

Влияние криопротекторов на устойчивость эритроцитов к детергентам при модификации агрегатного состояния белка полосы 3

Cryoprotectant Effect on Erythrocyte Resistance to Detergents Under Band 3 Protein Aggregate State Modification

Исследован гемолиз эритроцитов под воздействием ионных (ЦТАБ, ДСН) и неионных (твин-20, тритон-Х-100) детергентов в присутствии криопротекторов (сахароза, декстран, ПЭГ-1500) и модификатора агрегатного состояния белка полосы 3 (ДИДС). Показано, что криопротекторы существенно снижают чувствительность эритроцитов к действию ЦТАБ и ДСН. Присутствие в среде ДИДС нейтрализует защитное действие криопротекторов от гемолиза ЦТАБ. Однако при использовании твин-20 ДИДС проявляет блокирующее действие на лизис эритроцитов независимо от состава среды. Установлено, что гемолиз эритроцитов под действием тритон-Х-100 блокируется ПЭГ-1500, а не сахарозой, и присутствие в среде ДИДС не влияет на степень гемолиза. При сравнении действия твин-20 и тритон-Х-100 можно предположить, что защитный эффект сахарозы ограничен её модифицирующим действием на белковые компоненты мембраны. Анализ полученных результатов позволяет предположить, что криопротекторы стабилизируют тетрамерные формы белка полосы 3.

Ключевые слова: эритроциты, криопротекторы, детергенты.

Досліджено гемолиз еритроцитів під впливом іонних (ЦТАБ, ДСН) і неионних (твін-20, тритон-Х-100) детергентів у присутності криопротекторів (сахароза, декстран, ПЕГ-1500) та модифікатора агрегатного стану білка смуги 3 (ДІДС). Показано, що криопротектори істотно знижують чутливість еритроцитів до дії ЦТАБ і ДСН. Присутність в середовищі ДІДС усуває захисну дію криопротекторів від ЦТАБ. Проте при використанні твін-20 ДІДС виявляє блокуючу дію на лізис еритроцитів незалежно від складу середовища. Встановлено, що гемолиз еритроцитів під впливом тритон-Х-100 блокується ПЕГ-1500, а не сахарозою, і присутність ДІДС не впливає на ступінь гемолізу. При порівнянні дії твін-20 і тритон-Х-100 можна припустити, що захисний ефект сахарози обмежується її модифікуючою дією на білкові компоненти мембрани. Аналіз отриманих результатів дозволяє припустити, що криопротектори стабілізують тетрамерні форми білка смуги 3.

Ключові слова: еритроцити, криопротектори, детергенти.

The erythrocyte hemolysis under the effect of ionic (CTAB, SDS) and non-ionic (Tween 20, Triton X-100) detergents in the presence of cryoprotectants (sucrose, dextran, PEG-1500) and band 3 protein aggregate state modifier (DIDS) was investigated. Cryoprotectants were shown as significantly decreasing erythrocyte sensitivity to CTAB and SDS effect. Protective effect of cryoprotectants against CTAB hemolysis is neutralised by DIDS presence in the medium. However when using Tween 20 DIDS manifests a blocking effect on erythrocyte lysis independently on medium composition. Erythrocyte hemolysis under triton X-100 effect was established as blocked by PEO-1500 but not sucrose, with no influence of DIDS presence in the medium on hemolysis extent. If comparing the Tween 20 and Triton X-100 effects, a protective effect of sucrose may be assumed as limited by its modifying effect on protein membrane components. The analysis of the results obtained enables the concluding about a stabilising effect of cryoprotectants on band 3 protein tetrameric forms.

Key-words: erythrocytes, cryoprotectants, detergents.

При осмотическом лизисе эритроцитов образование гемолитической поры сопровождается латеральной кластеризацией белка полосы 3, тогда как при детергентном лизисе разрушается липидный бислой мембраны [14]. В работе использовали анионный детергент ДСН (додецил-сульфат натрия), который в отличие от осмотического лизиса не вызывал ассоциативных изменений белка полосы 3 при действии на мембрану. Экстракция белков из мембран ДСН происходит до разрушения бислоя [5], при этом ДСН экстрагирует

Under erythrocyte osmotic lysis the hemolytic pore formation is accompanied with band 3 protein lateral clusterisation, meanwhile membrane lipid bilayer is destroyed during detergent lysis [14]. In research we used the anion detergent SDS (sodium dodecyl sulphate), that, in contrast to osmotic lysis, when affecting membrane caused no associative changes in band 3 protein. Protein extraction from SDS membranes occurs before bilayer destruction [5], SDS thereby extracting a greater number of proteins from membrane, than non-ionic detergents [10]. Of note is

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) 373-41-35, 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 4135XX, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

большее количество белков из мембраны, чем неионные детергенты [10]. Важно отметить, что при получении из мембран эритроцитов белка полосы 3 с использованием тритон X-100 сохраняются транспортные свойства белка после включения в липосомы [8]. Таким образом, установлены существенные различия в действии ионных и неионных детергентов на мембранные белки. Белок полосы 3 высоко структурирован и пронизывает мембрану до 14 раз, образуя α -спиральные гидрофобные участки [3], объединенные гидрофильными внутри- и внеклеточными поверхностными петлями [4], одна из которых связана с углеводной компонентой и является антигенным детерминантом [11]. Остальные петли выполняют неопределенные функции [3, 4]. В мембране белок полосы 3 существует в димерных и тетрамерных формах [12]. Диссоциация тетрамеров на димеры при связывании ДИДС (4,4-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфат динатриевой соль) приводит к увеличению площади гидрофобного контакта белка полосы 3 с липидами, что практически не влияет на деформацию и стабильность мембраны [16].

Учитывая приведенные факты, можно исследовать влияние модификации гидрофобных взаимодействий белка полосы 3 в мембране на гемолитическое действие детергентов в присутствии различных криопротекторов.

Цель работы – исследование влияния модификатора белка полосы 3 ДИДС и криопротекторов на чувствительность эритроцитов к действию ионных и неионных детергентов.

Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х.ч.), сахарозу (ч.д.а.), полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 1500 (Merck) и декстран с молекулярной массой 10000 (Serva), ДИДС (Sigma) детергенты: ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромид), (Sigma), ДСН (Sigma); тритон X-100 (Serva); твин-20 (Ferak).

Эритроциты человека получали из донорской крови при четырехкратном отмывании раствором, содержащим 0,15 М NaCl, 10 мМ трис, рН 7,4. Растворы криопротекторов в концентрации 15% готовили на среде для отмывания клеток.

Эритроциты подвергали действию детергентов при температуре $17 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. Концентрация клеток в экспериментальных средах (1 мл) составляла 0,35%. Оставшиеся клетки осаждали центрифугированием в течение 3-х минут при 3000 об/мин.

Раствор ДИДС в концентрации 4 ммоль/л готовили на дистиллированной воде и вносили за 2 мин до добавления детергентов в экспериментальную среду с конечной концентрацией 20 мкмоль/л.

the fact that when obtaining the band 3 protein from erythrocytes membranes with Triton X-100 use the protein transport properties are kept after inclusion into liposomes [8]. Thus, the significant differences in ionic and non-ionic detergent effects on membrane proteins were established. Band 3 protein is highly structured and penetrates membranes up to 14 times by forming α -spiral hydrophobic sites [3], united by hydrophilic intra- and extracellular surface loops [4], one of which is related to hydrocarbon component and is an antigen determinant [11]. The rest loops accomplish uncertain functions [3, 4]. Band 3 protein exists in membrane in dimeric and tetrameric forms [12]. Tetramer dissociation into dimers during DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid) binding results in an increase in hydrophobic contact area of band 3 protein with lipids, that does not practically affect the membrane deformation and stability [16].

