

## Влияние замораживания-оттаивания на конформацию фетального гемоглобина и взаимодействие его с липосомами

Н.Н.ТИМЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Freeze-Thawing Effect on Fetal Haemoglobin Conformation and its Interaction with Liposomes

ТІМЧЕНКО Н.Н.

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

Исследовано влияние замораживания-оттаивания на конформацию фетального гемоглобина и кинетику взаимодействия его с липосомами, сформированными из фосфатидилхолина и кардиолипина. Выявлено, что замораживание-оттаивание фетального гемоглобина приводит к сглаживанию температурозависимых конформационных изменений в молекуле. Кинетическая зависимость взаимодействия фетального гемоглобина с липосомами практически не изменяется после замораживания-оттаивания белка.

**Ключевые слова:** фетальный гемоглобин, замораживание-оттаивание, липосомы.

Досліджено вплив заморожування-відтавання на конформацію фетального гемоглобіну і кінетику взаємодії його з ліпосомами, сформованими з фосфатидилхоліну і кардіоліпіну. Виявлено, що заморожування-відтавання фетального гемоглобіну призводить до згладжування температурозалежних конформаційних змін у молекулі. Кінетична залежність взаємодії фетального гемоглобіну з ліпосомами практично не змінюється після заморожування-відтавання білка.

**Ключові слова:** фетальний гемоглобін, заморожування-відтавання, ліпосоми.

There was studied a freeze-thawing effect on fetal haemoglobin conformation and interaction of its kinetics with phosphatidylcholine- and cardiolipin- formed liposomes. It has been found that freeze-thawing of fetal haemoglobin results in smoothing of temperature-dependent conformational changes in a molecule. Kinetic dependence of fetal haemoglobin and liposomes' interaction practically does not change after the protein freeze-thawing.

**Key words:** fetal haemoglobin, freeze-thawing, liposomes.

Замораживание белков приводит к изменениям их структуры и функций. Выяснение механизмов криоповреждения белков необходимо для определения условий сохранения целостности мембран, субклеточных органелл и клеток после замораживания. Изучение взаимодействия гемоглобина с липосомальными мембранами важно для целенаправленного поиска кровезаменителей.

Проведены исследования по изучению влияния температуры на конформацию белков. Известно, что при замораживании-оттаивании изменяется конформация цитохромоксидазы [6], что приводит к замедлению реакции окисления цитохрома С, катализируемой цитохромоксидазой. Конформационный переход цитохромоксидазы отмечается в интервале температур 17÷20°C по зависимости интенсивности температурно-пертурбационных дифференциальных спектров от температуры [7]. Замораживание-оттаивание этого белка приводит к уменьшению температуры предденатурационного конформационного перехода на 2-3°C. Полностью обратимый S-образный конформационный переход наблюдается в молекуле миеломного

Proteins freezing causes the changes in their structure and functions. Elucidation of the mechanisms for proteins damage is essential in order to find the conditions of membrane integrity preservation, subcellular organelles and cells following freezing. Studying of haemoglobin interaction with liposomal membranes is of great importance for the direct search of blood-substitutes.

We have carried-out the investigations intended to studying the temperature effect on proteins conformation. It is known that during freeze-thawing cytochromoxidase conformation is changing [6], resulting in slowing the oxidation reaction of cytochrome C catalysed by cytochromoxidase. Conformational transition of cytochromoxidase is noted within the temperature range of 17÷20°C on the intensity dependence of temperature-perturbational differential spectra upon the temperature [7]. Freeze-thawing of the protein results in the temperature decrease of pre-denaturation conformational transition in 2-3°C. Absolutely reversible S-like conformational period is observed in myelogenic immunoglobulin G at pH > 6.5 within the temperature range of 25÷35°C on

**Адрес для корреспонденции:** Тимченко Н.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7726141, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Timchenko N.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7726141, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

иммуноглобулина G при  $pH > 6,5$  в области температур  $25 \div 35^\circ C$  по зависимости интенсивности температурно-дифференциального спектра от температуры [15]. Замораживание до  $-8^\circ C$  фракций гемоглобина мышей, близких по структуре к тетрамерам, приводит к образованию более компактных по размерам белковых молекул [1]. При охлаждении гемоглобина до  $-20^\circ C$  была выявлена компактизация субъединиц макромолекулы [3].

