

Модификация белкового состава мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов под влиянием ПЭО-1500

UDC 57.043:612.111:547.42

P.M. ZUBOV*, N.G. ZEMLYANSKIKH, L.A. BABIICHUK

Modification of Protein Composition of Erythrocyte Membrane-Cytoskeletal Complex Under PEO-1500 Effect

Изучали модификации белкового состава мембрано-цитоскелетного комплекса (МЦК) эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 и температуры при контакте с растворами высокой ионной силы и варьирующим содержанием двухвалентных катионов. Установлено, что экспонирование эритроцитов в растворах криоконсерванта сопровождается увеличением относительного содержания анкирина, белков полос 4.1, 4.2, что, по-видимому, отражает усиление вертикальных связей в мембрано-цитоскелетном комплексе. Повышение уровня белков полосы 4.9 в клетках, инкубированных в присутствии криопротектора, может свидетельствовать о формировании более жесткой, чем в интактных клетках, структуры актиновых протофиламентов. Усиление белок-белковых взаимодействий в МЦК, индуцированных гипертоническими растворами ПЭО-1500, может повышать механическую прочность эритроцитов и стабилизировать их в процессе криоконсервирования. Влияние температурных условий инкубирования клеток с ПЭО-1500 на изменение белкового состава МЦК выражено слабо.

Ключевые слова: эритроциты, ПЭО-1500, мембрано-цитоскелетный комплекс

Вивчали модифікації білкового спектра мембрано-цитоскелетного комплексу (МЦК) еритроцитів під впливом криопротектора ПЕО-1500 та температури при контакті з розчинами високої іонної сили та з різним вмістом двовалентних катіонів. Встановлено, що експонування еритроцитів у розчинах криоконсерванта супроводжується збільшенням відносного вмісту анкірину, білків смуг 4.1 та 4.2, що, можливо, відображає посилення вертикальних контактів в МЦК. Підвищення білків смуги 4.9 у клітинах, інкубованих з криопротектором, може свідчити про формування більш жорсткої, ніж у інтактних клітинах, структури актинових протофіламентів. Посилення білок-білкових взаємодій в МЦК, що індуковані гіпертонічними розчинами ПЕО-1500, можуть підвищувати механічну стійкість еритроцитів та стабілізувати їх у процесі криоконсервування. Вплив температурних умов інкубування клітин з ПЕО-1500 на зміни білкового складу МЦК виражений слабо.

Ключові слова: еритроцити, ПЕО-1500, мембрано-цитоскелетний комплекс.

The research purpose was the investigation of protein composition modification in erythrocyte membrane-cytoskeleton complex (MCC) under the effects of non-penetrating cryoprotectant PEO-1500 and the temperature at the contact with high ionic strength solutions and various concentrations of bivalent cations. It was shown that erythrocyte exposure to cryoprotectant solution was accompanied by increase of related content of ankyrin, protein 4.1 and protein 4.2 that probably reflected strengthening vertical links in MCC. The increasing content of protein 4.9 in cells incubated with cryoprotectant could justify of the formation of more rigid actin protofilament structure if compared with intact cells. Strengthening protein-protein interaction in MCC induced in hypertonic PEO-1500 solution can increase erythrocyte mechanic resistance and their stability to cryopreservation. Effect of temperature conditions of erythrocyte incubation with PEO-1500 on protein composition of MCC was poorly expressed.

Key-words: erythrocytes, PEO-1500, membrane-cytoskeletal complex.

Криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭО-1500 позволяет сохранить их целостность после размораживания на высоком уровне [6]. Сохранность клеток обеспечивается изменением характера кристаллизации раствора, что обусловлено выраженной способностью полимера связывать воду, а также модификацией биообъекта при контакте с ним. Модифицирующее влияние ПЭО-1500 на клетки связано, прежде всего с дегидратацией. Изменения, вызванные потерей воды, могут дополняться структурно-функциональными перестройками плазматической мембраны в результате абсорбционной активности поли-

Cryopreservation of erythrocytes under PEO-1500 protection enables preserving their integrity after thawing at a high level [6]. Cell integrity is provided by the change in the character of solution crystallization, that stipulated by a manifested ability of polymer to be bound with water as well as modification of biological object at their contact. Modifying effect of PEO-1500 on cells is primarily related to their dehydration. The changes caused by water loss may be supplemented with structural and functional rearrangements of plasma membrane in the result of polymer absorption activity [5]. Since plasma membrane and cytoskeletal protein net make the base

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) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
pmzubov@mail.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya
str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57
373 3084, e-mail: pmzubov@mail.ru

мера [5]. Поскольку плазматическая мембрана и цитоскелетная белковая сеть составляют основу морфологических и функциональных свойств данного типа клеток [2, 3], можно предположить, что их устойчивость к изменениям физико-химических факторов среды в процессе замораживания-отогрева во многом определяется изменениями в мембрано-цитоскелетном комплексе (МЦК) под влиянием дегидратирующего и абсорбционного эффекта ПЭО-1500. Дегидратация эритроцитов при добавлении раствора криопротектора сопровождается повышением концентрации солей, в результате чего макромолекулы оказываются в окружении среды высокой ионной силы. Увеличение ионной силы, повышение концентрации двухвалентных катионов, а также адсорбция молекул ПЭО-1500 на плазматической мембране, по-видимому, являются основными факторами, которые обуславливают перестройки в МЦК эритроцитов при их инкубации в растворе криоконсерванта.

Цель работы – изучение модификаций белкового спектра МЦК эритроцитов под влиянием ПЭО-1500 и температуры при контакте с растворами высокой ионной силы и варьирующим содержанием двухвалентных катионов.

Материалы и методы

Исследовали эритроциты мужчин-доноров (группа крови А(II)). Эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-3), плазму и лейкоциты удаляли. После этого клетки трижды отмывали 3-4 объемами среды А (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,4) в аналогичном режиме центрифугирования. К эритроцитам добавляли 30%-й раствор ПЭО-1500 в соотношении 1:1 по объему, приготовленный на основе среды А, и инкубировали в течение 40 мин при 37 и 0-4°C. Контролем служили клетки, экспонированные в среде А при 37°C. После инкубации в растворе криопротектора ПЭО-1500 клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10-15 мин; контрольные – при 3000 об/мин в течение 5-7 мин.

После удаления супернатанта эритроциты использовали для получения теней. Аликвоты эритроцитов лизировали в 20 объемах различных сред (В, С, D). Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду.