Taking into account the mentioned facts the effect of modifications in band 3 protein hydrophobic interactions in a membrane on hemolytic effect of detergents at the presence of different cryoprotectants may be under study.

The research was aimed to investigate the effect of band 3 protein modifier DIDS and cryoprotectants on erythrocyte sensitivity to the effect of ionic and non-ionic detergents.

Materials and methods

NaCl (chemically pure grade), sucrose (chemically pure for analysis grade), polyethylene glycol (PEG) with 1500 molecular mass (Merck) and dextran with 10000 molecular mass (Serva); DIDS (Sigma), detergents: cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Sigma); SDS (sigma); Triton X-100 (Serva); Tween 20 (Ferak) have been used in the research.

Human erythrocytes were procured from donor blood with a fourfold washing-out with solution, containing 0.15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4. Cryoprotectant solutions of 15% concentration were prepared with medium for cell washing-out.

Erythrocytes were undergone the detergent effect at $17 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 min. Cell concentration in experimental media (1 ml) was 0.35%. The rest cells were precipitated with 3 min centrifugation at 3000 rot/min.

DIDS solution in 4 mmol/l concentration was prepared with distilled water and introduced 2 min before detergent adding into experimental medium with 20 $\mu\text{mol/l}$ final concentration.

Erythrocyte hemolysis (%) was determined after spectrophotometric analysis of optical density of supernatant liquid at 543 nm wavelength: Hemolysis = $[A1/A2] \times 100$, where A1 is optical density of supernatant liquid of experimental sample; A2 is an optical density at a complete hemolysis of control sample.

The results are presented as mean \pm standard deviation. The Mann-Whitney's non-parametric

Гемолиз эритроцитов (%) определяли после спектрофотометрического анализа оптической плотности надосадочной жидкости при длине волны 543 нм: Гемолиз = $[A1/A2] \times 100$, где A1 – оптическая плотность надосадочной жидкости экспериментального образца; A2 – оптическая плотность при полном гемолизе контрольного образца.

Результаты представлены как среднее значение \pm среднее квадратическое отклонение. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $P < 0,05$ ($n=5$).

Результаты и обсуждение

При исследовании лизиса под воздействием катионного детергента ЦТАБ установлено, что сахароза, декстран или ПЭГ существенно снижают чувствительность клеток к детергенту, а ингибитор анионного канала ДИДС повышает чувствительность эритроцитов к действию ЦТАБ независимо от состава среды (рис. 1). В результате использования анионного детергента ДСН установлено, что сахароза и ПЭГ подавляют гемолиз эритроцитов, а гемолиз, вызванный ДСН, усиливается в присутствии ДИДС в солевой среде (рис. 2). Однако в средах с указанными неэлектролитами ингибитор анионного канала слабо влияет на гемолиз. Лизис с ДСН, по сравнению с ЦТАБ, меньше усиливается в присутствии ДИДС, что, возможно, обусловлено отрицательным зарядом ДСН. В данном случае ДИДС как отрицательно заряженная молекула нейтрализует при связывании положительные заряды у входа в анионный канал, тем самым уменьшая положительный заряд белка полосы 3. В связи с этим можно предположить, что концентрация ДСН у поверхности мембраны в присутствии ДИДС понизится, а в присутствии ЦТАБ – повысится.

В нашей работе исследовано действие неионных детергентов твин-20 и тритон X-100, которые относятся к ряду полиоксиэтилен – производных детергентов [7]. При использовании твин-20 установлено, что сахароза и декстран, по сравнению с ПЭГ, незначительно влияют на чувствительность клеток к детергенту. Присутствие в среде ингибитора анионного канала ДИДС снижает чувствительность клеток к лизису с твин-20 независимо от состава среды. По сравнению с твин-20 (рис. 3) лизис с тритон X-100 существенно не изменяется в присутствии ДИДС (рис. 4). Наличие в среде сахарозы не оказывает протектирующего действия и несколько усиливает лизис, в то же время ПЭГ значительно блокирует действие тритон X-100 (рис. 4) и твин-20 (см. рис. 3). Возможно, что такое действие ПЭГ на лизис эритроцитов с тритон X-100 связано с уменьше-

method at $P < 0.05$ ($n=5$) was used to determine a statistical significance of the results.

Results and discussion

When investigating lysis under CTAB cation detergent effect the sucrose, dextran or PEG were established as significantly decreasing cell sensitivity to detergent, but the anion channel inhibitor DIDS increases the erythrocyte sensitivity to CTAB effect independently on medium composition (Fig. 1). As a result of SDS anion detergent use the sucrose and PEG were established as suppressing erythrocyte hemolysis, but SDS-caused hemolysis strengthened at DIDS presence in saline medium (Fig. 2). However in the media with the mentioned non-electrolytes the anion channel inhibitor slightly affects hemolysis. The lysis with SDS compared to CTAB strengthens in a less extent in DIDS presence, that is possibly stipulated with DSD negative charge. In this case DIDS as a negatively charged molecule neutralises the positive charges at the entry into anion channel during binding, thereby reducing positive charge of band 3 protein. Due to this fact we may assume that SDS concentration will decrease near membrane surface at DIDS presence but will increase in CTAB one.

In our research we have investigated the effect of Tween 20 and Triton X-100 non-ionic detergents, referred to the polyoxyethylene-derivative detergent series [7]. When using Tween 20 the sucrose and dextran were established as slightly affecting cell sensitivity to detergent compared to PEG. The presence of DIDS anion channel inhibitor in the medium reduces cell sensitivity to lysis with Tween 20 independently on medium composition (Fig. 3). If comparing with Tween 20 (Fig. 3) the lysis with Triton X-100 does not significantly change in DIDS presence (Fig. 4). The sucrose presence in the medium has no protective effect and slightly strengthens lysis, meanwhile PEG significantly blocks the Triton X-100 (Fig. 4) and Tween 20 effects (Fig. 3). This PEG effect on erythrocyte lysis with Triton X-100 is possibly associated to a decrease in detergent molecule number inclusion into membrane. Probably, with PEG use the detergent solubility increases, but the sucrose presence in the medium was established as reducing non-ionic and zwitterionic detergent solubility and consequently decreasing critical concentration of micelle formation (CCM) [18]. These literature data enable the assuming that the sucrose inhibiting effect on lysis with ionic detergents (see Fig. 1, 2) is stipulated with its interactions with membrane.

