

## Модификация белков мембрано-цитоскелетного комплекса при криоконсервировании эритроцитов человека в присутствии ПЭО-1500

UDC 57.043:612.111:547.42

N.G. ZEMLYANSKIKH\*, P.M. ZUBOV, L.A. BABYCHUK

## Modification of Proteins of Membrane-Cytoskeleton Complex During Cryopreservation of Human Erythrocytes at PEG-1500 Presence

Изучали модификации белкового состава МЦК эритроцитов, экспонированных в растворах ПЭГ-1500 и криоконсервированных под защитой данного соединения, в средах с различной ионной силой и варьирующим содержанием двухвалентных катионов. Установлены особенности белкового спектра МЦК эритроцитов, обусловленные ПЭГ-1500 и низкой температурой.

**Ключевые слова:** эритроцит, криоконсервирование, цитоскелет, полиэтиленгликоль.

Вивчали модифікації білкового складу МЦК еритроцитів, експонованих у розчинах ПЕГ-1500 та криоконсервованих під захистом цього сполучення, у середовищах з різною іонною силою та варіюючим вмістом двовалентних катіонів. Встановлено особливості білкового спектра МЦК еритроцитів, які обумовлені ПЕГ-1500 та низькою температурою.

**Ключові слова:** еритроцит, криоконсервування, цитоскелет, поліетиленгліколь.

In the work there were investigated the modifications of protein content of membrane-cytoskeleton complex in erythrocytes exposed to PEG-1500 solution and cryopreserved under its protection in the media with different ionic strength and varying concentrations of bivalent ions. Peculiarities of erythrocyte protein spectra in membrane-cytoskeleton complex caused by PEG-1500 and low temperature were established.

**Key-words:** erythrocyte, cryopreservation, cytoskeleton, polyethylene glycol.

Для обеспечения выживания клеток в условиях замораживания-отогрева применяются криопротекторы. Исследование непроникающих в клетки криопротекторов представляет особый интерес для разработок безотмывочных способов криоконсервирования клеточных суспензий. Высокий уровень сохранности эритроцитов после размораживания был отмечен при криоконсервировании под защитой ПЭГ-1500 [1]. Применение криопротектора сопровождается изменением формы и размеров эритроцитов в ответ на изменение осмолярности и состава среды. Реализация таких процессов предполагает возможность перестроек в структуре мембрано-цитоскелетного комплекса (МЦК) и изменения характера взаимодействий между отдельными белками-партнерами. Учитывая важную роль МЦК в поддержании структурных и функциональных свойств клеток, изучение модификации белок-белковых взаимодействий (ББВ) в данной сложной надмолекулярной системе является актуальной проблемой.

Цель работы – изучение модификации белкового состава МЦК эритроцитов, экспонированных в растворах ПЭГ-1500 и криоконсервированных под защитой данного соединения, в средах различной ионной силы и варьирующим содержанием двухвалентных катионов.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили эритроциты доноров, которые отмывали раствором 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4 в 3–4 этапа. Для изучения модификации белкового состава МЦК под влиянием ПЭГ-1500 добавляли раствор к эритроцитам при разных температурах и инкубировали клетки в течение 40 мин при 37 и 0–4°C. Образцы замораживали до –196°C быстрым погружением контейнеров в жидкий азот, отогревали при 42–44°C в водяной бане. Для получения теней аликвоты эритроцитов лизировали в 20 объемах сред В, С, Д, содержащих соответственно 135, 250 и 500 мМ KCl. Каждая среда была дополнена

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

четырьмя различными добавками: 1 –  $10^{-6}$  М  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-3}$  М  $\text{MgCl}_2$ ; 2 –  $10^{-5}$  М  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-3}$  М  $\text{MgCl}_2$ ; 3 –  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-3}$  М  $\text{MgCl}_2$ ; 4 – 2 мМ ЭДТА. Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду и 0,02% сапонина.

На этапе лизиса (30 мин при 0–4°C) все растворы содержали ингибитор протеаз PMSF (1 мг/мл) и ДТТ (дителиотреитол) (10 мМ). Тени эритроцитов трижды отмывали 20-кратными объемами соответствующих растворов. Аликвоты теней солиubilизировали в sample буфере [3]. Электрофорез белков теней эритроцитов проводили в вертикальных пластинах SDS-ПААГ в системе Laemmly [3]. Денситометрирование и анализ гелей выполняли с помощью программного обеспечения GEL (Великобритания), статистический анализ – с применением программного пакета Statgraphics for Win 2.0. Для оценки достоверности различий в выборках применяли критерий знаков.