Состав среды В – 135 мМ KCl; 10 мМ Трис-НСl (pH 7,6); 0,02% сапонина и различные добавки:

- 1 – 10^{-6} М CaCl₂, 10^{-3} М MgCl₂;
- 2 – 10^{-5} М CaCl₂, 10^{-3} М MgCl₂;
- 3 – 10^{-3} М CaCl₂, 10^{-3} М MgCl₂;
- 4 – 2 мМ ЭДТА.

of morphological and functional properties of this type of cells [2, 3] it may be speculated about their resistance to the changes of physical and chemical environmental factors during freeze-thawing as mainly determined by the changes in membrane-cytoskeletal complex (MCC) under the influence of dehydrating and absorbing effect of PEO-1500. Dehydration of erythrocytes when adding cryoprotectant solution is accompanied with a rise in concentration of salts resulted in creation of the medium of high ionic strength around macromolecules. Increase in ionic strength, rise in concentration of bivalent cations as well as adsorption of PEO-molecules on plasma membrane, may be the basic factors stipulating the re-arrangements in MCC of erythrocytes during their incubation in cryopreservative solution.

Research aim is to study the modifications of protein spectrum in erythrocyte MCC under PEO-effect and temperature at the contact with solutions of high ionic strength and varying content of bivalent cations.

Materials and methods

Erythrocytes derived from human male donors (blood group A(II)) were under investigation. Erythrocytes were precipitated with centrifugation at 3,000 rot/min (OPN-3 centrifuge), plasma and leukocytes were removed. Afterwards the cells were thrice washed-out with 3-4 volumes of medium A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) under the same centrifugation regimen. The solution of 30% PEO-1500 in the 1:1 ratio v/v based on medium A was added to erythrocytes and incubated for 40 min at 37 and 0-4°C. The cells exposed to medium A at 37°C served as the control. After incubation in PEO-1500 solution the cells were precipitated with centrifugation at 1,000 rpm for 10-15 min; the control ones were done at 3,000 rpm for 5-7 min.

After removal of supernatant the erythrocytes were used to obtain the ghosts. Erythrocyte aliquots were lysed in 20 volumes of different media (B, C, D). Deionized water was used to prepare all the solutions.

Medium B comprised: 135 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.02% saponin and different additives:
1 – 10^{-6} M CaCl₂, 10^{-3} M MgCl₂;
2 – 10^{-5} M CaCl₂, 10^{-3} M MgCl₂;
3 – 10^{-3} M CaCl₂, 10^{-3} M MgCl₂;
4 – 2 mM EDTA.

Medium C comprised: 250 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.02% saponin; components 1-4;

Medium D comprised: 500 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.02% saponin; components 1-4;

At lysis stage (30 min at 2°C) all the solutions contained the inhibitor of proteases PMSF (1 mg/ml) and dithiothreitol (DTT) (10 mM). Erythrocyte ghosts were thrice washed-out with 20-fold volumes of

Состав среды С – 250 мМ КСl; 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6); 0,02% сапонина; компоненты 1-4;

Состав среды D – 500 мМ КСl; 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6); 0,02% сапонина, компоненты 1-4.

На этапе лизиса (30 мин при 2°C) все растворы содержали ингибитор протеаз PMSF (1 мг/мл) и дитиотреитол (ДТТ) (10 мМ). Тени эритроцитов трижды отмывали двадцатикратными объемами соответствующих растворов, не содержащих PMSF, сапонин и ДТТ, путем центрифугирования при 12000 г в рефрижераторной центрифуге. Аликвоты теней солюбилизовали в буфере, содержащем 0,05 М Трис-НСl (рН 6,8); 0,4 мг/мл NaN₃; 0,003М ЭДТА; 2% SDS; 100мМ ДТТ; 20% глицерола; 0,01% бромфенолового синего; 0,7 мг/мл PMSF в соотношении 1:1 по объему. Концентрация белка в пробах составляла 1-2 мг/мл.

Электрофорез солюбилизованных белков теней эритроцитов проводили в вертикальных пластинах SDS-полиакриламидного геля с градиентом пористости (5-20)Т4С в системе Laemmly [12]. Для окрашивания белков использовали краситель Coomassie BB G-250. Денситометрирование и анализ гелей проводили с помощью программного обеспечения GEL, статистический анализ – программного пакета Statgraphics for Win 2,0. Для сравнения достоверности различий в выборках применяли критерий знаков.

Результаты и обсуждение

Адсорбция ПЭО-1500 вокруг плазматической мембраны и дегидратация клеток реализуются в генерализованных структурных изменениях в рамках всего МЦК, поскольку мембрана представляет собой сложную кооперативную систему, поддерживаемую упорядоченной сетью межмолекулярных нековалентных взаимодействий типа белок-белок, белок-липид, липид-липид при участии воды и некоторых ионов [4]. Одним из проявлений этих перестроек могут быть изменения белок-белковых взаимодействий (ББВ) в цитоскелетной сети, охватывающие как горизонтальные связи между белковыми молекулами в рамках цитоскелетной сети, так и вертикальные контакты цитоскелета с интегральными белками плазматической мембраны. Анализ изменений ББВ, вызванных инкубированием эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 при разных температурах, основан на способности белковой сети неодинаково реагировать на действие растворов различной ионной силы в зависимости от исходного структурно-функционального состояния МЦК.

Повышение ионной силы раствора может рассматриваться как один из ведущих факторов, определяющих перестройки в сложной сети ББВ. Кроме того, при дегидратации клеток под влия-

соответствующих растворов, free of PMSF, saponin and DTT with centrifugation at 12,000 g in refrigerator centrifuge. Ghosts aliquots were solubilized in the buffer of protein preparation (0.05M Tris-HCl (pH 6.8.); 0.4 mg/ml NaN₃; 0.003 M EDTA; 2% SDS; 100 mM DTT; 20% glycerol; 0.01% bromphenol blue; 0.7 mg/ml PMSF) in the ratio 1:1 v/v. Protein concentration in samples made 1-2 mg/ml.

Electrophoresis of solubilized proteins of erythrocyte ghosts was performed on vertical plates of SDS-polyacrylamide gel with sponginess gradient (5-20) T4C according to Laemmly system [12]. For staining of proteins Coomassie BB G-250 dye was used. Densitometry and analysis of gels were performed by means of GEL software, statistical analysis was done using Statgraphics for Win 2.0 software. To compare statistical differences in samples non-parametric method was applied for paired sample, i.e. the sign test was used.

Results and discussion

PEO-1500 adsorption around plasma membrane and cell dehydration are realized in generalized structural alterations within the whole MCC, since membrane is a complicated cooperative system, supported by an ordered net of intermolecular non-covalent interactions of the types: protein-protein, protein-lipid, lipid-lipid, at the participation of water and some ions [4]. One of manifestations of these rearrangements may be the change in protein-protein inter-actions (PPI) in cytoskeletal net, comprising both horizontal bonds between protein molecules within cytoskeletal net and vertical contacts of cytoskeleton with integral proteins of plasma membrane. Analysis of PPI changes, caused by incubation of erythrocytes with PEO-1500 at various temperatures is based on the ability of protein net to respond irregularly to the action of solutions of different ionic strength depending on initial structural and functional state of MCC.