Thus, the direction of cryoprotectant and DIDS effects during erythrocyte lysis depends on detergent type. The lysis suppression by cryoprotectants is revealed when using ionic detergents. As a result of Tween 20 effect the cryoprotectants insignificantly

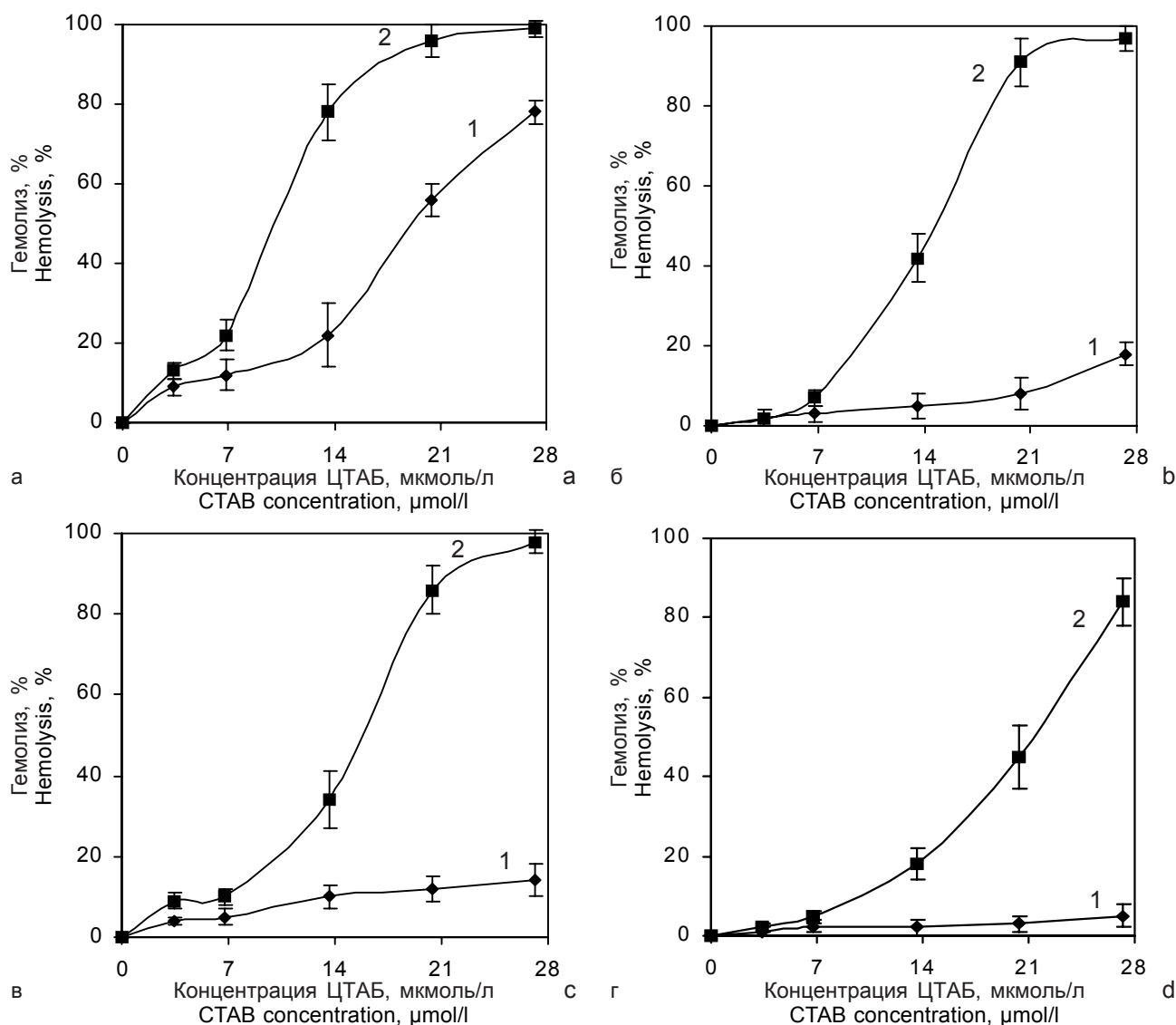


Рис. 1. Влияние криопротекторов на чувствительность эритроцитов к действию ЦТАБ в присутствии ДИДС в средах: а) 0,15 М NaCl+10 мМ трис (рН 7,4); б) 0,15 М NaCl+10 мМ трис (рН 7,4) + 15% сахарозы; в) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4) + 15% декстрана; г) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4) + 15% ПЭГ-1500; 1 – контроль; 2 – ДИДС (20 мкМ).

Fig. 1. Cryoprotectant effect on erythrocyte sensitivity to CTAB in DIDS presence in the media: а) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4); б) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% sucrose; в) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% dextran; г) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% PEG-1500; 1 – control; 2 – DIDS (20 μM).

нием включения количества молекул детергента в мембрану. Вероятно, при использовании ПЭГ повышается растворимость детергентов, однако установлено, что присутствие в среде сахарозы снижает растворимость неионных и цвиттерионных детергентов и соответственно уменьшает критические концентрации мицеллообразования (ККМ) [18]. Эти данные литературы позволяют предположить, что ингибирующее действие сахарозы на лизис с ионными детергентами (см. рис. 1, 2) обусловлено её взаимодействием с мембраной.

Таким образом, направленность действия криопротекторов и ДИДС при лизисе эритроцитов зависит от вида детергента. При использовании ионных детергентов выявляется подавление лизиса криопротекторами. В результате действия твин-

reduce lysis with this non-ionic detergent. DIDS presence in the medium eliminates an inhibiting effect of cryoprotectants on CTAB, but not SDS. When using Tween 20 DIDS manifests an inhibiting effect on lysis independently on medium composition, but at Triton X-100 presence its effect is insignificant.

There are known two models of membrane solubilisation and fragmentation with detergents. The first one is a cooperative binding of detergent molecules with membrane at following transfer inside a cell and binding with internal monolayer; the second one is lipid extraction from external membrane monolayer by a direct transfer into detergent micelles [7]. In both cases the membranes are fragmented with forming mixed vesicles, containing detergent and lipid molecules or detergent and proteins ones [7].

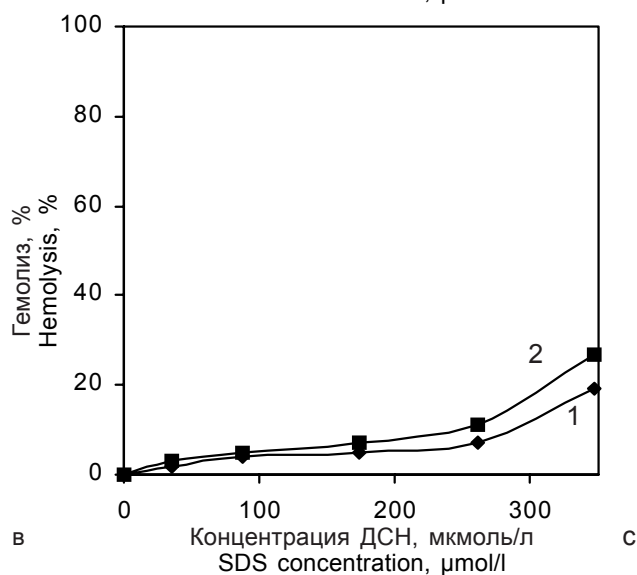
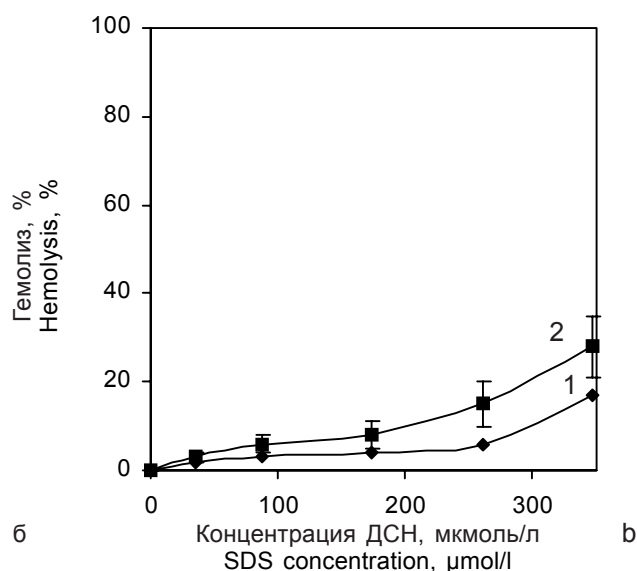
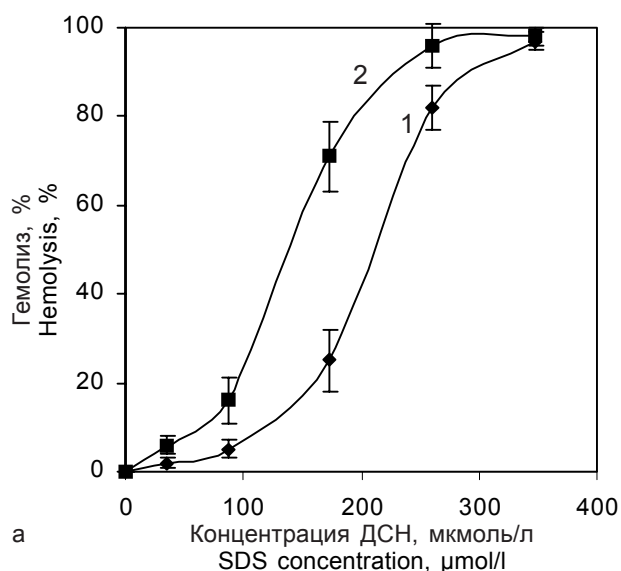