Взаимодействия гемоглобина А с модельными фосфолипидными мембранами изучались в работах [2, 9, 10]. Известно, что фетальный гемоглобин и гемоглобин А по-разному соединяются с эритроцитарной мембраной [11]. Исследования взаимодействия фетального гемоглобина с отдельными фосфолипидами и влияния на него замораживания-оттаивания этого белка в литературе не представлены.

Влияние на гемоглобин А замораживания-оттаивания исследовано недостаточно, а по фетальному гемоглобину, выделенному из кордовой крови, данные отсутствуют.

Целью работы является исследование влияния замораживания-оттаивания на конформацию фетального гемоглобина и взаимодействие этого белка с липосомами.

### Материалы и методы

Гемоглобин А выделен из донорской, а фетальный – из кордовой крови [8]. Замораживание растворов гемоглобина А и фетального гемоглобина (HbA и HbF соответственно) проводилось со средней скоростью  $20^\circ C/мин$  до температуры жидкого азота. Оттаивание осуществлялось на водяной бане при  $20^\circ C$ .

В эксперименте по изучению влияния замораживания-оттаивания на конформацию HbF использованы растворы фетального гемоглобина на  $0,05M$  натрий-фосфатном буфере,  $pH 7,4$ , содержащем  $0,15M NaCl$ . Для характеристики конформации белка использована зависимость интенсивности температурно-пертурбационных дифференциальных спектров (ТПДС) растворов фетального гемоглобина ( $\Delta E/E$ ) от температуры в интервале  $10 \div 38^\circ C$  [5]. Спектры записаны через  $2^\circ C$ , время экспозиции при каждой температуре 10 мин. Погрешность определения температуры в образце составляет  $1^\circ C$ .

В эксперименте по изучению взаимодействия гемоглобина А и фетального гемоглобина с липосомами после замораживания-оттаивания этих белков использованы растворы HbA и HbF на трис-HCl-буфере,  $pH 7,4$ , содержащем  $0,15M NaCl$ . Количество оксигемоглобинов в растворах составляло  $90 \pm 2\%$ . Используются яичный фосфа-

the intensity dependence of temperature-differential spectrum upon the temperature [15]. Freezing down to  $-8^\circ C$  of murine haemoglobin fractions with tetramere-like structure causes the formation of more compacted protein molecules [1]. When cooling haemoglobin down to  $-20^\circ C$  there was found the compactization of macromolecule subunits [3].

Interactions of haemoglobin A with model phospholipid membranes were studied in the papers [2, 9, 10]. It is known that fetal haemoglobin and haemoglobin A in a different way binds the erythrocyte's membrane [11]. No literature data presented on studying the fetal haemoglobin interaction with some phospholipids and the effect of this protein freeze-thawing on it.

The effect of haemoglobin A on freeze-thawing has been studied insufficiently, there are no data on fetal haemoglobin derived from cord blood.

Studying of freeze-thawing effect on fetal haemoglobin conformation and the protein interaction with liposomes was the aim of present work.

### Materials and methods

Haemoglobin A was isolated from donors' blood, and the fetal one was derived from cord blood [8]. Freezing of haemoglobin A and fetal one (HbA and HbF), correspondingly was accomplished with an average rate of  $20^\circ C/min$  down to the liquid nitrogen temperature. Thawing was performed on water bath at  $20^\circ C$ .

In the experiments on studying the freeze-thawing effect on HbF conformation we have used the fetal haemoglobin solutions prepared with  $0.05M$  sodium-phosphate buffer,  $pH 7.4$ , containing  $0.15 NaCl$ . For protein conformation characteristics there was used the intensity dependence of temperature-perturbation differential spectra (TPDS) of fetal haemoglobin solutions ( $\Delta E/E$ ) upon the temperature within the range of  $10 \div 38^\circ C$  [5]. The spectra were recorded in  $2^\circ C$ , exposure time at each of the temperatures is 10 min. The temperature determination error in a sample makes  $1^\circ C$ .