A rise in ionic strength of the solution may be considered as one of the leading factors determining re-arrangements in a complex net of PPIs. In addition, during cell dehydration under PEO-1500 effect the rise in concentration of Ca²⁺ may significantly affect the character of inter-protein interactions. It has been established that PEO-1500 renders inhibiting effect on the activity of Ca²⁺-ATPase [1] that in combination with the loss of water by cells leads to an increase of Ca²⁺ concentration inside cells. Ca²⁺ effect on PPI may be realized both under direct participation of this ion binding with specific sites of cytoskeletal proteins and as a result of biochemically mediated mechanisms (calmodulin, Ca²⁺-activated protein kinases, proteases, phosphatases etc.).

As the analysis of densitograms has shown under physiological values of ionic strength in MCC of the

нием ПЭО-1500 повышение концентрации Ca^{2+} может существенно повлиять на характер межбелковых взаимодействий. Было установлено, что ПЭО-1500 оказывает ингибирующее действие на активность Ca^{2+} -АТФазы [1], что в сочетании с потерей клетками воды ведет к увеличению концентрации Ca^{2+} внутри клеток. Влияние Ca^{2+} на ББВ может реализоваться как при непосредственном участии данного иона, связывающегося со специфическими сайтами ряда белков цитоскелета, так и в результате биохимически опосредованных механизмов (кальмодулин, 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, обнаруживаются отличия от белкового спектра нативных клеток (табл. 1), которые зависят от концентрации двухвалентных катионов, прежде всего от уровня Ca^{2+} . Было установлено, что при концентрации Ca^{2+} 10^{-6} - 10^{-5} М содержание анкирина в спектре теней эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500 при 37 и 0-4°C выше, чем в контроле. Увеличение содержания Ca^{2+} в среде до 10^{-3} М и хелатирование двухвалентных катионов в присутствии ЭДТА приводят к нивелированию различий между нативными клетками и эритроцитами, инкубированными в растворе ПЭО-1500. Повышение относительного содержания анкирина может свидетельствовать о формировании более прочного взаимодействия цитоскелета с мембраной, опосредованного данным белком. Упрочнение вертикальных контактов между цитоскелетом и интегральными белками мембраны при участии анкирина может в значительной мере повлиять на механическую стабильность клеток [7].

Еще одна особенность модификации белкового спектра МЦК под влиянием ПЭО-1500, обнаруживаемая при физиологических значениях ионной силы, связана с увеличением относительного содержания белка полосы (б. п.) 4.2 по сравнению с его уровнем в нативных клетках. Эти различия выявляются только в присутствии двухвалентных катионов. По-видимому, более прочная связь б. п. 4.2 с белками-партнерами после контакта клеток с криопротектором зависит от присутствия в среде Ca^{2+} и Mg^{2+} . До настоящего времени функциональная роль данного белка мало изучена. О его роли в цитоскелете эритроцитов можно судить по клиническим проявлениям у пациентов с анемией, связанной с аномалиями синтеза б. п. 4.2, в результате которых он полностью не синтезируется либо синтезируется в виде укороченных фрагментов [11, 17]. Как правило, у таких пациентов изменяется форма клеток и отмечается гемолитическая анемия средней тяжести. Установ-

erythrocytes incubated with PEO-1500 there are found the differences from protein spectrum of native cells (Table 1), which depend on concentration of bivalent cations, primarily at the level of Ca^{2+} . It has been found that under concentration of Ca^{2+} 10^{-6} - 10^{-5} M the content of ankyrin in spectrum of ghosts of the erythrocytes incubated with PEO-1500 at 37 and 0-4°C is higher than in the control. An increase in Ca^{2+} content in the medium up to 10^{-3} M and chelating of bivalent cations in EDTA presence result in leveling of differences between native cells and PEO-1500 incubated erythrocytes. Rise in relative content of ankyrin may testify to the formation of more stable interaction of cytoskeleton with membrane, mediated with this protein. Strengthening of vertical contacts between cytoskeleton and integral proteins of membrane at the participation of ankyrin may in a great extent affect the mechanical stability of cells [7].

Peculiar feature of MCC protein spectrum modification under PEO-1500 effect found under physiological values of ionic strength is also related to the rise in relative content of protein 4.2 in comparison with its level in native cells. These differences are found only in the presence of bivalent cations. Tighter bond of protein 4.2 with the partner ones after cell contact with cryoprotectant is probably dependent on the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} in the medium. Up to now functional role of this protein has been poorly studied and about the one in erythrocyte cytoskeleton may be judged on clinical manifestations in patients with anemia, related to abnormalities of the synthesis of protein 4.2 in the result of which it is either completely non-synthesized or synthesized as shortened fragments [11, 17]. As a rule in these patients the shape of cells is changed and hemolytic anemia of average severity is noticed. This protein has been shown as a mandatory component in the structure of macrocomplex with the participation of rhesus-factor: RhAG (Rh-associated glycoprotein)-CD47-protein 4.2 and/or ankyrin. This complicated protein association mediates the bond of cytoskeletal net with membrane [9, 14]. In addition, this protein may probably bind spectrin and lipid bilayer. It is known to undergo to myristylation [16]. Inclusion of acyl residue in protein 4.2 may contribute to hydrophobic contacts with lipid bilayer.

Erythrocyte incubation in PEO-1500 solution induces the changes in the structure of protein 4.1 which affect the tightness of its bonds with partner proteins, but in contrast to ankyrin modification and protein 4.2 are found during chelating of bivalent cations in medium. Ca^{2+} high concentration may contribute to dissociation of this protein from cytoskeletal net [15] and thereby to level differences between control and experimental samples. During incubation of cells in PEO-1500 hypertonic solutions

Таблица 1. Состав МЦК эритроцитов в среде В (135 mM KCl, 10 mM Трис-НСl, pH 7.6): нативных клеток – 1; инкубированных в растворе ПЭО-1500 при 0-4°C – 2; инкубированных в растворе ПЭО-1500 при 37°C – 3

Table 1. Composition of erythrocyte MCC in the medium В (135 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6): native cells – 1; incubated in PEO-1500 solution at 0-4°C – 2; incubated in PEO-1500 solution at 37°C – 3