Рис. 2. Влияние криопротекторов на чувствительность эритроцитов к действию ДСН в присутствии ДИДС в средах: а) 0,15 М NaCl+10 мМ трис (рН 7,4); б) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4) + 15% сахарозы; в) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН7,4) + 15% ПЭГ-1500; 1 – контроль; 2 – ДИДС (20 мкМ).

Fig. 2. Cryoprotectant effect on erythrocyte sensitivity to SDS at DIDS presence in the media: а) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4); б) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% sucrose; в) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% PEG-1500; 1 – control; 2 – DIDS (20 μM).

20 криопротекторы незначительно уменьшают лизис с данным неионным детергентом. Присутствие в среде ДИДС устраняет ингибирующее действие криопротекторов на ЦТАБ, но не ДСН. При использовании твин-20 ДИДС выявляет ингибирующее действие на лизис независимо от состава среды, а в присутствии тритон-Х-100 он влияет незначительно.

Известны две модели сольubilизации и фрагментации мембран детергентами: первая – кооперативное связывание молекул детергентов с мембраной при последующем переносе внутрь клетки и связывании с внутренним монослоем; вторая – экстракция липидов из внешнего монослоя мембраны прямым переносом в детергентные мицеллы [7]. В обоих случаях мембраны фрагментируются с образованием смешанных везикул, содержащих молекулы детергентов и липидов или детергентов и белков [7].

Существует мнение, что лизофосфатидилхолин (ЛФХ) проявляет свое литическое действие в

There is an opinion, that lysophosphatidyl-choline (LPC) manifests its lytic effect in monomer form [1], but LPC monomers cause no hemolysis when including into erythrocyte membrane, since it is possible under LPC concentration higher than CCM [15]. Lipid membrane solubilisation with SDS and Tween 20 was established as realising via detergent micelle forms [7]. Under 0.015% Triton 100 concentration, corresponding to CCM, the protein extraction and membrane lipid bilayer liquefaction occur, herewith the detergent does not change the polarity of membrane hydrophobic areas [20]. Lipid bilayer destruction into mixed micelles with dividing lipids and proteins begins after Triton X-100 monomer inclusion into membranes [9]. The maximum binding of Triton X-100 with Ca²⁺-ATPase in membranes is noted under detergent concentrations lower than CCM, that indicates a non-micelle mechanism of detergent interaction with proteins [6]. Tween 20 and Triton X-100 were shown to solubilise less proteins from erythrocyte ghosts than SDS [10]. Non-ionic detergents in concentrations lower than CCM mostly interact with Ca²⁺-ATPase-containing membrane lipid components, meanwhile SDS extracts the Ca²⁺-ATPase prior to lipid solubilisation. Non-ionic detergents when passing to a cooperative binding induce the small unilamellar liposome fusion with forming large vesicles before solubilisation. The solubilisation of Ca²⁺-ATPase-containing membranes is mostly accompanied with membrane fragmentation and aggregation of its

