

*На правах рукописи*

**ЗАГУЛОВСКИЙ**  
**Евгений Аркадьевич**

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ  
ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСПОРТА ЦИСПЛАТИНА В  
КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ БЕЛКА STR1**

03.01.04 – биохимия

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**

2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный политехнический университет и в Учреждении Российской Академии медицинских наук Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины СЗО РАМН

**Научные руководители:**

д.б.н., проф.

Людмила Валентиновна Пучкова

к.ф.-м.н.

Алексей Николаевич Скворцов

**Официальные оппоненты:**

д.ф.-м.н., проф. Андрей Леонидович Тимковский

чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. Михаил Владимирович Дубина

**Ведущее научное учреждение:** Институт цитологии РАН

Защита состоится «28» декабря 2010 г. в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета Д001.022.03 по защите докторских и кандидатских диссертаций при НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, 197376, Каменноостровский пр. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НИИЭМ СЗО РАМН (197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12).

Автореферат разослан «        » ноября 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор биологических наук, проф.

Л.В. Пучкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Роль меди как структурного и каталитического ко-фактора ряда жизненно важных ферментов известна более полувека и на протяжении этих лет интенсивно изучается (*Karlin, 1993; Turnlund et al., 1998*). В последние годы выявлены и другие биологические функции меди. Во-первых, установлено, что уровень меди в клетке контролирует клеточный цикл через X-сцепленный ингибитор апоптоза (*Mufti, et al., 2007*) и, во-вторых, распределение меди в клетке оказывает влияние на соотношение гликолиза и дыхания в опухолях (эффект Варбурга; *Zhivotovsky, Orrenius, 2009*). В то же время, ионы меди могут быть высоко токсичными агентами, так как в свободном состоянии катализируют образование активных метаболитов кислорода. Для безопасного переноса меди у эукариотов существует система транспортеров, включающая не менее 10 мембранных и цитозольных белков, в которой медь передается при прямом контакте холо-переносчика с апо-транспортером в одном направлении по увеличению аффинности к иону меди (*Kim et al., 2008*). Даже незначительные изменения структуры этих белков ведут к дисбалансу меди, который провоцирует развитие таких тяжелых заболеваний, как рак, нейродегенеративные болезни, фибриллогенез, остеопороз и другие.

В реализации биологических функций меди ключевым событием является ее перенос в клетку. Он осуществляется белком CTR1 (copper transporter 1), относящимся к семейству высокоаффинных импортеров меди (*Sharp, 2003*). Нокаут гена *CTR1* у мышей приводит к ранней гибели эмбрионов-гомозигот, а у гетерозигот – к развитию дефицита меди, при этом содержание меди изменяется тканеспецифично (*Lee, 2000*). На ранних этапах эмбрионального развития амфибий и млекопитающих белок CTR1 участвует также в морфогенезе и дифференцировке клеток (*Haremake et al., 2007; Haremake et al., 2009*). К тому же белок CTR1 участвует в импорте цисплатина, широко используемого противоопухолевого платинового препарата (*Ishida et al., 2002; Holzer et al., 2006*). Однако до сих пор не рассматривался вопрос о том, может ли белок CTR1 транспортировать и медь, и платину, координационная химия которых столь различна; и, поэтому, связан ли транспорт платины с уровнем внеклеточной меди. Ответы на эти вопросы важны для понимания общего механизма транспорта меди в клетки и механизма поступления в клетки цисплатина. Представленная диссертация выполнена с учетом актуальности изложенной проблемы.

**Цель** представленной работы состоит в разработке модели для изучения связи между уровнем внеклеточной меди и транспортом цисплатина в клетки.

Для достижения заявленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить координационные свойства металлосвязывающих консервативных N-концевых мотивов белка CTR1 и создать теоретическую модель, объясняющую способность CTR1 переносить платину.
2. Разработать животную модель с изменяющимся уровнем внеклеточной меди.

3. Проверить полученную модель на возможность использования ее для изучения связи между метаболизмом меди и транспортом цисплатина.

**Научная новизна полученных результатов.** С помощью методов молекулярной эволюции показано, что медьсвязывающие мотивы N-концевого участка белка *CTR1* являются внеклеточными нуклеофильными сайтами с селективной специфичностью по отношению к Cu(I), к Cu(II) и к Pt(II). Пространственная сближенность этих сайтов создает условия для внутримолекулярного восстановления меди (II) и транспорта цисплатина при ее участии. На модели мышей, получавших серебро с пищей, показано, что ионы Ag(I), изоэлектронные Cu(I), узнаются белками метаболической системы меди (МСМ) и переносятся ими по межклеточным и внутриклеточным маршрутам меди. Серебро метаболически включается в церулоплазмин (ЦП), основной внеклеточный медьтранспортный белок позвоночных, что приводит к снижению количества атомов меди на молекулу ЦП, к нарушению его третичной структуры и потере каталитических активностей. В печени Ag-животных синтез и активность генов медьтранспортных белков и купроэнзимов не изменяется. Таким образом, Ag-диета избирательно вызывает снижение содержания только той меди, которая ассоциирована с ЦП. Дефицит меди в этой форме снижает скорость роста опухолей человека у иммунодефицитных мышей. Наличие ионов серебра во внеклеточной среде влияет на цитотоксические свойства цисплатина. Скорость поступления цисплатина в клетки снижена у животных с низким уровнем внеклеточной меди.

