

Refolding of Acid-Unfolded Globin to Hemoglobin

Jong-Woo Lee[†]

School of Alternative Medicine and Health Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

Hemoglobin is oxygen carrier protein within erythrocyte in blood. Apoprotein of this, globin, is synthesized in the cytosol but its cofactor, heme, is synthesized in the mitochondria. It has not been known very well how globin receives the heme from mitochondria and folds to hemoglobin. In this folding process, the initial structure of globin seems to be very important. A small volume of globin at acid pH was added rapidly into the bulk of an egg phosphatidylcholine 60% liposome, containing hemins, at neutral pH according to the Rapid Dilution method. It was observed that an acid-induced unfolding structure of globin is initially needed to receive hemins from the lipid bilayer of liposomes. Also, this conclusion was confirmed with the absorption spectrum of the refolded globin separated by centrifugation.

Key Words: Hemoglobin, Protein folding, Heme, Liposome

Hemoglobin은 적혈구 내의 산소운반 단백질로 주된 기능은 호흡에 의해 들어온 산소를 세포 내로 운반하고, 체내에서 대사결과로 생산된 이산화탄소를 폐로 운반하는 것이다. 이러한 hemoglobin은 2개의 α chain과 2개의 β chain으로 구성된 4차 구조를 이루고 있으며 각각의 chain에 각각 하나씩의 heme이 비공유 결합되어 있다 (Gelin and Karplus, 1977; Craescu et al., 1990). 미성숙 적혈구에서 globin (hemoglobin에서 heme이 제거된 단백질)은 리보솜에 의해 합성되어져 $\alpha\beta$ dimer의 형태로 원형질에 존재하지만, heme은 미토콘드리아의 내막에 위치한 ferrochelatase에 의해 protoporphyrin IX 안에 철분이 포획되면서 형성되어 미토콘드리아 막에 존재한다 (Schwartz et al., 1959; Nathan et al., 1961; Grayzel et al., 1966; Hunt et al., 1972; Fuhr and Gengozian, 1973; Ponka et al., 1973; Granick and Beale, 1978; Taketani and Tokunaga, 1982). 이렇게 원형질과 미토콘드리아 막에 각각 존재하는 globin과 heme은 서로 상호작용하여 globin이 heme을 포획함으로써 최종적으로 hemoglobin으로 folding하게 된다.

여기에서 heme이 globin으로 삽입되는 과정 뿐만 아니라 hemoglobin의 subunit assembly에 대하여 많이 연구되어져 왔음에도 불구하고, hemoglobin tetramer assembly 전체 과정의 어떤 단계에서 heme이 globin으로 삽입되는지에 대한 자세한 특성은 아직 알려지지 않았다 (Gibson and Antonini, 1963; Leutzinger and Beychok, 1981; Bunn, 1987). 그러나, globin 이

heme을 포획하여 hemoglobin으로 folding되는 과정에 대해서 두 가지 기작이 제안되었다. 첫 번째가 globin이 합성되는 중간 과정에 heme이 globin 안으로 결합된다는 cotranslational folding mechanism이다. Komar 등은 리보솜에 부착되어 합성 중에 있는 globin 사슬에 heme이 결합한다고 보고하였다 (Komar et al., 1993). 그 후 Komar 등은 [³H]hemin과 [³⁵S]methionine을 이용한 실험에서 적어도 86개의 아미노산 잔기로 구성된 globin 사슬이 있어야 heme이 결합할 수 있다고 보고하였다 (Komar et al., 1997).