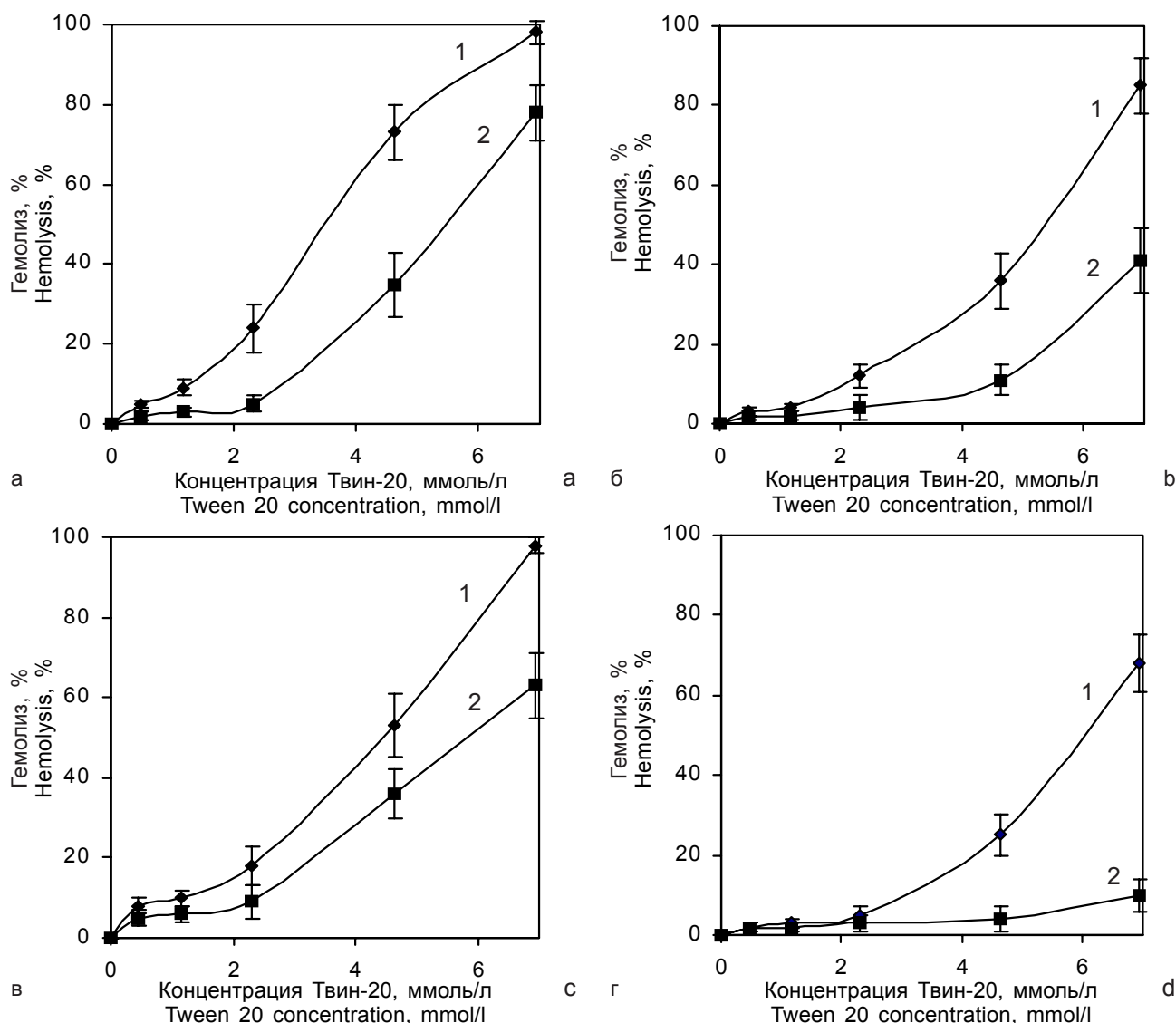


Рис. 3. Влияние криопротекторов на чувствительность эритроцитов к действию твин-20 в присутствии ДИДС в средах: а) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4); б) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4) + 15% сахарозы; в) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4) + 15% декстрана; г) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (рН 7,4) + 15% ПЭГ-1500; 1 – контроль, 2 – ДИДС (20 мкМ).

Fig. 3. Cryoprotectant effect on erythrocyte sensitivity to Tween 20 in DIDS presence in the media: а) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4); б) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% sucrose; в) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% dextran; д) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% PEG-1500; 1 – control; 2 – DIDS (20 μM).

мономерной форме [1], однако мономеры ЛФХ, включаясь в мембрану эритроцитов, не вызывают гемолиз, поскольку он возможен при концентрации ЛФХ выше ККМ [15]. Установлено, что солюбилизация липидов мембран с ДСН и твин-20 осуществляется посредством мицеллярных форм детергентов [7]. При концентрации тритон X-100 0,015%, которая соответствует ККМ, происходят экстракция белков и разжижение липидного бислоя мембраны, при этом детергент не изменяет полярность гидрофобных областей мембраны [20]. Разрушение липидного бислоя в смешанные мицеллы с разделением липидов и белков начинается после включения в мембраны мономеров тритон X-100 [9]. Максимальное связывание в

components, than vesicle fusion. At the same time the SDS slowly destroys the liposome membranes without any fusion [5].

Thus, during membrane solubilisation and membrane protein extraction the non-ionic detergents may act in monomer and micelle forms. The SDS ionic detergent solubilises membrane lipids in micelle form, but protein extraction from membranes occurs before lipid bilayer destruction. In addition, SDS extracts more proteins from membranes, than Triton X-100 and Tween 20.

Taking into account a difference in action mechanisms of ionic and non-ionic detergents, as well as structural changes in membrane and anion channel during DIDS binding, we may assume the following, since

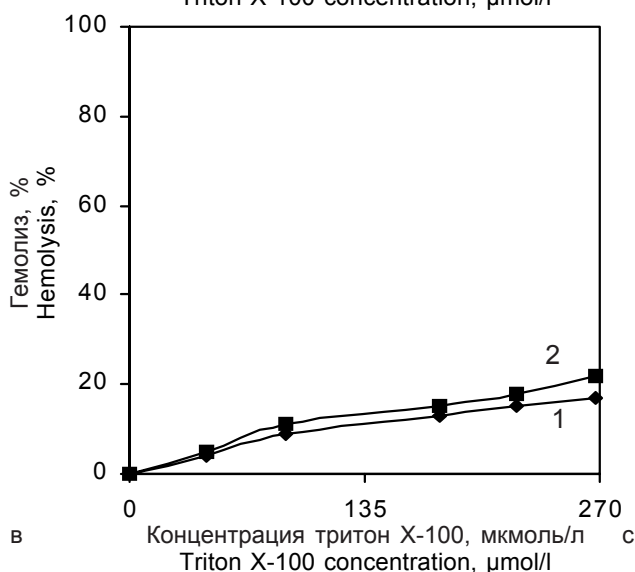
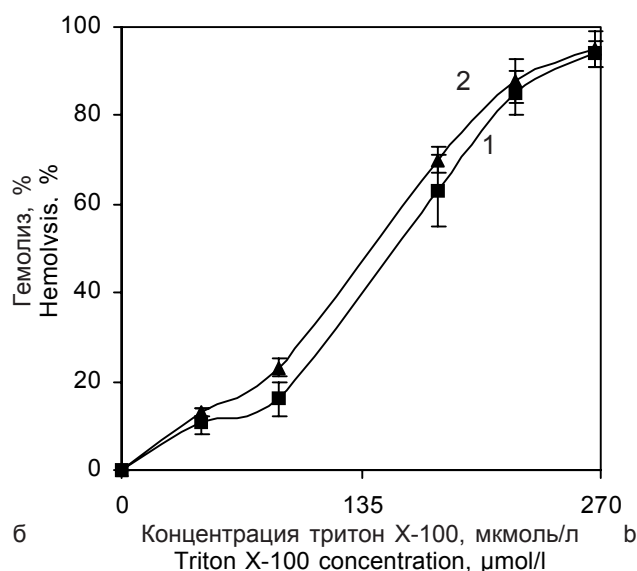
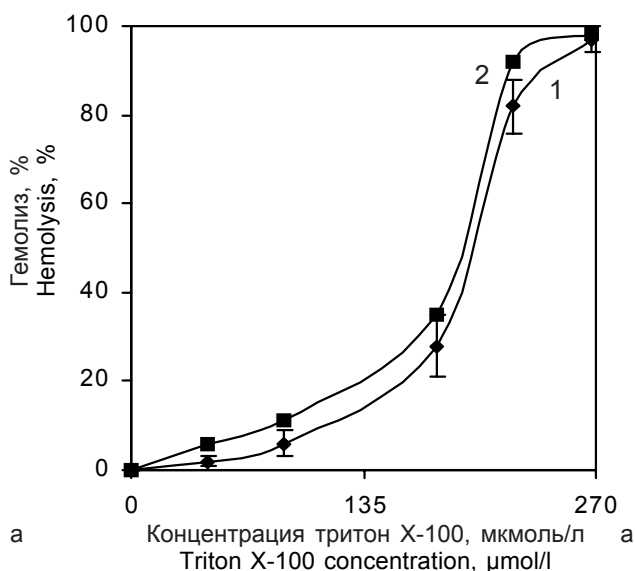


Рис. 4. Чувствительность эритроцитов к действию тритон X-100 в средах: а) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (pH 7,4); б) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (pH 7,4) + 15% сахарозы; в) 0,15 М NaCl + 10 мМ трис (pH 7,4) + 15% ПЭГ-1500; 1 – контроль; 2 – ДИДС (20 мкМ).

Fig. 4. Erythrocyte sensitivity to Triton X-100 effect in the media: a) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4); b) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% sucrose; c) 0.15 M NaCl + 10 mM Tris (pH 7.4) + 15% PEG-1500; 1 – control; 2 – DIDS (20 µM).