**Научно-практическое значение полученных результатов** состоит в том, что они углубляют знания о механизмах, лежащих в основе нарушений метаболизма меди, ведущих к развитию медь-ассоциированных болезней; кроме того, они расширяют общие представления о метаболизме металлов в организме млекопитающих. В практическом плане, использование разработанной модели животных с изменяющимся уровнем меди в крови позволит изучить роль меди в индукции и скорости роста опухолей. Выявление связи между уровнем меди во внеклеточной среде и токсическим эффектом цисплатина открывает перспективу для оптимизации протоколов применения этого противоопухолевого препарата в клинике.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Белок *CTR1* импортирует цисплатин при участии ионов меди Cu(II).
2. У лабораторных грызунов Ag-диета вызывает обратимое снижение содержания меди, ассоциированной с ЦП, и не влияет на метаболизм меди в печени.
3. Дефицит меди, индуцированный Ag-диетой, может быть компенсирован однократным введением сульфата меди.
4. Скорость роста опухолей человека в организме иммунодефицитных мышей снижается при дефиците меди, связанной с ЦП.
5. Ионы серебра влияют на цитотоксическое действие цисплатина.
6. Распределение цисплатина в организме мышей зависит от уровня меди в крови.



**Апробация результатов работы.** По теме диссертации опубликовано пять статей, четыре из которых – в журналах, включенных в список ВАК РФ. Результаты работы были представлены на 11-й, 12-й и 14-й Пущинских школах-конференциях молодых учёных «Биология — наука XXI века» (Пушино-на-Оке, Московская область, 2007, 2008 и 2010 г.), устные сообщения; на Международной конференции по системной биологии, биоинформатике и синтетической биологии (Манчестер, Великобритания, 2007 г.), стендовое сообщение; на I Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2008» (Казань, 2008 г.), устное сообщение; на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008 г.), а также на 38-ой Международной конференции по координационной химии (Иерусалим, Израиль, 2008 г.); на VI Съезде Российского общества Медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, май 2010) и на 4-ом Международном симпозиуме по микроэлементам и минералам в медицине и биологии (СПб, июнь 2010), устное сообщение.

**Личный вклад соискателя.** Планирование работы, анализ докинг-взаимодействий, компьютерный анализ нуклеотидных и а.к. последовательностей, получение большей части экспериментальных результатов и написание статей выполнены соискателем.

**Структура диссертации.** Рукопись содержит «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список цитированной литературы». Диссертация изложена на 146 страницах, включающих библиографию (178 источников, из которых 167 на английском языке), 3 таблицы и 42 рисунка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы мыши линий C57Bl и CD-1; клеточные культуры линий HCT116 и SKOV3; крысы линии Вистар; антитела к ЦП человека и крысы; антитела к пептидам, соответствующим участкам белков CTR1 и ATR7B; а также антитела фирмы «Abcam» (США) к СОД1, СОХ, VDAC, HTRA2, p53, цитохрому с и β-актину. Реактивы для электрофореза – фирмы «Sigma».

**Тотальную РНК** изолировали с использованием реактива “TRIzol Reagent”. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. **Гель-электрофорез** ПЦР-продуктов проводили в 1% агарозном геле. Гели окрашивали этидий бромидом (*Sambrook et al., 1989*). **Синтез кДНК в реакции обратной транскрипции** (ОТ) проводили на тотальной РНК со случайными праймерами, как описано ранее (*Васин и др., 2004*). **ПЦР на полученной кДНК** проводили со специфическими праймерами для CTR1, ЦП, ГФИ-ЦП (ЦП, связанного с плазматической мембраной через гликозилфосфатидинозитоловый якорь), СОХ, СОД1 и β-актина, как описано ранее (*Клотченко и др., 2008*). Для полуколичественной характеристики экспрессии генов использовали соотношение между уровнем мРНК β-актина и мРНК исследуемого гена (*Marone et al., 2001*). **ЦП выделяли** методом, описанным ранее (*Manolis&Cox, 1980*). Для сравнительного анализа очищенных препаратов ЦП и Ag-ЦП использовали **измерение кругового дихроизма, UV/vis спектрофотометрию и дифференциальную сканирующую калориметрию**. **Выделение субклеточных фракций** из гомогената клеток, приготовленного в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,04% β-меркаптоэтанол, смесь ингибиторов протеаз фирмы “Sigma” (США) проводили методом дифференциального или равновесного центрифугирования (*Васин и др., 2005*). **Электрофорез белков** проводили в ПААГ в неденатурирующих условиях, или в присутствии 0.1%-ного DСН по методу Laemmli (1970). **Перенос белков** из ПААГ на нитроцеллюлозную

мембрану осуществляли полусухим методом или в буфере. Специфические иммунные комплексы выявляли после гибридизации со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой, с помощью хемиллюминесцентных проявителей. **Концентрацию меди, серебра и платины** измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре «Perkin-Elmer», Model 4100ZL, США. **Оксидазную, ферроксидазную и супероксиддисмутазную активности** определяли окрашиванием геля на соответствующие ферменты, используя специфические абиогенные субстраты.