두 번째는 globin이 모두 합성되어진 후에 미토콘드리아에서 합성되어진 heme이 globin으로 이동되어 결합한다는 post-translational folding mechanism이다 (Javaherian and Beychok, 1968; Morris and Liang, 1968; Leutzinger and Beychok, 1981; Jennings and McDonald, 2002). Smith와 Morgan은 생체막에서 heme-binding protein으로의 heme 이동에 단백질 운반체가 필요하다고 제안하였다 (Smith and Morgan, 1981). 반면에, Rose 등은 hemin을 포획하고 있는 리포솜이 heme-binding protein과 상호작용하면 어떠한 단백질의 도움 없이도 hemin은 리포솜에서 단백질로 빠르게 이동할 뿐만 아니라 막과 막 사이를 매우 빠른 속도로 이동할 수 있다고 보고하였다 (Rose et al., 1985). 또한, Cannon 등은 음전하를 띠는 리포솜에 존재하는 hemin이 양전하를 띠고 있는 리포솜에서 보다 약 5 배 정도 빠르게 단백질로 이동된다고 보고하였다 (Cannon et al., 1984).

한편, globin은 낮은 pH에서 보다 더 unfolding되어 있고, 리포솜과 강하게 상호작용하여 높은 [인지질]/[단백질] 비율에서는 막 융합을 일으키고 낮은 [인지질]/[단백질] 비율에서는 막 단편화를 일으키는 것이 보고되었다 (Hahn and

^{*} 논문 접수: 2005년 2월 14일

수정재접수: 2005년 2월 22일

[†] 교신저자: 이종우, (우) 560-759 전북 전주시 완산구 효자동3가 1200.

전주대학교 의생명환경대학 대체건강관리학부

Tel: 063-220-2676, Fax: 063-220-2054

e-mail: jwlee@jj.ac.kr

Kim, 1991; Lee and Kim, 1992). 이러한 결과들은 hemoglobin의 post-translational folding 과정이 pH 변화에 크게 의존할 것이라는 것을 암시한다. 이에 따라 본 연구에서는 hemin을 함유한 리포솜과 globin 사이의 상호작용을 통한 hemin의 이동이 pH의 빠른 변화 과정에서 어떻게 진행되는지를 관찰하였다.

Hemin 함유 리포솜과 Acid-unfolded Globin의 상호작용

미성숙 적혈구 내에서 globin으로 이동되는 heme는 미토콘드리아에서 합성되어 미토콘드리아 외막을 통해 얻어지므로, 본 실험에 사용할 리포솜은 미토콘드리아의 외막과 인지질 조성이 유사해야 한다. 미토콘드리아 외막의 인지질 조성은 일반적으로 phosphatidylcholine (PC) 49~59%, phosphatidylethanolamine (PE) 20~31%로 구성되어 있으나 (Levy and Sauner, 1967; Stoffel and Schiefer, 1968), 본 실험에서는 60%의 PC와 나머지 대부분이 PE로 구성된 egg PC 60% (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 또한, 리포솜 내에 hemin을 포획시키기 위한 hemin 용액은 hemin을 0.01 M NaOH에 용해하여 제조하였으며, 이때 사용한 hemin 용액은 매 실험 때마다 새롭게 제조하여 사용하였다.

Egg PC 60%와 형광물질인 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenehexanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (β -py-C₆-HPC, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 100/1 (w/w)로 혼합하여 pH 7에

서 제조한 리포솜 (0.15 mg/mL) 2 mL에 0.5 μ g의 hemin을 재빨리 첨가한 후, spectrofluorometer (Kontron, SFM 25)를 사용하여 37°C에서 시간에 따른 형광 세기의 변화를 30초간 관찰하였다. 이 때 사용한 excitation wavelength는 343 nm이고, emission wavelength는 377 nm였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 β -py-C₆-HPC의 형광 세기가 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 리포솜 외부에 첨가된 hemin이 리포솜의 인지질막 내부로 빠른 속도로 포획되어 β -py-C₆-HPC의 형광 세기가 fluorescence energy transfer 과정을 통해 감소되었기 때문에 나타나는 현상으로, hemin이 인지질막 내부의 소수성 영역으로 매우 빠르게 이동된다는 Cannon 등의 결과와 일치하는 것이다 (Cannon et al., 1984).