мембранах тритон X-100 с Ca²⁺-АТФазой отмечается при концентрациях детергента ниже ККМ, что указывает на немицеллярный механизм взаимодействия детергента с белками [6]. Показано, что твин-20 и тритон-X-100 сольбилизируют из теней эритроцитов меньшее количество белков, чем ДСН [10]. Неионные детергенты в концентрациях, которые ниже их ККМ, преимущественно взаимодействуют с липидными компонентами мембран, содержащих Ca²⁺-АТФазу, тогда как ДСН экстрагирует Ca²⁺-АТФазу перед сольбилизацией липидов. Неионные детергенты при переходе к кооперативному связыванию индуцируют слияние маленьких униламеллярных липосом с образованием больших везикул перед сольбилизацией. Сольбилизация мембран, содержащих Ca²⁺-АТФазу, сопровождается в большей степени фрагментацией мембран и агрегацией её компонентов, чем слиянием везикул. При этом ДСН медленно разрушает липосомальные мембраны, не вызывая их слияния [5].

DIDS causes the band 3 protein tetramer dissociation into dimers [17] when binding with erythrocyte membranes, it contributes to the ionic detergent effect, which solubilises membrane proteins [10]. With augmentation of the protein-lipid contact area [16] the effect of non-ionic detergent on membrane is weakened. Since DIDS strengthens the effect of ionic detergent not only in isotonic medium, but in cryoprotectant-containing ones as well, herewith the lysis suppression by cryoprotectants (see Fig. 1), we may assume that the latter stabilises the band 3 protein tetramer forms to CTAB effect, that insignificantly affects the Tween 20 non-ionic detergent effect. In last case DIDS in contrast weakens a lytic effect (see Fig. 3). According to the results obtained we may assume the following. When stabilising band 3 protein tetramer forms with cryoprotectants, there is not permanent increase in erythrocyte resistance to the effects, resulting in a change of hydrophobic interactions in membrane. Owing this of note is the fact that during band 3 protein tetramer disintegration into dimers under DIDS binding there is an increase in hydrophobic contact area of this protein and lipids in a membrane [16]. In one case this stabilises cells (see Fig. 3), in another one it destabilises them (see Fig. 1). However the mechanism of a protective effect in cryoprotectants is not associated to their direct contact with proteins. With temperature decrease there are a change in hydrophilic-hydrophobic balance of cryoprotectants and their

Таким образом, при солюбилизации мембран и экстракции мембранных белков неионные детергенты могут действовать в мономерных и мицеллярных формах. Ионный детергент ДСН солюбилизирует липиды мембран в мицеллярной форме, однако экстракция белков из мембран происходит перед разрушением липидного бислоя. Кроме того, ДСН экстрагирует из мембран больше белков, чем тритон X-100 и твин-20.

Учитывая различие механизмов действия ионных и неионных детергентов, а также структурные изменения в мембране и анионном канале при связывании ДИДС, можно предположить следующее. Поскольку при связывании с мембранами эритроцитов ДИДС вызывает диссоциацию тетрамеров белка полосы 3 на димеры [17], он способствует действию ионного детергента, который солюбилизирует мембранные белки [10]. При увеличении площади контактов белок-липид [16] действие неионного детергента на мембрану ослабляется. Поскольку ДИДС усиливает эффект ионного детергента не только в изотонической среде, но и в средах, содержащих криопротекторы, при этом криопротекторы подавляют лизис (см. рис. 1), то можно предположить, что последние стабилизируют тетрамерные формы белка полосы 3 к действию ЦТАБ, а это существенно не влияет на действие неионного детергента твин-20. В последнем случае ДИДС напротив ослабляет литическое действие (см. рис. 3). По полученным результатам можно сделать предположение. При стабилизации криопротекторами тетрамерных форм белка полосы 3 не всегда повышается устойчивость эритроцитов к воздействиям, которые приводят к изменению гидрофобных взаимодействий в мембранах. В связи с этим следует отметить, что при распаде тетрамеров белка полосы 3 на димеры при связывании ДИДС увеличивается площадь гидрофобного контакта данного белка и липидов в мембране [16]. В одном случае это стабилизирует клетки (см. рис. 3), в другом – дестабилизирует (см. рис. 1). Однако механизм защитного действия криопротекторов не связан с их прямым контактом с белками. При снижении температуры изменяется гидрофильно-гидрофобный баланс криопротекторов и происходит их отделение от белковых доменов, что способствует поддержанию белка в нативном состоянии [2].

Отсутствие влияния ДИДС на лизис тритон X-100, по сравнению с твин-20, свидетельствует о том, что солюбилизация мембраны с тритон X-100 не зависит от агрегатного состояния белка полосы 3. Различие действия ДИДС на лизис тритон X-100 и твин-20 обусловлено их действующими концентрациями (см. рис. 3, 4). Влияние тритон X-100 проявляется при концентрациях ниже ККМ

exclusion from protein domains, contributing for protein maintenance in native state [2].

No DIDS effect on Triton X-100 lysis, compared to Tween 20 testifies to the fact that the membrane solubilisation with Triton X-100 does not depend on the band 3 protein aggregate state. Difference in DIDS effect on Triton X-100 and Tween 20 lysis is stipulated by their current concentrations (see Fig. 3, 4). Triton X-100 and Tween 20 effects are manifested under concentrations lower (250 mmol/l) and higher (50 mmol/l) than CCM, correspondingly (see Fig. 3, 4) [7]. During membrane solubilisation the protein state is known as dependent on molecular or micelle form of acting detergent. If the lipid solubilisation occurs under detergent concentration lower than its CCM, the isolated membrane proteins may preserve their enzyme or transport properties [19]. Therefore during lysis with Triton X-100 the band 3 protein as a part of formed vesicles with this detergent will stay in a native state.

Triton X-100 is the detergent, used for band 3 protein isolation from erythrocyte membranes with the aim of transport function preservation [8]. These data correlate well with the absence of DIDS effect on lysis with Triton X-100 (see Fig. 4). This detergent effect in molecular form is directed to lipid bilayer destruction, therefore during DIDS binding with it the change in aggregate state of band 3 protein does not significantly affect the erythrocyte lysis curve (see Fig. 4). Of note is that the elimination of DIDS effect when passing from Tween 20 (see Fig. 3) to Triton X-100 (see Fig. 4) the sucrose protective effect is lost.

When analysing the results obtained we may conclude the following. Since sucrose does not manifest its protective property in case of lipid matrix solubilisation under lysis with Triton X-100, its effect will be directed to membrane protein components. If passing from Tween 20 (see Fig. 3) to Triton X-100 (see Fig. 4) PEG preserves its action, its effect should be determined not only by the influence on membrane protein state, but lipid bilayer as well. The results obtained are stipulated by the fact that Triton X-100 is the most optimal detergent for isolating band 3 proteins from erythrocyte membrane [8]. Thus, the erythrocyte lysis under Tween 20 and Triton X-100 effects depends on aggregate state of band 3 protein and lipid matrix state, correspondingly.

The results obtained shown a differently directed DIDS effect as the band 3 protein aggregate state modifier on lysis with detergents dependently on the mechanism of their effect. The experimental data confirm a different action mechanism of ionic and non-ionic detergents. Structural state of band 3 protein determines cell sensitivity to detergent and cryoprotectant effects, since a change in aggregate state of this membrane protein eliminates a protective effect

(250 мкмоль/л), тогда как твин-20 – при концентрациях выше ККМ (50 мкмоль/л) (см. рис. 3, 4) [7]. Известно, что при солюбилизации мембран состояние белков зависит от молекулярной или мицеллярной формы действующего детергента. Если солюбилизация липидов происходит при концентрации детергента ниже его ККМ, то выделяемые мембранные белки могут сохранять свои энзиматические или транспортные свойства [19]. Поэтому при лизисе с тритон X-100 белок полосы 3 в составе образующихся везикул с данным детергентом будет оставаться в нативном состоянии.