Из открытой базы данных Entrez ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) были извлечены следующие а.к. последовательности CTR1: NP\_001850.1, NP\_598284.1, NP\_780299.1, AAL49494.1, CAD13301.1, AAN53785.1, AAL76092.1, AAM75086.1, EAA01481.1, CAE66920.1, CAB51175.1, CAB87806.1, SAC83163.2, CAB38165.1, NP\_015449.1. **Для анализа а.к. и нуклеотидных последовательностей** использовали программы ClustalX ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)), UCSC Proteome Browser ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)), Multalin (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>), Cobalt (NCBI). **Расчеты геометрии молекулярных структур и энергий** взаимодействия выполнены методами молекулярной механики AMBER, полуэмпирического квантовохимического расчета в параметризации CNDO и *ab initio* в базисе 6-31G\*, реализованными в программе HyperChem 7.01 (HyperCube). **Визуализация рассчитанных структур** проведена с использованием программ RasMol 2.7, HyperChem 7.01. **Для характеристики белок-белковых взаимодействий** между возможными донорами и акцепторами меди для CTR1 использовалась программа Hex 4.5. **Результаты докинга**, принадлежащие к структурным кластерам (пространственно близким результатам докинга), были упорядочены по энергиям и проанализированы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Филогенетический анализ белков CTR1 позвоночных

Учитывая данные о структуре купрофильной поры CTR1 и медьсвязывающего мотива в цитозольном домене CTR1, полученные нами ранее (Самсонов и др., 2006), в этом исследовании основное внимание уделено анализу структуры внеклеточного N-концевого домена и трансмембранного домена 1 (ТМД1) CTR1.

Филогенетический анализ N-концевого домена CTR1 показал, что он является наиболее варибельным участком CTR1, однако в его строении могут быть выделены следующие закономерности:

1. Домен содержит необычно большое количество остатков метионина, часто собранных в кластеры MM, MXM и MXXM, где X – чаще всего Gly или Ser.

2. Он обогащен остатками Glu и Asp и содержит мало остатков Lys и Arg, что должно благоприятствовать электростатическому притяжению катионов.

3. У многих видов N-конец содержит идеальные или несовершенные метионин-богатые повторы (длиной от 3 до 19 а.о.), количество повторов варьирует у близких видов.

4. У многоклеточных животных N-конец обогащен остатками His, которые также собраны в кластеры. У одноклеточных и грибов N-конец CTR1 часто вообще не содержит His и образован преимущественно Met, Ser/Thr и Asp.

5. Внеклеточный домен CTR1 содержит один или несколько потенциальных сайтов N-гликозилирования.

6. Остатки Cys в N-концевых доменах CTR1 отсутствуют.

7. Предсказание вторичной структуры не дает каких-либо предпочтительных элементов вторичной структуры у этого домена. Кроме того, он содержит остатки Pro, положение которых в эволюции неконсервативно.

Анализ а.к. последовательностей позволяет сделать вывод, что решающее значение в эволюции N-концевого домена CTR1 имеет не конкретная первичная или вторичная структура сайтов, а содержание в них а.о., способных координировать медь, и взаимное пространственное расположение этих сайтов.

У позвоночных структура N-конца значительно более упорядочена, чем в общем по эукариотам. В нем можно выделить His-Met богатый сайт (медьсвязывающий мотив 1), гистидиновый сайт (медьсвязывающий мотив 2), глициновый линкер и метиониновый кластер (медьсвязывающий мотив 3). Число остатков His и Met и их расположение в мотиве 1 варьирует, обычно в этом мотиве также присутствуют Asp/Glu. Мотив 1 и мотив 2 разделены одним или несколькими остатками Pro, у млекопитающих в этой же области находится сайт N-гликозилирования. Число остатков His в мотиве 2 и его а.к. состав переменны (у млекопитающих он содержит 4-5 остатков His), но расположение остатков His относительно консервативно. Глициновый линкер, разделяющий мотивы 2 и 3, является переменным участком, его длина не совпадает даже у близких видов. Мотив 3 у позвоночных имеет последовательность (M)MMXM, где в качестве X обнаруживаются Gln, Pro, His, Ala и Lys; кодоны, соответствующие этим а.о. могут быть получены друг из друга путем одиночных нуклеотидных замен. Поскольку замены а.о. в этом положении в эволюции происходили неоднократно, следует предположить, что значение этого остатка принципиально для функционирования мотива 3, в отличие от каждого из остатков метионина.

Накопившиеся данные по структуре и функции Cu(I)-связывающих белков прокариот (CusA, PcoA, CopA, CopK, CopC, шаперон DR1885, N-концевой домен прокариотических СОД), указывают на то, что сайт, образованный только остатками Met может рассматриваться как новый самостоятельный и широко представленный в эволюции класс Cu(I)/Ag(I)-связывающих сайтов. Именно к этому классу принадлежат медьсвязывающие сайты CTR1, что подтверждается закономерностями связывания металлов с пептидами, соответствующими N-концу CTR1 позвоночных (*Rubino et al., 2010*). У метионина боковая группа, в силу наличия двух метиленовых групп, имеет большую конформационную свободу, чем боковые группы Cys и His. Кроме того, атом серы тиоэфирной группы имеет две неподеленные пары электронов и может образовывать координационные связи в двух близких направлениях, легко изомеризующиеся друг в друга за счет поворота на 60° вокруг C-S связи. Поэтому, по конформационной жесткости метиониновый комплекс является значительно более "рыхлым", чем цистеиновый или гистидиновый. Хелатный эффект для метионинового комплекса будет слабее, поэтому Met-сайт должен легко отдавать медь другим сайтам. Поскольку CTR1 функционирует в виде гомотримерного тригонального канала, устье которого образовано поворотами между ТМД2 и ТМД3, а три мотива 3 могут быть сближены друг с другом и с устьем канала за счет гидрофобного взаимодействия, то локальная концентрация

остатков метионина здесь очень велика. Это создает идеальные условия образования комплексов меди (I). Наличие отрицательно-заряженных а.о. способствует электростатическому притяжению катионов, а гидрофильность дистальной части N-концов и их гликозилирование препятствуют слипанию с мембраной и друг с другом.

