество гидрофобных и неполярных аминокислотных остатков [7]. В большинстве FABP жирные кислоты и липидные лиганды связываются с определенными полипептидными последовательностями, расположенными ближе к «дну» полости. Ключевыми аминокислотными остаткамии, критичными для связывания гидрофобных лигандов, считаются консервативные Arg107 и Tyr12 [12]. На «входе» в полость расположен остаток Phe57, консервативный в FABP кардиомиоцитов (FABP3) и адипоцитов (FABP4), который принимает различную конформацию в присутствии, а ткаже отсутствии лиганда (жирной кислоты или липида) [14].

Физиологические функции FABP молочной железы коровы полностью не установлены. В ткани молочной железы FABP может участвовать во внутриклеточном транспорте жирных кислот, контролировать метаболизм липидов или способствовать слиянию (увеличению размеров) липидных капель в цитоплазме секреторных клеток [7].

Из FABP выделен пептид, обладающий противоопухолевой активностью, который состоит из 11 аминокислот и локализован на С-терминальном участке. И этот пептид, и весь белок MDGI, и FABP из кардиомиоцитов крысы стимулируют дифференцировку клеток молочной железы [15].

Предполагалось, что FABP в молочной железе участвует в процессах развития организма путем ингибирования пролиферации и стимулирования дифференцировки эпителиальных клеток [15]. Есть экспериментальные свидетельства того, что FABP млекопитающих могут регулировать рост и дифференцировку клеток напрямую, через внутриклеточные механизмы [16]. При этом необходимо учитывать, что FABP, секретируемый в составе молочных жировых глобул, в основном

не способен взаимодействовать с клетками молочной железы, поскольку связан с мембраной, предположительно, через цитоплазматический «хвост» кластера дифференцировки 36 (CD36) или находится в пространстве между внешним фосфолипидным бислоем и внутренней монослойной мембраной [1].

C. Marchitelli и соавторы [17] обнаружили, что активность гена FABP4 связана с содержанием среднецепочечных и длинноцепочечных жирных кислот в молоке. Из девяти изученных ими генов-кандидатов по влиянию на состав молочного жира FABP4 является «наиболее важным». R. A. Nafikov и соавторы сообщили, что определенные гаплотипы FABP4 связаны с профилями жирных кислот в молоке, но не с молочной продуктивностью [10]. Напротив, по данным группы H. Zhou и соавторов, FABP4 может оказывать влияние на два экономически важных признака – молочную продуктивность и содержание белка в молоке. Объектом исследования были 719 коров линии Holstein-Friesian × Jersey с четырьмя гаплотипами FABP4. Показано, что животные гаплотипов AA, AB и AC производили меньше молока, но с более высоким процентом белка, чем коровы гаплотипа BC [18].

При двумерном электрофорезе белков ММЖГ *B. taurus* выявляется, по меньшей мере, 1 минорный и 2 мажорных изоэлектрических варианта FABP. С использованием антител против FABP коровы показано, что варианты этого белка из ММЖГ имеют pI в диапазоне 5,1–5,9 [19]. Коровий FABP в составе ММЖГ фосфорилируется эндогенными протеинкиназами при инкубации препаратов мембран с [γ32P]-АТФ [20]. Не исключено, что существование различных изоэлектрических форм FABP из ММЖГ коровы обусловлено различной степенью фосфорилирования полипептидной цепи.

FABP из молочной железы коровы не гликозилирован. Присоединение N-связанных гликанов не характерно для белков, синтезированных в цитоплазме. Известно, что FABP из коровьего сердца содержит один сайт потенциального гликозилирования (Asn-X-Ser/Thr), тем не менее, N- или O-гликозилированные формы очищенных внутриклеточных белков этого семейства не известны [7].

Данных о липидизации FABP из молочной железы коровы нет. ■

MILK FAT GLOBULE MEMBRANE PROTEINS. 8. FATTY ACID-BINDING PROTEIN (FABP)

Vadim V. Elchaninov
Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Barnaul

REVIEW ARTICLE

This article continues a series of reviews about the structure and functions of milk fat globule membrane (MFGM) proteins in cow's milk. This installment introduces publications on the biochemistry of fatty acid binding protein (FABP), which is a polypeptide component of MFGM. The article gives a brief history of its discovery, as well as profiles the proteins that bind hydrophobic ligands and describes the methods of FABP identification in MFGM preparations. Other aspects of FABP studies include: isoforms and modern nomenclature; amino acid sequence and reactions to post-translational modification; spatial organization; mechanisms for binding fatty acids to lipids; well-investigated and hypothesized physiological functions; the effect of haplotypes on milk fatty acids, yield, and protein content.