Дополнительные компоненты среды Additional components of medium	Группа Group	Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC										
		α- спектрин α – spectrin	β- спектрин β – spectrin	анкирин ankyrin	б. п. 3 band 3	post band 3	б.п.4.1 protein 4.1	б. п. 4.2 protein 4.2	б. п. 4.9 protein 4.9	б. п. 5 band 5	post band 5	б. п. 40 кДа protein 40 kD
10 ⁻⁶ M Ca ²⁺ , 1 mM Mg 10 ⁻⁶ M Ca ²⁺ , 1 mM Mg	1	7,9±0,91	11,2±1,25	4,0±0,34	18,0±0,73	2,8±0,24	4,4±0,21	3,8±0,13	1,6±0,07	3,5±0,15	1,4±0,05	0,6±0,07
	2	9,4±1,11	10,5±0,98	5,0±0,17	18,4±0,65	3,8±0,25	4,5±0,27	4,5±0,25	2,2±0,17	4,4±0,34	1,7±0,07	1,3±0,05
	3	9,5±0,94	11,2±1,12	5,0±0,33	17,6±0,81	4,1±0,27	4,9±0,17	4,7±0,29	2,1±0,11	3,7±0,3	1,4±0,13	0,7±0,06
10 ⁻³ M Ca ²⁺ , 1 mM Mg 10 ⁻³ M Ca ²⁺ , 1 mM Mg	1	8,8±0,64	10,5±0,49	3,5±0,27	16,7±0,39	3,9±0,23	4,6±0,29	3,8±0,25	1,8±0,09	3,6±0,28	1,3±0,12	1,1±0,18
	2	8,3±1,31	10,1±1,14	4,7±0,33	17,4±0,53	3,1±0,11	4,1±0,16	4,5±0,33	2,2±0,22	4,6±0,21	1,5±0,11	0,9±0,13
	3	8,4±1,92	9,8±1,28	4,5±0,19	16,6±0,53	3,7±0,33	4,24±0,33	4,4±0,21	2,2±0,16	3,4±0,18	1,8±0,12	1,0±0,09
10 ⁻³ M Ca ²⁺ , 1 mM Mg 10 ⁻³ M Ca ²⁺ , 1 mM Mg	1	11,0±3,71	8,9±1,35	3,9±0,15	18,1±0,76	3,7±0,37	4,3±0,31	3,9±0,26	2,0±0,14	3,8±0,29	1,6±0,15	0,8±0,07
	2	7,4±1,44	10,1±0,91	4,3±0,19	17,8±0,84	3,6±0,18	4,4±0,17	4,4±0,36	2,0±0,21	4,0±0,28	1,5±0,21	0,8±0,15
	3	10,0±3,55	9,5±1,12	3,6±0,24	17,0±1,11	3,3±0,11	4,1±0,17	4,4±0,32	2,1±0,19	3,9±0,25	1,6±0,15	1,0±0,09
2 mM ЭДТА 2 mM EDTA	1	8,4±0,91	10,6±1,25	3,8±0,59	16,8±1,0	–	4,0±0,16	3,8±0,25	1,4±0,07	3,7±0,32	1,4±0,12	0,9±0,18
	2	8,4±1,5	10,8±0,99	4,0±0,34	18,3±1,16	–	5,3±0,35	4,2±0,28	1,9±0,15	4,2±0,26	1,2±0,04	0,9±0,11
	3	8,4±1,45	11,5±1,09	4,3±0,52	18,2±0,78	–	5,4±0,31	4,0±0,49	2,0±0,19	4,3±0,19	1,3±0,15	1,1±0,08

Примечания: Данные представлены в виде M±SE. * – данные отличаются от контроля с уровнем p<0,05.

Notes: The data are presented as M±SE. * – the data differ from the control with p<0.05.

лено, что данный белок – обязательный компонент в структуре макрокомплекса с участием резус-фактора: RhAG (Rh-ассоциированный гликопротеин)-CD47-б. п. 4.2 и/или анкирин. Эта сложная белковая ассоциация опосредует связь цитоскелетной сети с мембраной [9, 14]. Кроме того, данный белок может, по-видимому, связываться со спектрином и липидным бислоем. Известно, что он подвергается меристелированию [16]. Включение ацильного остатка в состав б. п. 4.2 может способствовать гидрофобным контактам с липидным бислоем.

Инкубирование эритроцитов в растворе ПЭО-1500 индуцирует изменения в структуре б. п. 4.1, которые отражаются на прочности его связей с белками-партнерами, но, в отличие от модификаций анкирина и б. п. 4.2 обнаруживаются при хелатировании двухвалентных катионов в среде. Высокие концентрации Ca^{2+} могут способствовать диссоциации данного белка от цитоскелетной сети [15] и тем самым нивелировать различия между контрольными и экспериментальными пробами. При инкубировании клеток в гипертоническом растворе ПЭО-1500 изменения ББВ контролируются не только ростом концентрации Ca^{2+} , но и значительным повышением ионной силы внутри клеточной среды. В таких условиях, очевидно, происходят определенные структурные нарушения б. п. 4.1, но обнаружить их можно после элиминации двухвалентных катионов. Возможно, модификация б. п. 4.1, вызванная инкубированием эритроцитов с ПЭО-1500 и проявляющаяся в усилении взаимодействия в ЭДТА-содержащей среде, также отражает упрочнение вертикальных связей в МЦК.

Можно предположить, что упрочнение вертикальных контактов в МЦК эритроцитов под влиянием ПЭО-1500 осуществляется по-разному, в том числе через опосредование связи мембрана-цитоскелет с участием анкирина, б. п. 4.1 и б. п. 4.2. Следствием более жестких контактов между белками-партнерами может быть увеличение механической прочности клеток [10] и связанное с этим повышение стабильности эритроцитов к действию факторов криоконсервирования.

Инкубирование клеток с ПЭО-1500 также выявило особенность изменения ББВ в структуре МЦК, которая обнаруживается в физиологическом диапазоне ионной силы при умеренно высоких концентрациях Ca^{2+} (10^{-6} - 10^{-5} М) и выражается в повышении уровня б. п. 4.9. В зоне б. п. 4.9 с применением иммуноблотинга было выявлено 2 различных белка (тропомодулин и дематин), которые в различных позициях локализованы на актиновых протофиламентах [8, 13, 18] и способствуют стабилизации их структуры. Можно предположить, что изменения в спектре МЦК

of the changes of protein-protein interactions in MCC are controlled not only by the growth of Ca^{2+} concentration but also significant increase of ionic strength of intracellular medium. Under these conditions probably certain structural changes in protein 4.1 take place, but it is possible to reveal them after elimination of bivalent cations. Modification of protein 4.1 is apparently connected to erythrocyte incubation with PEO-1500 and manifesting in the strengthening of interaction in EDTA-containing medium, also reflects the tightening of vertical bonds in MCC.

It could be supposed that strengthening of vertical contacts in erythrocyte MCC under the effect of PEO-1500 is performed in different ways including those via mediated bonds of membrane-cytoskeleton with participation of ankyrin and proteins 4.1 and 4.2. The consequence of tighter contacts between partner proteins may be the increase in mechanical rigidity of cells [10] and associated with this rise in erythrocytes stability to cryopreservation factors.