Канонический анализ топологии доменов в белке CTR1 предсказывает, что ТМД1 начинается с 68 а.о. и продолжается до 86 а.о., он расположен на расстоянии 22 а.о. от описанного выше метионинового сайта (*Sharp, 2003*). Предполагаемое начало ТМД1 определяется нечетко, так как CTR1 содержит достаточно протяженную область гидрофобных а.о., разделенных единичными заряженными а.о. (рис. 1, см. вкладку). Поэтому допустимо считать, что начало ТМД1 расположено значительно ближе к N-концу, чем следует из канонического анализа трансмембранных доменов, то есть длина ТМД1 может составлять 27-29 а.о., а метионин-богатый мотив 3 располагается у устья купрофильной поры вблизи критических для переноса меди остатков метионина 150 и 154, принадлежащих ТМД2. Длина консервативного линкера между удлинненным ТМД1 и мотивом 3 позволяет последнему сближаться с устьем канала. Так как Met-домены не обладают конформационной жесткостью, геометрия образуемых ими комплексов, скорее всего, не фиксирована, поэтому специфичность по отношению к Cu(I) невелика, а лабильность (характеризуется скоростью образования и распада комплекса в реакциях нуклеофильного замещения) значительна. Теоретически, эти мотивы должны связывать любые мягкие электрофилы – Cu(I), Ag(I), Hg(II), Pt(II), Au(III) и т.п., что отчасти подтверждается экспериментально (*Rubino et al., 2010; Arnesano et al., 2008*).

Таким образом, описанные свойства N-концевого домена CTR1 полностью соответствуют его биологической роли, которая состоит в первичном захвате иона меди и удержании его в восстановленном состоянии вблизи устья канала, образованного ТМД2 и ТМД3. Наличие большого количества мягких нуклеофильных групп и изоляция иона от молекул воды в гидрофобном метиониновом окружении мотивов 3 делают восстановленную форму Cu(I) энергетически более выгодной, чем Cu(II), и препятствуют окислению или диспропорционированию: ион(ы) меди (I) "растворен(ы)" в прочно связанной вблизи устья канала нанокляпке тиоэфира. В отличие от медьтранспортных белков, в данном случае специфичность первичного связывания не очень важна, так как общая высокая аффинность транспорта по отношению к Cu(I)/Ag(I), скорее всего, определяется далее сайтами по ходу канала (например, Met150 и Met154 (*Guo et al., 2004*)). Эти сайты находятся в предорганизованной геометрии (*De Feo et al., 2009*), а поэтому энергетически более выгодны для соответствующих по свойствам ионов в силу увеличения хелатного эффекта.

## **2. Предполагаемое функциональное значение медьсвязывающих мотивов N-конца CTR1 позвоночных**

Значительная консервативность N-концевого домена CTR1 у позвоночных, образование в нем трех мотивов и сохранение относительно постоянной длины указывает на возникновение новых консервативных функций. В самом деле,

CTR1 является основным и, по-видимому, универсальным транспортером меди в клетку. В рамках существующей концепции МСМ позвоночных это означает, что CTR1 может получать медь (II) от разных доноров (напрямую либо с помощью переносчиков): от комплекса с гистицином (клетки печени), от ЦП (клетки негепатоцитарных рядов), а также связывать "неупакованную" медь (в просвете кишечника). Последнее однозначно подтверждается комплементацией CTR1 человека утраченной медьтранспортной функции у дефектных по CTR1 дрожжей (*Zhou et al., 1997*). Особенности строения N-конца CTR1 позвоночных позволяют предположить, что N-конец способен быть прямым акцептором меди для всех перечисленных доноров ([His<sub>2</sub>Cu], ЦП и «неупакованная» медь). Возможно, что ионы Cu(II) первоначально связываются с а.о. His мотивов 1 и 2, при этом неупакованные ионы связываются с ними напрямую, а [His<sub>2</sub>Cu] распадается за счет эквивалентного замещения His→His. Хелатный эффект и рассеянные в N-конце остатки Asp и Glu способствуют этому связыванию. В то же время, в силу отсутствия жесткой структуры сайта, такое связывание не является слишком прочным. На этом этапе происходит селекция Cu(II) от более жестких электрофилов. Ион Cu(II), первоначально связанный а.о. His, попадает в близкое окружение остатков Met, стабилизирующих восстановленное состояние. При наличии источника электрона происходит восстановление, сопряженное с перемещением Cu(I) из His-сайта в Met-сайт (мотив 3), подобно тому, как это происходит в белках CopC. На этом этапе происходит селекция Cu(II) от сходных по жесткости электрофилов (Zn<sup>2+</sup>), неспособных к восстановлению. Маловероятно, чтобы N-конец CTR1 мог сам выполнять функцию оксидоредуктазы, однако он является идеальным вспомогательным белком для осуществления реакции восстановления. Возможно, ионы Cu(I), образующиеся при неспецифическом восстановлении Cu<sup>2+</sup>, и ионы Ag<sup>+</sup> связываются напрямую с мотивом 3.