In the experiment on studying the haemoglobin A and fetal one interaction with liposomes following freeze-thawing of these proteins there were used HbA and HbF solutions prepared with tris-HCl buffer,  $pH 7.4$ , containing  $0.15 M NaCl$ . Oxyhaemoglobins number in the solutions made  $90 \pm 2\%$ . We have used egg phosphatidyl choline (PKh), cardiolipin (CL) derived from bovine heart ("Biolek", Kharkov). Liposomes were formed in the weight ratio of PKh:CL=4:1. To prepare liposomes using PKh/CL mixtures, ethanol solution of lipids was evaporated to a dry state, was added  $5mM$  tris-HCl buffer ( $pH 7.4$ ) containing  $0.15M NaCl$  to lipid film. Final concentration of lipids made  $20 mg/ml$ . The suspension was mechanically shaken

тидилхолин (ФХ), кардиолипин (КЛ) из сердца быка ("Биолек", Харьков). Липосомы сформированы в весовом соотношении ФХ:КЛ=4:1. Для приготовления липосом из смесей ФХ с КЛ этанольный раствор липидов был выпарен на воздухе досуха, к липидной пленке добавлен 5мМ трис-НСl-буфер (рН 7,4), содержащий 0,15М NaCl. Конечная концентрация липидов составляла 20 мг/мл. Суспензия механически встряхивалась 10 мин и полученная грубая дисперсия обрабатывалась 10 мин ультразвуком с помощью ультразвукового диспергатора на частоте 22 кГц [2]. Реакция комплексообразования оксигемоглобинов А и F с липосомами осуществлена при 20°C. Молярное соотношение белок:липид=1,7×10<sup>-3</sup>. Кинетические зависимости процессов связывания оксигемоглобинов А и F с липосомами получены регистрацией изменения оптической плотности белок-липидных смесей в максимуме полосы Cope (414 нм) [10] в течение 85 мин.

### Результаты и обсуждение

Из рисунка видно, что температурная зависимость интенсивности ТПДС раствора HbF до замораживания-оттаивания имеет S-образный вид. В эксперименте [15], проведенном на миеломном иммуноглобулине G, полученная S-образная зависимость интенсивности ТПДС от температуры связывается с наличием конформационного перехода в области температур 25÷35°C. По-видимому, можно предположить, что для фетального гемоглобина наблюдаются конформационные изменения в области температур 20÷30°C (рисунок). После замораживания-оттаивания растворов HbF происходит сглаживание изломов на зависимости ΔE/E от температуры, т.е. становятся менее заметны температурозависимые конформационные изменения в белковой молекуле.

При изучении кинетики взаимодействия белков с липосомами получили экспериментальную зависимость изменения оптической плотности от времени, которую аппроксимировали экспонентой [4]:

$$E_0 - E = A \times e^{-\frac{t}{\lambda}},$$

где  $E_0$  – начальная оптическая плотность;  $E$  – оптическая плотность в момент времени  $t$ ;  $A$  – амплитуда кинетической фазы;  $\lambda$  – кинетическая константа.

Значения параметров  $A$  и  $\lambda$  для оксиHbA и оксиHbF до замораживания-оттаивания практически не отличаются (таблица).

Авторы работы [13] считают, что взаимодействие гемоглобина с липидами включает адсорбцию гемоглобина на поверхности липидных везикул, встраивание фрагмента белковой молекулы в

within 10 min and rough dispersion was treated with ultrasound during 10 min by means of ultrasound dispersator with the frequency of 22kHz [2]. Complex-forming reaction of oxyhaemoglobins A and F with liposomes was accomplished at 20°C. Lipid/protein molar ratio was 1.7×10<sup>-3</sup>. Kinetic dependencies of oxyhaemoglobins A and F with liposomes were obtained by recording the changes of optic density of protein-lipid mixtures in the Cope band maximum (414 nm) during 85 min [10].