Keywords: milk, milk fat globule membrane (MFGM) proteins, fatty acid binding protein, structure, function

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Brandt, R. A.** 13-kilodalton protein purified from milk fat globule membranes is closely related to a mammary–derived growth inhibitor / R. A. Brandt [et al.] // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1420–1425. https://www.doi.org/10.1021/bi00405a005
2. **Böhmer, F.-D.** Identification of a polypeptide growth inhibitor from bovine mammary gland. Sequence homology to fatty acid- and retinoid-binding proteins / F.-D. Böhmer [et al.] // The Journal of biological chemistry. 1987. V. 262. P. 15137–15143.
3. **Böhmer, F.-D.** Purification of a growth inhibitor for Ehrlich ascites mammary carcinoma cells from bovine mammary gland / F.-D. Böhmer [et al.] // Experimental cell research. 1984. Vol. 150(2). 466–476. https://doi.org/10.1016/0014-4827(84)90591-3
4. **Bansal, M. P.** Expression of fatty acid binding proteins in the developing mouse mammary gland / M. P. Bansal, D. Medina // Biochemical and biophysical research communications. 1993. Vol. 191(1). 61–69. https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1184
5. **Specht, B.** Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but amix of heart–type and adipocytetype fatty acid–binding protein / B. Specht [et al.] // The Journal of biological chemistry. 1996. Vol. 271(33). 19943–19949. https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.19943
6. **Smathers, R. L.** The human fatty acid–binding protein family: Evolutionary divergences and functions / R. L. Smathers, D. R. Petersen // Human genomics. 2011. Vol. 5(3). 170–191. https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-3-170
7. **Mather, I. H.** A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk–fat globule membrane / I. H. Mather // Journal of dairy science. 2000. Vol 83(2). 203–247. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74870-3
8. **UniProt KB – база данных последовательностей белков.** Results or search "FABP" as a Protein family, Protein Name, or Gene Name [Электронный ресурс]. URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb? (дата обращения: 13.09.2023).
9. **Bionaz, M.** ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation / M. Bionaz, J. J. Loor // The Journal of nutrition. 2008. Vol. 138(6), 1019–1024. https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1019

10. **Nafikov, R. A.** Associations of polymorphisms in solute carrier family 27, isoform A6 (SLC27A6) and fatty acid–binding protein–3 and fatty acid–binding protein–4 (FABP3 and FABP4) with fatty acid composition of bovine milk / R. A. Nafikov [et al.] // Journal of dairy science. 2013. V. 96. P. 6007–6021. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6703
11. **UniProt KB – база данных последовательностей белков.** P48035 FABP4_BOVIN – Fatty acid–binding protein, adipocyte Bos taurus (Bovine) Gene: FABP4, 132 amino acids [Электронный ресурс]. URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48035/entry (дата обращения: 15.09.2023).
12. **Banaszak, L.** Lipid–binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins / L. Banaszak [et al.] // Advances in Protein Chemistry. 1994. V. 45. P. 89–151. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60639-7
13. **Monaco, H. L.** Crystal structure of the trigonal form of bovine beta–lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 A resolution / H. L. Monaco [et al.] // Journal of molecular biology. 1987. V. 197. P. 695–706. https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90476-1
14. **Xu, Z.** The adipocyte lipid–binding protein at 1.6–A resolution. Crystal structures of the apoprotein and with bound saturated and unsaturated fatty acids / Z. Xu, D. A. Bernlohr, L. J. Banaszak // The Journal of biological chemistry. 1993. V. 268. P. 7874–7884.
15. **Yang, Y.** Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland / Y. Yang [et al.] // J. Cell Biol. – 1994. – V. 127. – P. 1097–1109.
16. **Handbook of Experimental Pharmacology.** Vol. 95/II. Peptide Growth Factors and Their Receptors. Mammary-derived growth inhibitor / R. Grosse, P. Langen.; M. B. Sporn, A. B. Roberts, eds. – New York, NY, USA: Springer-Verlag, 1991. – P. 249–265.
17. **Marchitelli, C.** Milk fatty acid variability: effect of some candidate genes involved in lipid synthesis / C. Marchitelli [et al.] // Journal of dairy research. 2013. V. 80. P. 165–173. https://doi.org/10.1017/S002202991300006X
18. **Zhou, H.** Variation in the bovine FABP4 gene affects milk yield and milk protein content in dairy cows / H. Zhou [et al.] // Scientific reports. 2015. V. 5 (1). https://doi.org/10.1038/srep10023
19. **Spitsberg, V. L.** Association and coexpression of fatty–acid–binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland / V. L. Spitsberg, E. Matitashvili, R. C. Gorewit // European journal of biochemistry. 1995. V. 230. P. 872–878. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20630.x
20. **Spitsberg, V. L.** In vitro phosphorylated bovine milk fat globule membrane proteins / V. L. Spitsberg, R. C. Gorewit // The Journal of Nutritional Biochemistry. 1997. V. 8. P. 181–189. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(97)00001-6