### **3. Докинг N-концевых медьсвязывающих мотивов CTR1 млекопитающих с предполагаемыми донорами меди**

Консервативность длины N-конца CTR1 и наличие смешанного Met/His мотива 1 у позвоночных, вероятно, обусловлены возможностью прямого переноса иона меди на него с молекулы ЦП, являющегося у позвоночных основным донором меди для клеток негепатоцитарных рядов. Мотив 1 является наилучшим кандидатом на роль акцептора меди от ЦП в силу его дистального положения относительно мембраны. Для описания возможных взаимодействий между N-концом CTR1 и его потенциальными донорами меди был использован метод докинга в модели связывания лиганда с жестким рецептором.

В качестве молекулы-“лиганда” (акцептора меди) использовали различные мотивы из N-концевой области белка, кодируемого геном *CTR1* человека, а в качестве “рецептора” (донора меди) – молекулы ЦП (PDB ID: 1KCW) и сывороточного альбумина (PDB ID: 1AO6). Для этого из а.к. последовательности N-концевого домена белкового продукта гена *CTR1* были выбраны 3 предполагаемых медьсвязывающих мотива (координаты в а.к. последовательности: 1-13, 19-26, 39-46). Далее с помощью программы

HyperChem 7.01 проводилась геометрическая оптимизация этих мотивов методом молекулярной механики AMBER с точечными зарядами на атомах, рассчитанными полуэмпирическим методом CNDO. Для каждого мотива оптимизация проводилась при двух различных начальных приближениях – в конформации  $\alpha$ -спирали и в конформации  $\beta$ -слоя. В использованной для расчетов модели С-концы мотивов были блокированы N-метильными группами для нейтрализации заряда С-конца пептида (что и происходит при присоединении последующих а.к. с N-конца), N-концы мотивов 2 и 3 были блокированы ацетильными группами, а имидазольные группы остатков гистидина депротонированы, как это имеет место при физиологических значениях pH. Далее все полученные структуры мотивов использовались в качестве лигандов при докинге. Результаты приведены на рис. 2 (см. вкладку). Они показывают, что мотив 1 ( $^1\text{MDHSHHMGMSYMD}^{13}$ ) с начальной конформацией  $\alpha$ -спирали, в результате докинга сближен (на расстояние не более 3.5 Å) с а.о. молекулы ЦП, непосредственно координирующими лабильный атом меди в составе ЦП – Glu935, His940, Asp1025, и с самим этим атомом меди (Cu62, нумерация остатков по записи PDB 1KCW, используемая в расчётах структура ЦП содержит 2 лабильных атома меди). Мотив, оптимизированный в конформации  $\beta$ -слоя, оказывается локализованным в близкой области и также сближен с Glu935.

Структура, полученная оптимизацией второго мотива ( $^{19}\text{QPSHHHPT}^{26}$ ) в конформации  $\alpha$ -спирали, так же как и структура его в приближении  $\beta$ -слоя, в результате докинга оказывается сближенной примерно с той же частью молекулы ЦП, что и первый рассмотренный мотив.

Структуры, соответствующие двум разным начальным геометриям третьего мотива ( $^{39}\text{SMMPMPMT}^{46}$ ) в результате докинга оказываются сближенными с разными участками молекулы ЦП. Однако оба эти участка содержат лабильные атомы меди. Таким образом, прямой захват меди из лабильных сайтов ЦП N-концом CTR1 весьма вероятен. Для молекулы альбумина выгодного взаимодействия медьсвязывающих мотивов N-конца CTR1 с физиологическим сайтом связывания меди не обнаруживается.

#### 4. Модель, объясняющая транспорт цисплатина через CTR1

Перенос платины через CTR1 по механизму, идентичному с медью (I), невозможен в силу следующих причин:

- а) медь(I) транспортируется в виде иона, а цисплатин представляет собой жесткую конструкцию, в которой некоторые исходные нуклеофильные группы критичны для взаимодействия с ДНК и должны быть сохранены;
- б) связь Pt(II)-S-Met намного устойчивее, чем Cu(I)-S-Met. При взаимодействии с пептидами, моделирующими метиониновые сайты CTR1 *in vitro*, цисплатин быстро теряет свои лиганды и образует прочный комплекс с четырьмя тиоэфирными группами (Sze et al., 2009). *In vivo* такая ситуация приводила бы к необратимому блокированию медного канала, а не к транспорту Pt(II) в клетку.

Известно, что в некоторых системах медь (II) способна катализировать расщепление связи Pt(II)-S (Cheng et al., 1998). С учетом этого факта

предлагается следующий механизм транспорта платинового препарата белком CTR1 (Рис. 3).