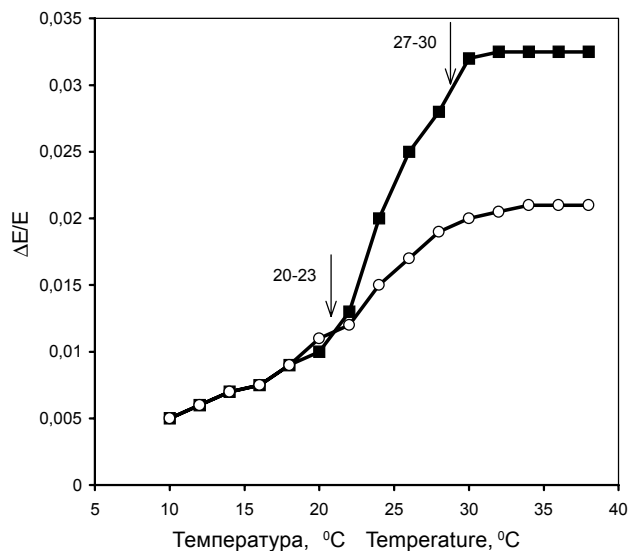
### Results and discussion

The figure shows the S-likeness of the intensity dependence of HbF TPDS solution prior to freeze-thawing. In the experiment [15] performed with myelogenic immunoglobulin G, the obtained S-like dependence of TPDS intensity upon the temperature is related to the presence of conformational transition within the temperature range of 25÷35°C. It may be supposed that conformational changes are observed within the temperature range of 20÷30°C (the figure). Following freeze-thawing of HbF solutions the smoothing of breaks in ΔE/E dependence occurs, i.e. temperature-dependent conformational changes are less visible in a protein molecule.

When studying the kinetics of protein interaction with liposomes the changes of optic density upon the time gained exponent approximated experimental dependence [4].

$$E_0 - E = A \times e^{-\frac{t}{\lambda}},$$

where  $E_0$  is primary optical density;  $E$  is optical density



Температурная зависимость интенсивности в максимуме ТПДС при 286 нм раствора фетального гемоглобина (температура сравнения 10°C); ■ – до; ○ – после замораживания-оттаивания.

Temperature dependence of the intensity in TPDS maximum at 286nm for fetal haemoglobin solution (comparative temperature 10°C); ■ – prior to freeze-thawing; ○ – following freeze-thawing.

бислой, изменение конформации белка при комплексообразовании. Кроме того, известно, что при взаимодействии окси- и метгемоглобина с липидами в модельных и природных мембранах эти формы гемоглобина принимают участие в инициации процесса ПОЛ [10, 12, 14]. Индукция ПОЛ в модельных системах сопровождается превращением оксигемоглобина в метформу [12, 14].

Замораживание оксиHbA и оксиHbF существенно не повлияло на кинетику взаимодействия белков с липосомами. Значения параметров A и  $\lambda$  до и после замораживания-оттаивания сходны как для оксиHbA, так и для оксиHbF (таблица).

### Выводы

В молекуле фетального гемоглобина конформационные изменения происходят в области температур 20÷30°C. Замораживание-оттаивание этого белка приводит к сглаживанию температурно-зависимых конформационных изменений в молекуле. Кинетические зависимости взаимодействия оксиHbF и оксиHbA с ФХ:КЛ липосомами сходны между собой. Замораживание-оттаивание оксиHbA и оксиHbF существенно не влияет на кинетику процесса взаимодействия с изучаемыми липосомами. В дальнейшем представляет интерес изучение взаимодействия фетального гемоглобина с липосомами, сформированными из фосфатидилхолина и фосфатидилсерина, так как они входят в состав эритроцитарной мембраны.

### Литература

1. *Артюхов В. Г., Путинцева О. В.* Влияние температуры на структуру молекулы гемоглобина и его функций // Известия АН Молдавской ССР. Серия биол. и хим. наук.– 1981.– №1.– С. 56-61.
2. *Бондаренко С.В., Ушакова И.П., Левит Л.Ф. и др.* Изучение взаимодействия гемоглобина с фосфолипидными везикулярными мембранами различного состава // Биоорганическая химия.– 1985.– Т.11, №10.– С. 1385-1390.
3. *Гаврилова И.И.* Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно-конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов: Дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1982.– 146 с.
4. *Горбенко Г.П.* Исследование взаимодействия белков с фосфолипидными везикулами: Дис... канд биол. наук.– Харьков, 1991.– 138 с.
5. *Демченко А.П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия белков.– Киев: Наук. думка, 1981.– 208 с.
6. *Моисеев В.А., Розанова Е.Д., Тарасенко Е.И.* Влияние замораживания-оттаивания на функциональное состояние цитохрома С и цитохромоксидазы // Криобиология .– 1981.– № 8.– С. 4-6.
7. *Розанова Е.Д., Науменко Е.И., Моисеев В.А.* Влияние замораживания-отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы // Укр. биохим. журн.– 1985.– Т.57, №1.– С. 61-64.