### Результаты и обсуждение

Дегидратация клеток, индуцированная гипертоническим раствором ПЭГ, и его адсорбция на мембране вызывают генерализованные структурные изменения в МЦК. Повышение ионной силы раствора в клетках может рассматриваться как один из ведущих факторов, определяющих перестройки в сложной сети ББВ. ПЭГ-1500 ингибирует активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [2], что в сочетании с потерей воды ведет к увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток. Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на ББВ может реализовываться путем непосредственного связывания данного иона со специфическими сайтами белков или опосредованно через кальмодулин,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые протеинкиназы, протеазы, фосфатазы и т.д..

Как показал анализ денситограмм, при физиологических значениях ионной силы в МЦК эритроцитов, инкубированных в присутствии ПЭО-1500, обнаруживается ряд отличий от белкового спектра нативных клеток, которые зависят от концентрации двухвалентных катионов, прежде всего, от уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Было установлено, что в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  содержание анкирина и белка полосы (б. п.) 4.2 в спектре теней эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500, выше, чем в контроле. При инкубировании эритроцитов с ПЭГ-1500 отмечается повышение содержания б. п. 4.1, которое, в отличие от модификаций анкирина и б. п. 4.2, выявляется при хелатировании двухвалентных катионов. В гипертоническом растворе ПЭО-1500 в клетках изменения ББВ контролируются ростом концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и повышением ионной силы. В таких условиях, очевидно, происходят структурные изменения б. п. 4.1, проявляющиеся усилением взаимо-

действия в ЭДТА-содержащей среде. Исходя из полученных данных, можно предположить, что упрочнение вертикальных контактов в МЦК эритроцитов под влиянием ПЭО-1500 осуществляется различными способами, в том числе через анкирин, б. п. 4.2 и б. п. 4.1. Следствием более жестких контактов между белками-партнерами может быть увеличение механической прочности клеток и связанное с этим повышение стабильности эритроцитов к действию факторов криоконсервирования.

Инкубирование клеток с ПЭГ-1500 характеризовалось повышением уровня б. п. 4.9 в присутствии умеренно высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ . Данная полоса соответствует белку дематину, локализованному на актиновых протофиламентах и способствующему стабилизации их структуры, что, по-видимому, отражает формирование более жесткой структуры узловых комплексов цитоскелетной сети.

Денситометрический анализ показал, что температурные условия инкубирования клеток с ПЭО-1500 не оказывают заметного влияния на характер модификации ББВ.

Применение растворов с высокой ионной силой выявляет гораздо меньше различий в белковом спектре МЦК нативных эритроцитов и клеток, инкубированных с ПЭО-1500. Вместе с тем сравнение белковых спектров при разных значениях ионной силы дает возможность представить характер изменений ББВ при повышении концентрации солей в клетке. Общей чертой изменения белкового спектра МЦК эритроцитов в данных условиях является снижение содержания б. п. 3. Увеличение ионной силы раствора, моделирующее условия дегидратации клеток в присутствии ПЭГ, свидетельствует о тенденции потери основного интегрального белка плазматической мембраны, что может отрицательно повлиять на стабильность мембраны [4].

Изучение модификации взаимодействия белков в МЦК эритроцитов под воздействием криоконсервирования в присутствии ПЭГ-1500, основанное на анализе изменения белкового спектра теней при контакте со средами различной ионной силы, выявило существенные изменения белкового спектра. Было установлено, что криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭГ-1500 ведет к модификациям ББВ в МЦК, изменяя относительное содержание б. п. 3, анкирина, б. п. 4.1, б. п. 4.2 и б. п. 4.9. Кроме того, криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭГ-1500 и замораживание клеток в среде, не содержащей криопротекторов, показали ряд общих закономерностей, отражающих действие низких температур на белки МЦК при

отсутствии веществ, стабилизирующих макромолекулы внутри клеток. Изменения в МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500, могут быть частично обратимыми при переносе клеток в физиологические условия.

### Выводы

1. Действие криопротектора ПЭГ-1500 на эритроциты сопровождается изменениями МЦК, затрагивающими белки актиновых протофиламентов и вертикальные связи в данной структуре.

2. Изменения в МЦК при криоконсервировании эритроцитов под защитой ПЭГ-1500 и замораживании клеток без криопротекторов имеют ряд общих черт, отражающих влияние низких температур на белки при отсутствии внутриклеточных стабилизирующих веществ.

3. Изменения в МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500, могут быть частично обратимыми при переносе клеток в физиологические условия.

### Литература

1. Белоус А.М., Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Влияние дозированной обработки полиэтиленоксидом м.м.1500 на изменение формы и проницаемости плазматической мембраны эритроцитов // Докл. АН УССР.– 1988.– №7.– С. 59–63.
2. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А., Никольченко А.Ю. и др. Кинетические характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов в присутствии ПЭО-1500// Пробл. криобиологии.– 2003.– №4.– С. 28–34.
3. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry.– 1971.– Vol. 10, N13.– P. 2606–2617.
4. Van Dort H.M., Knowles D.W., Chasis J.A. et al. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N 50.– P. 46968–46974.

Поступила 01.07.2008