На первом этапе активированные платиновые препараты связываются с остатками метионина. Наиболее важным является их связывание в мотиве 3, за счет чего осуществляется их локальное концентрирование вблизи устья канала (в полном соответствии с данными по роли мотива 3 в транспорте цисплатина (*Sinani et al., 2007*). В нормальном состоянии МСМ, CTR1 осуществляет транспорт меди, поэтому с большой вероятностью мотив 2 содержит связанный ион Cu(II), ожидающий восстановления. При этом в силу пространственной близости мотивов 2 и 3 создаются условия для каталитического расщепления связи Pt-S и освобождения платинового комплекса в устье канала до того, как произойдет полидентатное хелатирование, инактивирующее и комплекс, и сайт.

В соответствии с рабочей гипотезой, медь необходима для “проталкивания” платины в канал. С другой стороны, она конкурентно занимает сайты связывания с платиной. В связи с этими соображениями, уровень меди во внеклеточной среде и терапевтическая эффективность цисплатина не могут не быть взаимосвязанными. Степень заполнения Cu(II) и Cu(I) сайтов CTR1 в клеточных культурах контролировать сложно, поэтому чрезвычайно актуальным является исследование животных моделей, в которых CTR1 функционирует в паре с физиологическими донорами меди (His<sub>2</sub>Cu и ЦП). В таких моделях возникает возможность контролировать функционирование CTR1 за счет влияния на состояние внеклеточного *статуса меди*, который описывается тремя параметрами: концентрацией тотальной меди, уровнем оксидазной активности (концентрацией холо-ЦП) и содержанием иммунореактивного ЦП (сумма холо-ЦП и апо-ЦП) в сыворотке крови (*Olivares et al., 2008*).

### **5. Модель животных с искусственно изменяемым статусом меди**

В представленной работе разработан и охарактеризован метод снижения статуса меди в крови и его последующего восстановления. Основой метода является способ, предложенный Schreiber с соавт. (*Schreiber et al., 1980*), который состоит в том, что крысам в корм добавляется нитрат серебра из расчета 50 мг в сутки на 1 кг массы тела (Ag-диета). Через месяц Ag-диета приводит к падению фенолоксидазной активности в крови и в жидкости, омывающей желудочки мозга.

В представленной работе показано, что во время Ag-диеты в крови крыс и мышей падает уровень оксидазной и ферроксидазной активности и пропорционально снижается концентрация меди (Рис. 4, см. вкладку). В кровотоке Ag-животных циркулируют 2 формы иммунореактивного ЦП. Одна форма ЦП имеет ту же подвижность в геле, что и холо-ЦП, вторая движется медленнее и этим напоминает апо-ЦП. Обе формы не окрашиваются на оксидазную активность. Серебро сыворотки ко-иммунопреципитируется антителами к ЦП. При этом относительный уровень ЦП-мРНК и содержание полипептида ЦП как в аппарате Гольджи, так и в сыворотке, не меняется. Таким образом, Ag-диета в сыворотке крови животных снижает только оксидазную

активность (которая зависит от меди, ассоциированной с ЦП), не изменяя экспрессию гена ЦП.

Из сыворотки Ag-крыс с нулевым уровнем оксидазной активности методом ионообменной хроматографии был получен набор фракций, обогащенных ЦП (Ag-ЦП). Элюцию проводили ступенчатым градиентом NaCl (градиент начинался со 100 мМ NaCl, и ступенька соответствовала 50 мМ). Данные анализа Ag-ЦП представлены на рис. 5 (см. вкладку). Они показывают, что полученный препарат содержит два мажорных полипептида, которые взаимодействуют с антителами к ЦП. Обе формы имеют одинаковую молекулярную массу, соответствующую полноразмерной молекуле ЦП. Во фракциях выявляется оксидазная активность, которая сохраняет специфический каталитический характер и, в пересчете на единичную концентрацию белка, снижается с номером фракции. Оксидазная активность составляет примерно 1 – 2% от оксидазной активности холо-ЦП, взятого в том же количестве. Вероятно, что во фракциях присутствует и некоторая ферроксидазная активность, так как на дорожках геля можно увидеть ее следы.

Спектрофотометрический анализ препарата Ag-ЦП показал, что в соответствии с низким содержанием меди в Ag-ЦП, выраженная полоса поглощения ЦП при 610 нм, обусловленная окисленной медью типа I, в спектрах Ag-ЦП – очень слабая и выявляется только во фракциях с наибольшей концентрацией белка. Уменьшение отношения  $D_{610}/D_{280}$  в Ag-ЦП по сравнению с холо-ЦП приблизительно совпадает с уменьшением скорости катализа окисления *o*-дианизидина. Соотношения  $D_{230}/D_{280}$  для холо-ЦП и фракций Ag-ЦП значимо не отличаются, поэтому  $D_{280}$  может служить достаточно надежным способом определения суммарной концентрации белков в препаратах Ag-ЦП. Спектральной особенностью Ag-ЦП, отсутствующей в спектрах холо-ЦП (и примесного оксигемоглобина), является небольшая полоса в области 320-330 нм с  $\epsilon \sim 1500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , которая может быть обусловлена поглощением координированного серебра или не полностью сформированными медьсвязывающими сайтами.