Cell incubation with PEO-1500 has also shown one more peculiarity of PPI change in MCC structure which is found within physiological range of ionic strength under moderately high concentrations of Ca^{2+} (10^{-6} - 10^{-5} М) and manifests in an increase of the level of protein 4.9. In the zone of protein 4.9 with using immune blotting there were found 2 different proteins (tropomodulin and dematin) which under various positions were localized on actin protofilaments [8, 13, 18] and contributed to stabilization of their structure. We may speculate about the changes in spectrum of MCC of PEO incubated erythrocytes as those reflecting the formation of more rigid structure of key complex of cytoskeletal net.

As the results of densitometric analysis show the temperature conditions of cell incubation with PEO-1500 do not very likely affect the character of PPI modification. The only nuance found in the solutions with physiological level of ionic strength in the presence of 10^{-6} - 10^{-5} М Ca^{2+} consists in insignificant rise in actin level in PEO-1500 incubated erythrocytes at 0-4°C.

Application of the solutions of high ionic strength gives the possibility to more adequately reproduce the effect of intracellular medium on the state of erythrocyte MCC after incubation with PEO-1500. Analysis of densitograms has shown that in media with high ionic strength there are found less differences in protein spectrum of MCC of native erythrocytes and PEO-1500 incubated cells. Proteins in all studied groups respond practically in the same way to environmental changes. The noted distinction was an increase in protein in the zone of post band 5 in the presence of 10^{-6} - 10^{-5} М Ca^{2+} in PEO-1500 incubated erythrocytes.

эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500, отражают формирование более жесткой структуры узловых комплексов цитоскелетной сети.

Как свидетельствуют результаты денситометрического анализа, температурные условия инкубирования клеток с ПЭО-1500 не оказывают, очевидно, заметного влияния на характер модификации ББВ. Единственный нюанс, обнаруженный в растворах с физиологическим уровнем ионной силы в присутствии 10^{-6} - 10^{-5} М Ca^{2+} , состоит в незначительном повышении уровня актина в эритроцитах, инкубированных с ПЭО-1500 при 0-4°C.

Применение растворов высокой ионной силы дает возможность более адекватно воспроизвести влияние внутриклеточной среды на состояние МЦК эритроцитов после инкубирования с ПЭО-1500. Анализ денситограмм показал, что в средах с высокой ионной силой выявляется гораздо меньше различий в белковом спектре МЦК нативных эритроцитов и клеток, инкубированных с ПЭО-1500. Белки во всех исследуемых группах реагируют практически одинаково на изменение окружающей их среды. Единственным установленным отличием было повышение белка в зоне post band 5 в присутствии 10^{-6} - 10^{-5} М Ca^{2+} в эритроцитах, инкубированных с ПЭО-1500.

Вместе с тем изучение особенностей белковых спектров при разных значениях ионной силы, включая физиологические значения [4], дает возможность представить общий характер изменений ББВ при повышении концентрации солей в среде. Необходимо отметить, что в средах с высокой ионной силой, включая физиологические значения [4] отсутствует б. п. 6 (табл. 2, 3) во всех экспериментальных условиях.

Экспонирование мембран эритроцитов в растворе высокой ионной силы (в присутствии 250 и 500 мМ KCl) ведет к потере (рис. 1) основного интегрального белка плазматической мембраны – б.п.3. В целом содержание б. п. 3 падает с 17-18% в средах с физиологическим уровнем солей до 14-15% в растворах высокой ионной силы, причем отмеченные изменения не зависят от содержания двухвалентных катионов. Очевидно, модификация связей в липидном бислое и изменения белок-липидных взаимодействий при повышении ионной силы раствора способствуют везикуляции мембраны и потере б. п. 3. Еще одна общая закономерность изменений в белковом спектре МЦК эритроцитов при повышении ионной силы – повышение уровня белка в зоне post band 5. Эта особенность проявляется также независимо от уровня двухвалентных катионов в среде. Появление этого белка не коррелирует с уменьшением содержания актина (б. п. 5) и, по-видимому, связано с переходом неиз-

At the same time the study of peculiarities of protein spectra at various values of ionic strength enables to conceive the general character of PPI changes during rise in the concentration of salts in the medium. It should be noted that in the media with high ionic strength, including physiological values [4], there is absent band 6 (Table 2, 3) under all experimental conditions.

Erythrocyte membrane exposure in the solution of high ionic strength (in presence of 250 and 500 mM KCl) leads to the loss (Fig. 1) of the main integral protein of plasma membrane, band 3. In a whole the content of band 3 reduces from 17-18% in the media with physiological level of salts down to 14-15% in the solutions of high ionic strength, moreover the noted alterations do not depend on the content of bivalent cations. Modification of the dynamics of bonds in lipid bilayer and changes in protein-lipid interactions during a rise in ionic strength of the solution contributes to membrane vesiculation and loss of band 3. One more general regularity of changes in protein spectrum of erythrocyte MCC at a rise of ionic strength is an increase of protein level in post band 5 zone. This peculiarity is also manifested independently on the level of bivalent cations in the medium. Appearance of this protein does not correlate to the decrease in actin content (band 5) and is likely associated with the transition of unknown protein from cytosol fraction into membrane-bound state at increased salt content. When comparing the composition of erythrocyte MCC in the media of high ionic strength containing bivalent cations and chelators there has been revealed the appearance of protein in the zone of post band 3 in the presence of Ca^{2+} , Mg^{2+} (Fig. 2). In this case there is not found a correlating change in the content of band 3 itself, since its level in Ca^{2+} , Mg^{2+} -containing media does not differ from that in EDTA ones. Therefore, activation of Ca^{2+} -dependent proteases is not the cause

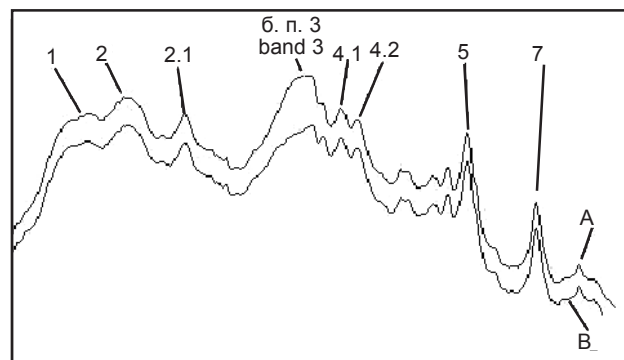


Рис. 1. Денситограммы белков теней нативных эритроцитов: А – изотоническая среда; В – среда с высокой ионной силой. Цифрами обозначены белки в соответствии с классификацией [12].

Fig. 1. Densitograms of proteins of native erythrocyte ghosts: А – isotonic medium, В – medium with high ionic strength. Proteins are labeled with figures according to classification [12].