Кинетические параметры связывания до и после замораживания-оттаивания гемоглобина А и фетального гемоглобина с липосомами  
Kinetic binding parameters prior to and following freeze-thawing for fetal Hb and HbA with liposomes

Гемоглобин Haemoglobin		A	$\lambda$
HbA	до замораживания – оттаивания before freeze – thawing	0,006±0,001	31,96±2,74
	после замораживания – оттаивания after freeze – thawing	0,005±0,001	34,048±2,84
HbF	до замораживания – оттаивания before freeze – thawing	0,008±0,001	33,22±2,22
	после замораживания – оттаивания after freeze – thawing	0,006±0,001	34,01±2,77

at the time moment t; A is kinetic phase amplitude;  $\lambda$  is kinetic constant.

The values of A and  $\lambda$  parameters for oxyHbA and oxyHbF prior to freeze-thawing practically do not differ (Table).

The authors [13] consider, that haemoglobin interaction with lipids includes haemoglobin adsorption on lipid vesicles' surface, building-in of the fragment of a protein molecule into bilayer, the change of protein conformation at complex-formation. It is also known that during oxy- and methhaemoglobin interaction with lipids in model and natural membranes these haemoglobin forms participate in the initiation of LPO processes [10, 12, 14]. LPO induction in model systems is accompanied by oxyhaemoglobin transformation into a methform [12, 14].

Freezing of oxyHbA and oxyHbF did not affect significantly the kinetics of protein interaction with liposomes. Prior to and following the freeze-thawing the values of A and  $\lambda$  parameters are similar, both for oxyHbA and oxyHbF (Table).

### Conclusions

In a fetal haemoglobin molecule the conformational changes occur within the temperature range of 20-30°C. Freeze-thawing of the protein results in the smoothing of temperature-dependent conformational changes in a molecule. Kinetic dependencies of oxyHbF and oxyHbA relationship with PH:CL liposomes are similar. Freeze-thawing of oxyHbF and oxyHbA does not affect significantly the kinetics of the process of interaction with the liposomes studied. In future studying of the interaction of fetal haemoglobin and liposomes, formed with phosphatidyl choline and phosphatidyl serine is of great interest, as they are comprised by erythrocyte membrane.

8. *Тимченко Н.Н., Розанова Е.Д., Моисеев В.А., Хромушкин К.Н.* Изучение влияния концентрированных растворов натрия хлорида на состояние фетального гемоглобина и гемоглобина А // *Біофіз. вісник.*– 2001.– №2.– С.62-66.
9. *Ушакова И.П., Серебрянникова Г.А., Евстигнеева Р.П.* Обратимые переносчики кислорода на основе липосомальных форм производных гема и гемоглобина // *Биологические мембраны.*– 1987.– Т.4, №6.– С. 565-589.
10. *Bossi L., Alema S., Calissano P., Marra E.* Interaction of different forms of haemoglobin with artificial lipid membranes // *Biochim. et Biophys. Acta.*– 1975.– Vol. 375, №3.– P. 477-482.
11. *Fredrick W., Smith L.A., Winter W.P.* Effect of ligand state on the binding of hemoglobin to the cytoplasmic side of the red cell membrane // *Blood.*– 1991.– Vol.78, N10.– P. 88.
12. *Itabe H., Kobayashi T., Inoue K.* Generation of toxic phospholipids during oxihemoglobin-induced peroxidation of phosphatidylcholines // *Biochim. et biophys. acta.*– 1988.– Vol.861, N1.-P. 13-21
13. *Shviro Y., Zilber J., Shaklai N.* The interaction of hemoglobin with phosphotidilserine vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1982.– Vol.687.– P. 63-70.
14. *Szebeni J., Winterbourn C., Carrell R.* Oxidative interactions between hemoglobin and membrane lipids. A liposome model // *Biochem. J.*– 1984.– Vol.220.– P. 685-692.
15. *Zavialov V.P., Troitsky G.V., Demchenko O.P., Generalov I.V.* Temperature and pH dependent changes of immunoglobulin G structure // *Biochim. et biophys. acta.*– 1975.– Vol. 386.– P. 155.