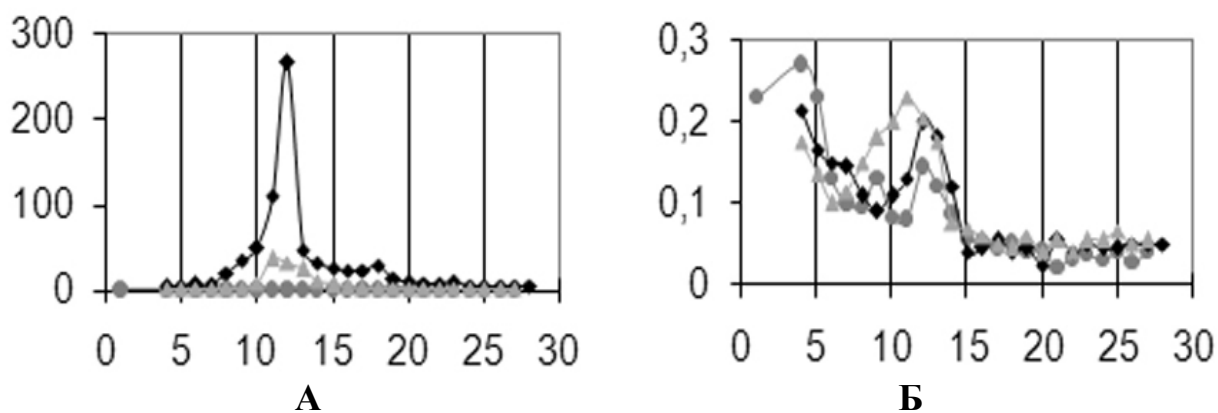
Спектр КД холо-ЦП крысы почти совпадает со спектром КД ЦП человека (Noyer, Putnam, 1981) и характеризуется отрицательным КД в ароматической области и выраженным экситонным дублетом (400-650 нм) оптического перехода меди типа I при 610 нм. Анализ КД холо-ЦП крысы в области 190-240 нм с помощью алгоритма CDNN дает предсказание вторичной структуры 12%  $\alpha$ , 36%  $\beta$ , 17% поворотов и 35% неупорядоченной структуры, что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа (Zaitseva et al., 1996) ЦП человека (8.4%  $\alpha$ , 34%  $\beta$ ). Фракции Ag-ЦП обладают в области 190-240 нм одинаковыми спектрами КД, отличия которых от спектра холо-ЦП очевидны без количественного анализа. Оценка содержания вторичной структуры дает 20%  $\alpha$ , 9%  $\beta$ , 20% поворотов и 51% неупорядоченной структуры. КД Ag-ЦП в видимой области не детектируется в соответствии с отсутствием полосы поглощения меди типа I. КД Ag-ЦП в области 240-330 нм напоминает по форме спектр ЦП вблизи точки щелочной денатурации pH 10.5 (Noyer, Putnam, 1981) и спектр апо-CN-ЦП, лишённого ионов меди (Sedlak, Witting-Stafshede, 2007). Однако pH-



денатурированный белок сохраняет оптическую активность в видимом диапазоне, а апо-CN-белок сохраняет вторичную структуру.

Изменение вторичной структуры Ag-ЦП подтверждается данными дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Нативный холо-ЦП обладает четким пиком теплоемкости при 74.3 °С, Ag-ЦП – двумя пиками с максимумами при 53.8 и 58.9 °С, которые характеризуются большой шириной и, наиболее вероятно, являются суперпозицией многих структурных переходов. Гетерогенность Ag-ЦП не позволяет считать эти пики двумя последовательными стадиями. Площадь под пиками теплоемкости Ag-ЦП в 2 раза меньше площади под основным пиком холо-ЦП, что указывает на меньшую энтальпию денатурации Ag-ЦП.

У мышей Ag-диета в течение недели приводит к исчезновению оксидазной активности в крови. Соответственно изменяется и концентрация меди в крови этих животных. Органы мышей накапливают серебро неравномерно. Наибольшей накопительной способностью обладают печень и надпочечники. В печени серебро аккумулируется во фракциях, плотность которых в градиенте сахарозы соответствует плотности митохондрий (рис. 6,А). К тому же, эти фракции окрашиваются Mitotracker-580 Red, специфическим флуоресцентным красителем, который применяется для выявления фиксированных митохондрий. По данным иммуноблотинга, эти фракции также содержат иммунореактивную субъединицу 4 (Cox4i1) митохондриального белка COX.



**Рис. 6. Распределение серебра (А) и меди (Б) в органеллах клеток печени крысы, фракционированных в ступенчатом градиенте сахарозы методом равновесного ультрацентрифугирования.** Обозначения: кружки – контроль, ромбы – Ag-мыши, треугольники – отмена Ag-диеты. По оси абсцисс: номер фракции градиента; по оси ординат: концентрация, мкг/л.

У мышей после отмены Ag-диеты оксидазная активность восстанавливается частично уже через три дня и полностью через 2 недели. Концентрация серебра постепенно снижается во всех органах. Уровень и распределение меди в клетках печени не меняются во время Ag-диеты и после ее отмены (рис. 6,Б).

С целью установить, влияет ли дефицит церулоплазминовой меди на метаболизм меди в клетках печени, было изучено влияние Ag-диеты на

экспрессию генов медьтранспортных белков и внутриклеточных купроэнзимов на всех уровнях – транскрипции, трансляции и ферментативной активности.