다음으로 이렇게 hemin을 함유한 리포솜 (pH 7)에 pH 3의 globin (35, 70, 350, 700 μ g)을 각각 40-fold dilution으로 재빨리 첨가하여 globin이 hemoglobin으로 refolding되는 과정을 관찰하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 3에서의 globin이 pH 7에서의 hemin 함유 리포솜에 첨가될 경우 형광의 세기가 급속히 증가하였다. 이러한 형광 세기의 증가는 리포솜 내부의 hemin이 빠르게 globin으로 이동되었음을 의미한다. 또한, globin에 대한 hemin의 결합 부위가 subunit 당 1개이므로 첨가되는 globin의 농도가 증가됨에 따라 β -py-C₆-HPC의 형광 세기가 증가되다가 포화상태에 도달하였다. 이러한 결과는 단백질 운반체의 도움 없이도 pH의 빠른 변화와 같은 물리적 환경의 변화에 의해서 hemin이 globin으로 이동될 수 있음을 의미한다.

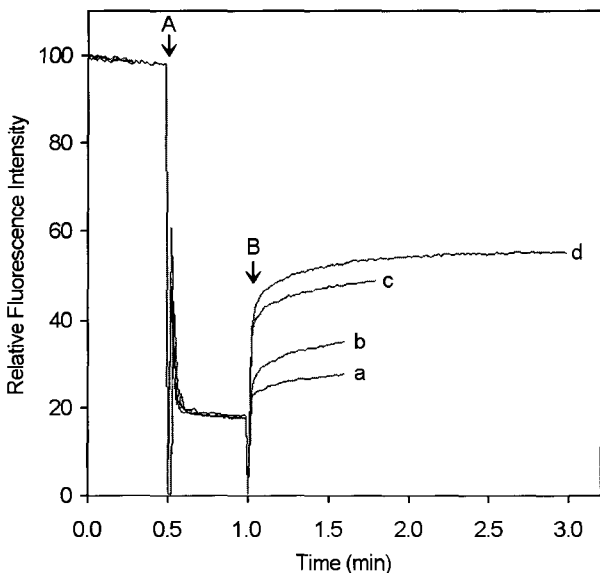


Fig. 1. Kinetics of hemin transfer from the lipid bilayer of liposome to globin. Various amounts of globin (a, 35 μ g; b, 70 μ g; c, 350 μ g; d, 700 μ g at pH 3) were added to the liposome (arrow B) after the addition of hemin (arrow A).

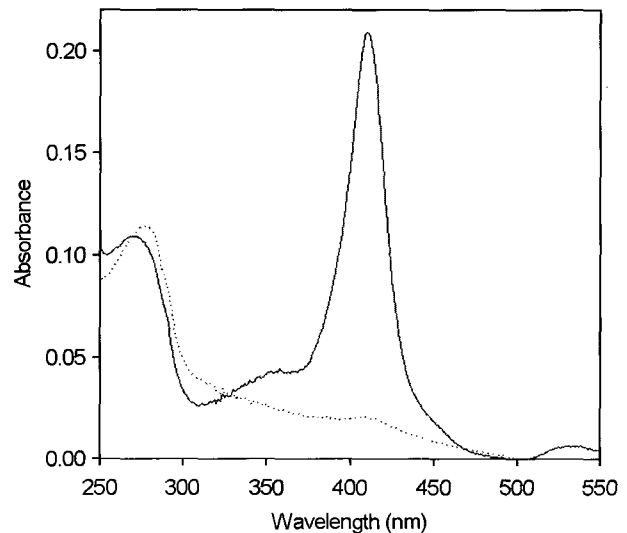


Fig. 2. UV-visible absorbance spectrum of refolded globin (—) and globin alone (···). The refolded globin was obtained from the supernatant after centrifugation of the mixture of hemin-containing liposome at pH 7 and globin at pH 3.