*Поступила 28.01.2003*

## References

1. *Artyukhov V.G., Putintseva O.V.* Temperature effect on the structure of haemoglobin molecule and its functions // *Izvestiya Akademii nauk Moldavskoy SSR. Seriya biologicheskikh i himicheskikh nauk.*– 1981.– N1.– P. 56-61.
2. *Bondarenko S.V., Ushakova I.P., Levit L.F. et al.* Studying of haemoglobin interaction with phospholipid vesicular membranes of various content // *Bioorganicheskaya khimiya.*– 1985.– Vol.11, N10.– P. 1385-1390.
3. *Gavrilova I.I.* Studying of low temperature and cryoprotectants effect on structural and conformational transitions in some proteins and erythrocytes membranes: Thesis of the candidate of biological sciences.– Kharkov, 1982.– 146 p.
4. *Gorbenko G.P.* Studying of proteins interaction with phospholipid vesicles: Thesis of the candidate of biological sciences.– Kharkov, 1991.– 138p.
5. *Demchenko A.P.* Ultraviolet spectrophotometry of proteins.– Kiev: Naukova Dumka, 1981.– 208p.
6. *Moiseev V.A., Rozanova E.D., Tarasenko E.I.* Freeze-thawing effect on a functional state of cytochrome C and cytochromoxidase function // *Kriobiologiya.*– 1981.– N8.– P. 4-6.
7. *Rozanova E.D., Naumenko E.I., Moiseev V.A.* Freeze-thawing effect on the structure and function of cytochromoxidase // *Ukr. Biochim. Zhurn.*– 1985.– Vol.57, N1.– P. 61-64.
8. *Timchenko N.N., Rozanova E.D., Moiseev V.A., Khromushkin K.N.* Studying of the effect of sodium chloride concentrated solutions on the state of fetal haemoglobin and haemoglobin A // *Biophysical Bulletin.*– 2001.– N2.- P. 62-66.
9. *Ushakova I.P., Serebryannikova G.A., Evstegneeva R.P.* Reversible oxygen transporters on the base of liposomal forms of haem and haemoglobin derivatives // *Biol. membrany.*– 1987.– Vol.4, N6.– P. 565-589.
10. *Bossi L., Alema S., Calissano P., Marra E.* Interaction of different forms of haemoglobin with artificial lipid membranes // *Biochim. et Biophys. Acta.*– 1975.– Vol. 375, №3.– P. 477-482.
11. *Fredrick W., Smith L.A., Winter W.P.* Effect of ligand state on the binding of hemoglobin to the cytoplasmic side of the red cell membrane // *Blood.*– 1991.– Vol.78, N10.– P. 88.
12. *Itabe H., Kobayashi T., Inoue K.* Generation of toxic phospholipids during oxihemoglobin-induced peroxidation of phosphatidylcholines // *Biochim. et biophys. acta.*– 1988.– Vol.861, N1.-P. 13-21
13. *Shviro Y., Zilber J., Shaklai N.* The interaction of hemoglobin with phosphotidilserine vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1982.– Vol.687.– P. 63-70.
14. *Szebeni J., Winterbourn C., Carrell R.* Oxidative interactions between hemoglobin and membrane lipids. A liposome model // *Biochem. J.*– 1984.– Vol.220.– P. 685-692.
15. *Zavialov V.P., Troitsky G.V., Demchenko O.P., Generalov I.V.* Temperature and pH dependent changes of immunoglobulin G structure // *Biochim. et biophys. acta.*– 1975.– Vol. 386.– P. 155.

*Accepted in 28.01.2003*