Таблица 2. Состав МЦК эритроцитов в среде С (250 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6): нативных клеток – 1; инкубированных в растворе ПЭО-1500 при 0-4°C – 2; инкубированных в растворе ПЭО-1500 при 37°C – 3

Table 2. Composition of erythrocyte MCC in the medium С (250 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6): native cells – 1; incubated in PEO-1500 solution at 0-4°C – 2; incubated in PEO-1500 solution at 37°C – 3

Дополнительные компоненты среды Additional components of medium	Группа Group	Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC										
		α-спектрин α-spectrin	β-спектрин β-spectrin	анкирин ankyrin	б. п. 3 band 3	post band 3	б. п.4.1 protein 4.1	б. п. 4.2 protein 4.2	б. п. 4.9 protein 4.9	б. п. 5 band 5	post band 5	б. п. 40 кДа protein 40 kD
10 ⁻⁶ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg 10 ⁻⁶ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg	1	9,0±1,31	10,2±0,99	4,3±0,34	15,7±0,87	3,5±0,09	4,7±0,08	3,8±0,35	1,6±0,12	3,9±0,25	1,4±0,19	0,9±0,07
	2	10,0±0,72	11,7±0,69	4,0±0,21	16,8±0,53	4,4±0,13	5,3±0,22	4,2±0,26	1,5±0,13	3,7±0,29	2,4±0,03	1,5±0,18
	3	9,2±1,22	11,6±0,19	4,4±0,41	15,9±0,25	3,6±0,22	5,0±0,14	5,1±0,34	1,7±0,21	3,1±0,27	1,8±0,05	1,4±0,13
10 ⁻⁵ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg 10 ⁻⁵ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg	1	9,8±0,91	12,0±0,66	4,4±0,31	14,8±0,42	3,4±0,15	4,4±0,13	4,5±0,34	1,5±0,11	4,1±0,31	1,7±0,15	1,0±0,11
	2	11,0±0,83	11,7±0,73	4,4±0,42	15,0±0,71	3,0±0,31	4,3±0,18	3,4±0,38	2,0±0,14	4,0±0,34	2,3±0,13	1,5±0,15
	3	11,0±1,64	11,2±0,47	3,8±0,33	14,8±0,81	3,3±0,24	3,9±0,05	3,8±0,36	1,7±0,13	2,8±0,13	2,2±0,12	1,2±0,13
10 ⁻³ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg 10 ⁻³ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg	1	9,3±0,81	10,5±0,21	4,1±0,28	16,1±1,04	3,3±0,34	4,1±0,17	5,0±0,24	1,9±0,26	3,5±0,27	2,3±0,18	1,2±0,18
	2	10,0±1,04	10,7±0,82	4,7±0,16	15,8±0,7	3,2±0,24	3,6±0,27	4,3±0,34	1,8±0,17	4,1±0,23	2,6±0,24	1,4±0,12
	3	9,9±1,24	11,4±0,86	4,6±0,48	15,4±1,25	3,8±0,32	4,5±0,35	4,3±0,61	2,0±0,14	4,3±0,32	2,3±0,07	1,3±0,14
2 мМ ЭДТА 2 mM EDTA	1	10,0±0,61	12,0±0,45	4,9±0,38	16,4±0,51	–	5,1±0,22	4,1±0,21	2,0±0,23	4,0±0,24	2,0±0,19	1,0±0,15
	2	11,0±0,83	12,6±1,09	4,7±0,25	15,5±0,71	–	5,3±0,18	3,9±0,22	1,6±0,07	4,1±0,29	2,3±0,21	0,9±0,16
	3	9,7±0,81	12,0±0,88	4,6±0,44	16,9±1,11	–	4,9±0,24	4,4±0,35	1,9±0,17	3,9±0,41	2,1±0,24	1,0±0,13

Примечания: Данные представлены в виде М±SE. * – данные отличаются от контроля с уровнем p<0,05.

Notes: The data are presented as M±SE. * – the data differ from the control with p<0.05.

Таблица 3. Состав МЦК эритроцитов в среде D (500 мМ KCl, 10мМ Трис-HCl, рН7,6): нативных клеток – 1; инкубированных в растворе ПЭО-1500 при 0-4°C – 2; инкубированных в растворе ПЭО-1500 при 37°C – 3

Table 3. Composition of erythrocyte MCC in the medium D (500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6): native cells – 1; incubated in PEO-1500 solution at 0-4°C – 2; incubated in PEO-1500 solution at 37°C – 3

Дополнительные компоненты среды Additional components of medium	Группа Group	Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC											б. п. 40 кДа protein 40 kD
		α-спектрин α – spectrin	β-спектрин β – spectrin	анкирин ankyrin	б. п. 3 band 3	post band 3	б.п.4.1 protein 4.1	б. п. 4.2 protein 4.2	б. п. 4.9 protein 4.9	б. п. 5 band 5	post band 5		
10 ⁻⁶ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg 10 ⁻⁶ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg	1	8,1±0,82	12,2±0,71	4,6±0,15	15,1±0,36	3,3±0,18	4,1±0,35	5,5±0,13	1,6±0,13	3,7±0,21	1,5±0,08	1,4±0,08	
	2	8,4±0,75	11,7±0,69	4,1±0,29	13,9±0,58	2,2±0,22	4,2±0,19	3,8±0,16	1,7±0,09	3,6±0,26	2,3±0,12	1,8±0,11	
	3	7,7±0,74	10,6±0,37	3,8±0,49	15,3±0,71	2,9±0,27	4,7±0,26	5,3±0,27	1,6±0,17	3,5±0,17	2,8±0,19	2,2±0,23	
10 ⁻⁵ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg 10 ⁻⁵ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg	1	7,3±0,82	11,4±0,42	2,9±0,27	14,8±0,89	3,4±0,36	3,6±0,18	5,8±0,55	2,2±0,21	4,3±0,43	2,8±0,29	1,2±0,15	
	2	9,1±1,6	10,8±0,72	5,4±0,54	14,5±1,08	2,6±0,11	4,8±0,18	4,2±0,42	2,4±0,11	3,7±0,27	3,0±0,15	2,2±0,23	
	3	9,5±0,72	11,2±0,63	3,8±0,15	15,4±0,78	3,2±0,18	4,2±0,22	4,7±0,43	1,8±0,11	4,0±0,27	2,9±0,21	1,3±0,13	
10 ⁻³ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg 10 ⁻³ М Са ²⁺ , 1 мМ Mg	1	7,7±0,62	10,6±0,69	3,7±0,23	13,7±0,54	3,3±0,15	4,8±0,43	4,8±0,39	2,0±0,14	4,0±0,34	2,8±0,14	1,6±0,11	
	2	7,9±0,62	10,4±0,54	3,6±0,44	14,7±1,03	4,0±0,29	4,2±0,33	5,5±0,34	2,0±0,05	3,7±0,28	3,0±0,09	1,6±0,11	
	3	8,1±0,35	10,3±0,68	3,2±0,27	14,7±0,63	2,8±0,15	4,5±0,24	6,4±0,44	2,3±0,16	4,5±0,53	3,0±0,15	2,0±0,06	
2 мМ ЭАТА 2 мМ EDTA	1	7,3±0,61	10,1±0,34	3,2±0,29	14,9±0,58	–	4,8±0,14	5,9±0,22	1,8±0,22	4,3±0,44	2,7±0,08	1,2±0,13	
	2	7,9±0,54	11,4±0,62	4,7±0,32	15,3±2,51	–	5,0±0,44	5,2±0,36	2,8±0,25	4,3±0,17	2,7±0,06	1,2±0,13	
	3	8,8±0,41	11,2±0,56	3,8±0,14	15,4±0,58	–	5,9±0,46	6,0±0,47	2,1±0,17	4,7±0,18	2,2±0,15	1,0±0,09	

Примечания: Данные представлены в виде М±SE. * – данные отличаются от контроля с уровнем p<0,05.