Hemin을 획득한 Refolded Globin의 UV-visible Absorbance Spectrum

Hemin이 리포솜에서 globin으로 이동되었음을 확인하기 위하여 refolded globin의 UV-visible absorbance spectrum을 다음과 같은 방법으로 관찰하였다. pH 7에서 egg PC 60%로 제조한 리포솜 (1.34 mg/mL)에 hemin 용액 (2.5 µg/mL)을 첨가한 후에 pH 3의 globin 용액 (300 µg/mL)을 40-fold dilution으로 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 충분히 반응을 시켰다. 그런 후에 원심분리기 (Hamil, Micro 17R+)를 이용하여 17,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하고 상층액을 취하였다. Globin으로 이동된 hemin의 Soret band를 확인하기 위하여, 이 상층액의 UV-visible absorbance spectrum (250 nm~700 nm)을 UV-visible spectrophotometer (Perkin Elmer, LAMDA16)를 사용하여 측정하였다.

Hemin을 획득하기 전의 globin에서는 hemin의 Soret band가 411 nm에서 약하게 관찰되었으나, globin이 egg PC 60%의 리포솜에서 hemin을 획득한 상태에서는 hemin의 Soret band가 411 nm에서 강하게 나타났다 (Fig. 2). 이러한 결과는 리포솜의 인지질막에 포획된 hemin이 globin으로 이동하여 globin이 hemoglobin으로 refolding 되었음을 보다 더 확실하게 증명하는 것이다. 또한, PE는 heme protein의 folding에 관여하는 non-protein chaperone의 기능을 가지고 있다는 보고에 따라 (Bogdanov et al., 1996; Bogdanov and Dowhan, 1998; Bogdanov and Dowhan, 1999; Debnath et al., 2003), egg PC 60%에 포함된 PE는 hemoglobin의 refolding 과정에서 안정된 hemoglobin 구조를 형성하도록 도와줄 것으로 보인다.

결 론: Acid-unfolded Globin의 Refolding

pH에 따른 globin과 리포솜 사이의 상호작용에 대한 연구 결과에 따르면, pH 5 이하의 낮은 pH에서 globin은 인지질과 높은 상호작용을 하며, phosphatidylserine (PS)이나 PE가 함유된 경우에 globin β subunit의 N 말단이 주로 관여하여 막 융합을 유도한 것으로 보고되었다 (Hahn and Kim, 1991). 반면에, globin과 3차 구조가 유사한 myoglobin과 apomyoglobin의 리포솜과의 상호작용에 대한 연구 결과에 따르면, myoglobin은 pH 5 이하에서 리포솜과 강하게 상호작용하지만 pH 7에서는 상호작용하지 않고, apomyoglobin은 myoglobin 보다는 약하지만 pH 5 이하에서 뿐만 아니라 pH 7에서도 상호작용하는 것으로 보고되었다 (Choi et al., 1992; Lee and Kim, 1992).

이러한 결과들과 본 실험의 결과를 종합하여 acid-unfolded globin이 hemoglobin으로 refolding되는 과정을 전체적으로

요약하면 다음과 같다. pH 3에서 unfolding되어 있는 globin이 pH 7의 hemin 함유 리포솜 용액에 희석 첨가되면, unfolding되어 있는 globin이 리포솜에 결합하게 되고 이 때 리포솜 내에 함유된 hemin을 포획하게 되면서 보다 더 folding된 구조를 갖게 될 것이다. 이러한 상황에서 용액의 pH가 3에서 7로 바뀌게 되면서 hemin을 포획한 globin은 리포솜과 더 이상 상호작용을 하지 못하고 hemoglobin의 형태로 용액 상으로 떨어져 나오며, 이 때 리포솜에 존재하는 PE는 떨어져 나온 hemoglobin의 구조가 안정한 구조를 이루도록 상호작용할 것으로 보인다.