Тритон X-100 является детергентом, который используется для выделения из мембран эритроцитов белка полосы 3 с целью сохранения транспортной функции [8]. Такие данные хорошо согласуются с отсутствием эффекта ДИДС на лизис с тритон X-100 (см. рис. 4). Действие этого детергента в молекулярной форме направлено на разрушение липидного бислоя, поэтому при связывании с ним ДИДС изменение агрегатного состояния белка полосы 3 существенно не влияет на кривую лизиса эритроцитов (см. рис. 4). Важно отметить, что устранение эффекта ДИДС при переходе от твин-20 (см. рис. 3) к тритон X-100 (см. рис. 4) защитное действие сахарозы утрачивается.

На основе анализа полученных результатов можно сделать следующие выводы. Поскольку сахароза не выявляет свое защитное свойство в случае солюбилизации липидного матрикса при лизисе с тритон X-100, то ее эффект будет направлен на белковые компоненты мембраны. Если при переходе от твин-20 (см. рис. 3) к тритон X-100 (см. рис. 4) ПЭГ сохраняет свое действие, то его эффект должен определяться не только влиянием на состояние мембранных белков, но и на липидный бислой. Полученные результаты обусловлены тем, что тритон X-100 является наиболее оптимальным детергентом для выделения из мембран эритроцитов белка полосы 3 [8]. Таким образом, лизис эритроцитов при действии твин-20 зависит от агрегатного состояния белка полосы 3, а при действии тритон X-100 – от состояния липидного матрикса.

Полученные результаты показали разнонаправленное действие ДИДС как модификатора агрегатного состояния белка полосы 3 на лизис с детергентами в зависимости от механизма их действия. Экспериментальные данные подтверждают различный механизм действия ионных и неионных детергентов. Структурное состояние белка полосы 3 определяет чувствительность клеток к действию детергентов и криопротекторов, поскольку изменение агрегатного состояния данного мембранного белка устраняет протекти-

of cryoprotectants during lysis with ionic detergent (see Fig. 1). The similar experiments with non-ionic detergent correlate well with DIDS effect on anion channel aggregate state. In this case the cryoprotectants slightly block detergent lysis (see Fig. 3).

Mechanisms of hemolytic pore formation under osmotic and detergent lysis are shown as different [14]. Using CD-spectroscopy no SDS effect (at 0–250 $\mu\text{mol/l}$ concentration) on erythrocyte ghost membrane proteins was revealed, but an increase in lipid bilayer hydrophobic fluidity was noted [14]. Under osmotic lysis no change in membrane fluidity was established, but conformational and/or associative protein changes were revealed. At the same time the band 3 protein modifiers were demonstrated as increasing the erythrocyte osmotic fragility [14]. Basing on the results obtained we assumed that under osmotic and detergent lysis there were occurred the associative changes in band 3 proteins and membrane lipid bilayer destruction, correspondingly [14]. According to the closed erythrocyte ghosts, labelled with eosin maleimide and placed under hypertonic conditions a two-phase change in fluorescence intensity due to the band 3 protein lateral clusterisation was revealed. This two-phase intensity change testified to the hemolytic pore formation with following its closing and lateral distribution of band 3 protein inside membrane. After the band 3 protein cytoplasmic domain splitting with trypsin or SH-group blocking in it with N-ethylmaleimide the fluorescence intensity remained unchanged. Consequently, the association and dissociation of band 3 protein under hypotonic medium are controlled with cytoplasmic domains. The revealed growth and fall in eosin maleimide fluorescence intensity as a part of erythrocyte ghost under hypotonic conditions are well explained with a sequence of hemolysis mechanism response: increase in cell volume; band 3 protein clusterization; hemolytic pore formation and its closing, accompanied with band 3 protein redistribution [13].

In the papers [13, 14] the effect of band 3 protein modifiers was not under study, but their usage is indispensable for more complete study of detergent lysis mechanism. The results obtained enable assuming that the erythrocyte sensitivity to detergents and protecting effect of cryoprotectants determine an aggregate state of band 3 protein.

Conclusions

1. Cryoprotectants (sucrose, dextran, PEG-1500) significantly suppress the erythrocyte lysis under ionic detergent (CTAB, SDS) effect. DIDS presence in the medium increases cell sensitivity to detergents in isotonic medium and eliminates protective properties of cryoprotectants to CTAB effect.

рующее действие криопротекторов при лизисе с ионным детергентом (см. рис. 1). Подобные эксперименты с неионным детергентом вполне согласуются с действием ДИДС на агрегатное состояние анионного канала. В данном случае криопротекторы незначительно блокируют детергентный лизис (см. рис. 3).

Показано, что механизмы образования гемолитической поры при осмотическом и детергентном лизисе различны [14]. С помощью КД-спектроскопии эффект ДСН (при концентрации 0–250 мкмоль/л) на мембранные белки теней эритроцитов не выявлен, однако отмечено повышение текучести гидрофобной области липидного бислоя [14]. При осмотическом лизисе изменение текучести мембраны не установлено, но отмечены конформационные и/или ассоциативные изменения белков. При этом показано, что модификаторы белка полосы 3 повышают осмотическую хрупкость эритроцитов [14]. На основе полученных результатов было сделано предположение, что при осмотическом лизисе происходят ассоциативные изменения белка полосы 3, а при детергентном лизисе – разрушение липидного бислоя мембраны [14]. По замкнутым теням эритроцитов, меченных эозинмалеимидом и помещенных в гипотонические условия, выявлено двухфазное изменение интенсивности флуоресценции вследствие латеральной кластеризации белка полосы 3. Это двухфазное изменение интенсивности свидетельствовало о формировании гемолитической поры с последующим ее замыканием и латеральным распределением белка полосы 3 внутри мембраны. После расщепления цитоплазматического домена белка полосы 3 трипсином или блокирования SH-группы в нем N-этилмалеимидом интенсивность флуоресценции не изменялась. Следовательно, ассоциацию и диссоциацию белка полосы 3 в гипотонической среде контролируют цитоплазматические домены. Выявленный рост и падение интенсивности флуоресценции эозинмалеимида в составе теней эритроцитов в гипотонических условиях хорошо объясняет последовательность реакций механизма гемолиза: увеличение объема клетки; кластеризация белка полосы 3; образование гемолитической поры и ее замыкание, которое сопровождается перераспределением белка полосы 3 [13].

В работах [13, 14] не было исследовано влияние модификаторов белка полосы 3, но их использование необходимо для более полного изучения механизма детергентного лизиса. Полученные результаты позволяют предположить, что чувствительность эритроцитов к детергентам и протектирующее действие криопротекторов определяются агрегатным состоянием белка полосы 3.

2. Erythrocyte lysis under Tween 20 non-ionic detergent effect is slightly suppressed by sucrose and dextran, but inhibited by PEG-1500. DIDS presence in the medium reduces the cell sensitivity to this lytic agent not only in isotonic medium, but cryoprotectant-containing ones as well.

3. Erythrocyte lysis under Triton X-100 effect is considerably suppressed with PEG-1500, but slightly strengthened with sucrose. DIDS presence in the media does not practically affect the lysis with this detergent.