Notes: The data are presented as M±SE. * – the data differ from the control with p<0.05.

вестного белка из цитозольной фракции в мембранно-связанное состояние при повышении содержания солей. При сравнении состава МЦК эритроцитов в средах, содержащих двухвалентные катионы и хеллаторы, обнаружено появление белка в зоне post band 3 в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} (рис. 2). При этом не обнаруживается коррелирующего изменения содержания самого б. п. 3, поскольку уровень его в Ca^{2+} , Mg^{2+} -содержащих средах не отличается от уровня в средах с ЭДТА. Следовательно, активация Ca^{2+} -зависимых протеаз не является причиной появления белков в зоне post band 3 и post band 5.

Анализ изменений в МЦК эритроцитов в средах различной ионной силы показал, что особенности модификации ББВ, индуцированные в эритроцитах криопротектором ПЭО-1500, проявляются, главным образом, при физиологическом уровне солей, а в средах высокой ионной силы они поглощаются более мощным воздействием среды, которая вызывает значительные конформационные изменения белков, в результате чего оценить исходное состояние белковой сети практически невозможно. Однако и в данном случае можно получить определенное представление о характере изменений в МЦК эритроцитов при дегидратации клеток. По-видимому, основная тенденция изменений в МЦК при экспонировании эритроцитов с криопротектором связана с упрочнением ББВ в МЦК, что затрагивает вертикальные связи цитоскелета и плазматической мембраны, опосредованные анкирином, б. п. 4.2 и, возможно, б. п. 4.1. Кроме того, по-видимому, усиливаются взаимодействия в структуре актиновых протофиламентов при участии б. п. 4.9. В данных условиях усиление ББВ может способствовать повышению механической прочности клеток и их стабилизации в условиях криоконсервирования. В то же время увеличение ионной силы раствора, моделирующее условия дегидратации клеток в присутствии ПЭО-1500, свидетельствует о потере б. п. 3, что может отрицательно повлиять на стабильность мембраны [19]. Появление в средах высокой ионной силы новых белков – post band 3 и post band 5 (что обнаруживается в присутствии двухвалентных катионов) может отражать переход в мембранно-связанное состояние некоторых цитозольных компонентов. Не исключено, что они обладают шапероноподобной функцией и могут стабилизировать конформацию отдельных белков МЦК, чувствительных к стрессу.

Выводы

Изменения характера межбелковых взаимодействий в МЦК под влиянием ПЭО-1500 проявляются в увеличении содержания белков, опосредующих контакты цитоскелетной сети с мембраной – анкирина, б. п. 4.2, и б. п. 4.1.

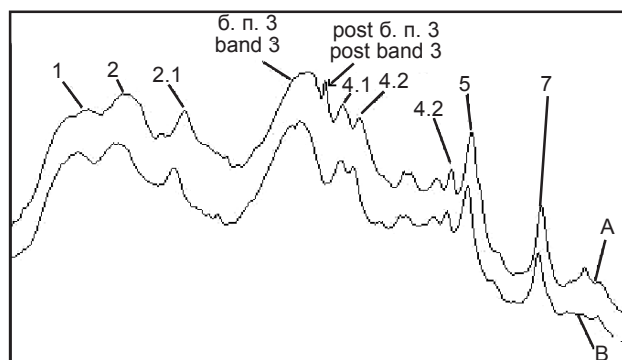


Рис. 2. Денситограммы белков теней нативных эритроцитов, полученных с использованием Ca^{2+} -содержащих сред (А) и ЭДТА – содержащих сред (В).

Fig. 2. Densitograms of proteins of native erythrocyte ghosts obtained using Ca^{2+} -containing media (A) and EDTA-containing media (B).

of appearance of proteins in the zone of post band 3 and post band 5.

Analysis of the changes in erythrocyte MCC in the media of various ionic strength has shown that the peculiarities of PPI modification induced in erythrocytes by PEO-1500 cryoprotectant are manifested mainly at physiological level of salts and in the media with high ionic strength they are absorbed by more powerful effect of medium causing significant conformational changes of proteins, as a result of that it is hardly possible to estimate an initial state of protein net. However even in this case it is possible to have a certain notion about the character of the changes in MCC of erythrocytes at cell dehydration. The basic tendency of changes in MCC during exposure of erythrocytes to cryoprotectant is likely associated to strengthening of PPI in MCC, concerning vertical bonds of cytoskeleton and plasma membrane, mediated with ankyrin, protein 4.2 and probably protein 4.1. In addition the interactions in the structure of actin protofilaments at the participation of protein 4.9 are likely getting stronger. Under these conditions the strengthening of PPI may contribute to a rise in mechanical rigidity of cells and their stabilization during cryopreservation. At the same time the increase in ionic strength of the solution modeling the conditions of cell dehydration in the presence of PEO, testifies to the loss of band 3 that may negatively affect the membrane stability [19]. Appearance in the media of high ionic strength of new proteins, post band 3 and post band 5 (in presence of bivalent cations) may reflect the transition into membrane-bound state of some cytosol components. It is not inconceivable that they possess chaperon-like function and can stabilize the conformation of some MCC stress sensitive proteins.

Conclusions

Changes in the character of protein-protein interactions in MCC under PEO-1500 effect are manifested

Увеличение содержания б. п. 4.9 в эритроцитах, инкубированных в гипертоническом растворе ПЭО-1500, свидетельствует о повышении энергии связей между белками-партнерами и стабилизации структуры актиновых протофиламентов.

При повышении ионной силы раствора как в норме, так и после экспонирования клеток с ПЭО-1500 отмечается тенденция к потере б. п. 3, что может быть связано с везикуляцией мембраны.