REFERENCES

- Bogdanov M, Dowhan W. Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *EMBO J.* 1998. 17: 5255-5264.
- Bogdanov M, Dowhan W. Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem.* 1999. 274: 36827-36830.
- Bogdanov M, Sun J, Kaback HR, Dowhan W. A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein. *J Biol Chem.* 1996. 271: 11615-11618.
- Bunn HF. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood.* 1987. 69: 1-6.
- Cannon JB, Kuo FS, Pasternack RF, Wong NM, Muller-Eberhard U. Kinetics of the interaction of hemin liposomes with heme binding proteins. *Biochemistry.* 1984. 23: 3715-3721.
- Choi YH, Lee JW, Kim H. Interaction of oxymyoglobin and apomyoglobin with phospholipid vesicles at low pH. *Mol Cells.* 1992. 2: 75-81.
- Craescu CT, Mispelter J, Blouquit Y. Coupling of tertiary and quaternary changes in human hemoglobin: a 1D and 2D NMR study of hemoglobin Saint Mandé (beta N102Y). *Biochemistry.* 1990. 29: 3953-3958.
- Debnath D, Bhattacharya S, Chakrabarti A. Phospholipid assisted folding of a denatured heme protein: effect of phosphatidylethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. 301: 979-984.
- Fuhr JE, Gengozian N. Coordination of heme and globin synthesis in primate reticulocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1973. 320: 53-58.
- Gelin BR, Karplus M. Mechanism of tertiary structural change in hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977. 74: 801-805.
- Gibson QH, Antonini E. Rates of reaction of native human globin with some hemes. *J Biol Chem.* 1963. 238: 1384-1388.

- Granick S, Beale SI. Hemes, chlorophylls, and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1978. 46: 33-203.
- Grayzel AI, Horchner P, London IM. The stimulation of globin synthesis by heme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1966. 55: 650-655.
- Hahn KH, Kim H. Fusion and fragmentation of phospholipid vesicles by apohemoglobin at low pH. *J Biochem (Tokyo).* 1991. 110: 635-640.
- Hunt T, Vanderhoff G, London IM. Control of globin synthesis: the role of heme. *J Mol Biol.* 1972. 66: 471-481.
- Javaherian K, Beychok S. Subunit interactions in the conformational change of horse apohemoglobin on binding of hemin. *J Mol Biol.* 1968. 37: 1-11.
- Jennings TM, McDonald MJ. Esterification of the propionate groups promotes alpha/beta hemoglobin chain homogeneity of CN-hemin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 293: 1354-1357.
- Komar AA, Kommer A, Krasheninnikov IA, Spirin AS. Cotranslational heme binding to nascent globin chains. *FEBS Lett.* 1993. 326: 261-263.
- Komar AA, Kommer A, Krasheninnikov IA, Spirin AS. Cotranslational folding of globin. *J Biol Chem.* 1997. 272: 10646-10651.
- Lee JW, Kim H. Fragmentation of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles by apomyoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 1992. 297: 354-361.
- Leutzinger Y, Beychok S. Kinetics and mechanism of heme-induced refolding of human alpha-globin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981. 78: 780-784.
- Levy M, Sauner MT. [Phospholipid composition of internal and external mitochondrial membranes]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1967. 161: 277-279.
- Morris AJ, Liang K. Interaction of globin and heme during hemoglobin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 1968. 125: 468-479.
- Nathan DG, Piomelli S, Gardner FH. The synthesis of heme and globin in the maturing human erythroid cell. *J Clin Invest.* 1961. 40: 940-946.
- Ponka P, Borova J, Neuwirt J. Accumulation of heme in mitochondria from rabbit reticulocytes with inhibited globin synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1973. 304: 715-718.
- Rose MY, Thompson RA, Light WR, Olson JS. Heme transfer between phospholipid membranes and uptake by apohemoglobin. *J Biol Chem.* 1985. 260: 6632-6640.
- Schwartz HC, Hill RL, Cartwright GE, Wintrobe MM. The stimulation of heme synthesis by globin. *Biochim Biophys Acta.* 1959. 36: 567-568.
- Smith A, Morgan WT. Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1981. 256: 10902-10909.
- Stoffel W, Schiefer HG. Biosynthesis and composition of phosphatides in outer and inner mitochondrial membranes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1968. 349: 1017-1026.
- Taketani S, Tokunaga R. Purification and substrate specificity of bovine liver-ferrochelatase. *Eur J Biochem.* 1982. 127: 443-447.