References

1. Ivkov V.G., Berestovsky G.N. Dynamic structure of lipid bilayer.– Moscow: Nauka, 1981.– 294 p.
2. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // *Cryobiology*.–1990.– Vol. 27, N4.– P. 401-415.
3. Fuginaga J., Tang X.B., Casey G.R. Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1 // *J. Biol. Chem.*–1999.– Vol. 274, N10.– P. 6626-6633.
4. Hamasaki N., Kuma H., Ota K. et al. A new concept in polytopic membrane proteins following from the study of band 3 protein // *Biochem. Cell. Biol.*– 1998.– Vol. 76, N5.– P. 729-733.
5. Kragh-Hansen U., le Maire M., Moller J.V. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes // *Biophys. J.*– 1998.– Vol. 75, N6.– P. 2932-2946.
6. Le Maire M., Kwee S., Andersen J.P., Moller J.V. Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins // *Eur. J. Biochem.*–1983.– Vol. 129, N3.– P. 525-532.
7. Le Maire M., Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1508.– P. 86-111.
8. Lukacovic M.F., Feinstein M.B., Shaafi R.I., Perrie S. Purification of stabilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane and its reconstitution into liposomes // *Biochemistry*.– 1981.– Vol. 20.– P. 3145-3151.
9. Macarulla J.M., Alonso A., Arrondo J.L. et al. Membrane solubilization by the non-ionic detergent triton X-100. A comparative study including model and cell membranes // *Rev. Exp. Fisiol.*– 1989.– Vol. 45.– P. 1-8.
10. Matson R.S., Goheen S.C. Use of high-performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilization of human erythrocyte ghosts // *J. Chromatogr.*– 1986.– Vol. 359.– P. 285-295.
11. Popov M., Tam L.Y., Li J., Reithmeier R.A. Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein/ Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3 // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol. 272, N29.– P. 18325-18332.
12. Sarabia V.E., Casey J.R., Reithmeier R.A. Molecular characterization of the band 3 protein from Southeast Asian ovalocytes // *J. Biol. Chem.*– 1993.– Vol. 268, N14.– P. 10676-10680.
13. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*–1993.– Vol. 16, N5.– P. 506-512.
14. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y. Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*– 1993.– Vol. 16, N2.– P. 188-194.
15. Utsumi H., Inoue K., Nojima S., Kwan T. Interaction of spin-labeled lysophosphatidyl-choline with rabbit erythrocytes // *Biochemistry*.– 1978.– Vol. 17, N10.– P. 1990-1996.
16. Van Dort H.M., Knowless D.W., Chasis J.A. et al. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability

Выводы

1. Криопротекторы (сахароза, декстран, ПЭГ-1500) значительно подавляют лизис эритроцитов под воздействием ионных детергентов (ЦТАБ, ДСН). Присутствие в среде ДИДС вызывает повышение чувствительности клеток к детергентам в изотонической среде и устраняет защитные свойства криопротекторов к действию ЦТАБ.

2. Лизис эритроцитов под воздействием неионного детергента твин-20 несущественно подавляется сахарозой и декстраном, но ингибируется ПЭГ-1500. Присутствие в среде ДИДС вызывает снижение чувствительности клеток к действию данного литического агента не только в изотонической среде, но и в средах, содержащих криопротекторы.

3. Лизис эритроцитов под действием тритон X-100 существенно подавляется ПЭГ-1500, но несколько усиливается сахарозой. Присутствие в средах ДИДС практически не влияет на лизис с данным детергентом.

- and stability of the human erythrocyte membrane // *J. Biol. Chem.*— 2001.— Vol. 276, N50.— P. 46968-46974.
17. *Van Dort H.M., Moriyama R., Low P.S.* Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles // *J. Biol. Chem.*— 1998.— Vol. 273, N24.— P. 14819-14826.
 18. *Walter A., Kuehl G., Barnes K., Vander Waerd G.* The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2000.— Vol. 1508, N1-2.— P. 20-33.
 19. *Womack M.D., Kendall D.A., Macdonald R.C.* Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1983.— Vol. 733.— P. 210-215.
 20. *Yegutkin G.G.* Effect of increasing concentrations of nonionic detergent Triton X-100 on solubilization and structure of rat liver and adipose plasma membranes // *Membr. Cell. Biol.*— 1997.— Vol. 10, N5.— P. 515-520.

Accepted in 26.11.2007

Литература

1. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Динамическая структура липидного бислоя.— М.: Наука, 1981.— 294 с.
2. *Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H.* The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // *Cryobiology.*—1990.— Vol. 27, N4.— P. 401-415.
3. *Fuginaga J., Tang X.B., Casey G.R.* Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1 // *J. Biol. Chem.*—1999.— Vol. 274, N10.— P. 6626-6633.
4. *Hamasaki N., Kuma H., Ota K. et al.* A new concept in polytopic membrane proteins following from the study of band 3 protein // *Biochem. Cell. Biol.*— 1998.— Vol. 76, N5.— P. 729-733.
5. *Kragh-Hansen U., le Maire M., Moller J.V.* The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes // *Biophys. J.*— 1998.— Vol. 75, N6.— P. 2932-2946.
6. *Le Maire M., Kwee S., Andersen J.P., Moller J.V.* Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins // *Eur. J. Biochem.*—1983.— Vol. 129, N3.— P. 525-532.
7. *Le Maire M., Champeil P., Moller J.V.* Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2000.— Vol. 1508.— P. 86-111.
8. *Lukacovic M.F., Feinstein M.B., Shaafi R.I., Perrie S.* Purification of stabilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane and its reconstitution into liposomes // *Biochemistry.*— 1981.— Vol. 20.— P. 3145-3151.
9. *Macarulla J.M., Alonso A., Arrondo J.L. et al.* Membrane solubilization by the non-ionic detergent triton X-100. A comparative study including model and cell membranes // *Rev. Exp. Fisiol.*— 1989.— Vol. 45.— P. 1-8.
10. *Matson R.S., Goheen S.C.* Use of high-performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilization of human erythrocyte ghosts // *J. Chromatogr.*— 1986.— Vol. 359.— P. 285-295.
11. *Popov M., Tam L.Y., Li J., Reithmeier R.A.* Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein/ Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3 // *J. Biol. Chem.*— 1997.— Vol. 272, N 29.— P. 18325-18332.

12. *Sarabia V.E., Casey J.R., Reithmeier R.A.* Molecular characterization of the band 3 protein from Southeast Asian ovalocytes // *J. Biol. Chem.*— 1993.— Vol. 268, N14.— P. 10676-10680.
13. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*—1993.— Vol. 16, N5.— P. 506-512.
14. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Phar. Bull.*— 1993.— Vol. 16, N2.— P. 188-194.
15. *Utsumi H., Inoue K., Nojima S., Kwan T.* Interaction of spin-labeled lysophosphatidyl-choline with rabbit erythrocytes // *Biochemistry.*— 1978.— Vol. 17, N10.— P. 1990-1996.
16. *Van Dort H.M., Knowless 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, N50.— P. 46968-46974.
17. *Van Dort H.M., Moriyama R., Low P.S.* Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles // *J. Biol. Chem.*— 1998.— Vol. 273, N24.— P. 14819-14826.
18. *Walter A., Kuehl G., Barnes K., Vander Waerdt G.* The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2000.— Vol. 1508, N1-2.— P. 20-33.
19. *Womack M.D., Kendall D.A., Macdonald R.C.* Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1983.— Vol. 733.— P. 210-215.
20. *Yegutkin G.G.* Effect of increasing concentrations of nonionic detergent Triton X-100 on solubilization and structure of rat liver and adipose plasma membranes // *Membr. Cell. Biol.*— 1997.— Vol. 10, N5.— P. 515-520.

Поступила 26.11.2007