Литература

1. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А., Никольченко А.Ю. и др. Кинетические характеристики Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 // Пробл. криобиологии.– 2003.– №4.– С. 28-34.
2. Ивэнс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран.– М.: Мир, 1982.– 304 с.
3. Козлов М.М., Маркин В.С. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель // Биологические мембраны.– 1986.– Т. 3.– №4.– С.404-422.
4. Конеv С.В. Структурная лабильность мембран и регуляторные процессы.– Минск: Наука и техника, 1987.– 240 с.
5. Новиков А.Н., Олейник С.Т., Липина О.В., Черныш Е.Н. Влияние поверхностной активности криопротекторов на сохранность биообъектов при криоконсервировании // Криобиология.– 1991.– №3.– С.49-50.
6. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
7. An X.-L., Takakuwa Y., Nunomura W. et al. Modulation of band 3 – ankyrin interaction by protein 4.1 // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N52.– P. 33187-33191.
8. Azim A.C., Knoll J.H.M., Beggs A.H. et al. Isoform cloning actin binding and chromosomal localization of human erythroid dematin, a member of the villin superfamily // J. Biol. Chem.– 1995.– Vol. 270, N29.– P.17407-17413.
9. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood.– 2003.– Vol.101, N10.– P. 4180-4188.
10. Chasis J.A., Mohandas N., Shohet J.B. Erythrocyte membrane rigidity induced by glycophorin A – ligand interaction: evidence for a ligand – induced association between glycophorin A and skeletal proteins // J. Clin. Invest.– 1988.– Vol. 75.– P. 1919-1926.
11. Eber S., Lux S.E. Hereditary spherocytosis – defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer // Sem. Hematol.– 2004.– Vol. 41, N2.– P.118-141.
12. Fairbanks G., Steek T.L., Wallach D.F.H. Electrolitic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane // Biochem.– 1971.– Vol. 10.– P. 2606-2617.
13. Hemming N.J., Anstee D.J., Staricoff M.A., Tanner M.J. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte // J. Biol. Chem.– 1995.– Vol. 270, N10.– P. 5360-5366.
14. Mouro-Chanteloup I., Delaunay J., Gane P. et al. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47 // Blood.– 2003.– Vol.101, N1.– P.338-344.
15. Nanomura W., Takakuwa I., Parra M. et al. Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins // J. Biol. Chem.– 2000.– Vol. 275, N9.– P. 6360-6367.
16. Risinger M.A., Dolimast E.M., Cohen C.M. Human erythrocyte protein 4.2, a high copy number membrane protein, is

in a rise in content of the proteins mediating the contacts of cytoskeletal net with membrane: ankyrin, proteins 4.2 and 4.1.

Increase of protein 4.9 content in the erythrocytes, incubated in PEO-1500 hypertonic solution testifies to a rise in the energy of bonds between partner protein and stabilization of structure of actin protofilaments.

With a rise in ionic strength of the solution both in the norm and after cell exposure to PEO-1500 there is a tendency to the loss of band 3 that may be related to membrane vesiculation.

References

1. Zemlyanskikh N.G., Babijchuk L.A., Nikolchenko A.Yu. et al. Kinetic characteristics of Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes in PEO-1500 presence // Problems of Cryobiology. – 2003.– N4. – P. 28-34.
2. Evans I., Skalak R. Mechanics and thermodynamics of biological membranes.– Moscow: Mir, 1982.– 304 p.
3. Kozlov M.M., Markin V.S. Membrane skeleton of erythrocyte. Theoretical model // Biol. membrany. – 1986. – Vol. 3, N4.– P. 404-422.
4. Konev S.V. Structural lability of membranes and regulatory processes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1987.– 240 p.
5. Novikov A.N., Olejnik S.T., Lipina O.V., Chernysh E.N. Effect of surface activity of cryoprotectants on integrity of biological objects during cryopreservation // Kriobiologiya.– 1991.– N3.– P. 49-50.
6. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. Cryoprotectants. – Kiev: Naukova dumka, 1978.– 2-4p.
7. An X.-L., Takakuwa Y., Nunomura W. et al. Modulation of band 3 – ankyrin interaction by protein 4.1 // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N52.– P. 33187-33191.
8. Azim A.C., Knoll J.H.M., Beggs A.H. et al. Isoform cloning actin binding and chromosomal localization of human erythroid dematin, a member of the villin superfamily // J. Biol. Chem.– 1995.– Vol. 270, N29.– P.17407-17413.
9. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood.– 2003.– Vol.101, N10.– P. 4180-4188.
10. Chasis J.A., Mohandas N., Shohet J.B. Erythrocyte membrane rigidity induced by glycophorin A – ligand interaction: evidence for a ligand – induced association between glycophorin A and skeletal proteins // J. Clin. Invest.– 1988.– Vol. 75.– P. 1919-1926.
11. Eber S., Lux S.E. Hereditary spherocytosis – defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer // Sem. Hematol.– 2004.– Vol. 41, N2.– P.118-141.
12. Fairbanks G., Steek T.L., Wallach D.F.H. Electrolitic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane // Biochem.– 1971.– Vol. 10.– P. 2606-2617.
13. Hemming N.J., Anstee D.J., Staricoff M.A., Tanner M.J. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte // J. Biol. Chem.– 1995.– Vol. 270, N10.– P. 5360-5366.
14. Mouro-Chanteloup I., Delaunay J., Gane P. et al. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47 // Blood.– 2003.– Vol.101, N1.– P.338-344.
15. Nanomura W., Takakuwa I., Parra M. et al. Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins // J. Biol. Chem.– 2000.– Vol. 275, N9.– P. 6360-6367.

- N-myristylated // J. Biol. Chem.– 1992.– Vol. 267, N8.– P. 5680-5685.
17. *Rybicki A.C., Health R., Wolf G.L. et al.* Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane // J. Clin. Invest.– 1988.– Vol. 81.– P. 893-901.
18. *Ursitti J.A., Fowler V.M.* Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeleton // J. Cell Sci.– 1994.– Vol. 107, N6.– P. 1633-1639.
19. *Van Dort H.M., Knowles D.W., Chasis J.A. et al.* Analysis of integral membrane protein contribution to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N50.– P. 46968-46974.
16. *Risinger M.A., Dolimast E.M., Cohen C.M.* Human erythrocyte protein 4.2, a high copy number membrane protein, is N-myristylated // J. Biol. Chem.– 1992.– Vol. 267, N8.– P. 5680-5685.
17. *Rybicki A.C., Health R., Wolf G.L. et al.* Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane // J. Clin. Invest.– 1988.– Vol. 81.– P. 893-901.
18. *Ursitti J.A., Fowler V.M.* Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeleton // J. Cell Sci.– 1994.– Vol. 107, N6.– P. 1633-1639.
19. *Van Dort H.M., Knowles D.W., Chasis J.A. et al.* Analysis of integral membrane protein contribution to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N50.– P. 46968-46974.

Поступила 23.05.2006

Accepted in 23.05.2006