Методом полуколичественной ОТ-ПЦР в тотальной фракции РНК, изолированной из печени контрольных и Ag-мышей, был определен steady-state уровень зрелых мРНК, кодируемых генами медьтранспортных внутриклеточных белков (CTR1, ATR7A и ATR7B), обеих изоформ ЦП-мРНК (секреторной и связанной с мембраной) и внутриклеточных купроэнзимов (СОД1 и СОХ). Полученные результаты показывают, что у Ag-мышей профиль экспрессии генов медьтранспортных белков не меняется (рис. 7, см. вкладку).

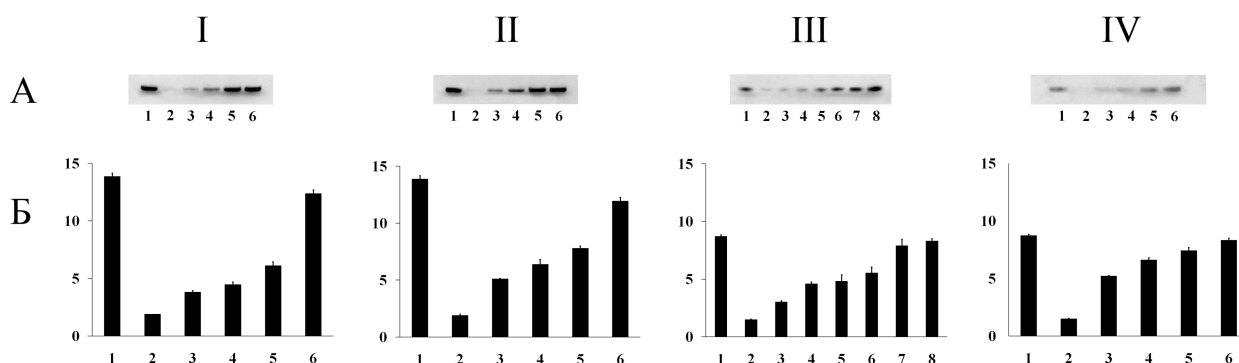
Относительное содержание белков CTR1, ATR7B, Cox4i1, и СОД1 было определено в субклеточных фракциях печени методом иммуноблотинга (рис. 8, см. вкладку). Видно, что содержание взятых в рассмотрение пептидов не меняется. Не меняется также активность и распределение СОД1 между цитозолем и митохондриями (рис. 8). В качестве критерия оценки активности СОХ и ее относительного содержания был использован полярографический метод определения скорости поглощения кислорода митохондриями в присутствии электрон-продуцирующей системы (ТМРД+аскорбат). Скорость поглощения кислорода митохондриями печени контрольных и Ag-мышей оказалась одинаковой. Следовательно, можно утверждать, что ни активность, ни содержание зрелой СОХ в митохондриях Ag-мышей не меняется.

Представленные данные позволяют считать, что у Ag-млекопитающих в межклеточных пространствах и в клетках серебро присутствует в обменной форме и перемещается по маршрутам меди. Естественное восстановление оксидазной активности после отмены Ag-диеты на фоне не меняющейся концентрации меди в пище происходит, но требует больше трех суток. Это слишком длительное время для того, чтобы использовать данный эффект при разработке животной модели с переключающимся статусом меди. В следующих опытах было испытано действие сульфата меди на статус меди Ag-животных.

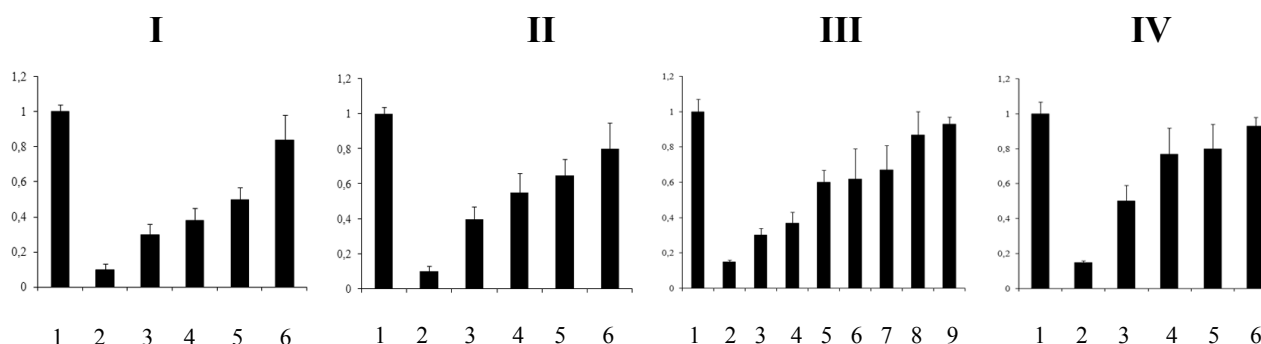
## **6. Однократное введение сульфата меди восстанавливает ферментативные активности церулоплазмينا у Ag-животных**

Животные с нулевой оксидазной активностью (Ag-крысы и Ag-мыши) однократно, внутрибрюшинно или *per os*, получали 10 мкг  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  на 1 г массы тела, и через различные интервалы времени (от 10 мин до 72 ч) в сыворотке крови был измерен уровень оксидазного ЦП. В течение всего эксперимента животные продолжали получать с пищей серебро.

Результаты однозначно демонстрируют, что введение ионов меди вызывает повышение уровня оксидазного ЦП. При этом заметной разницы в действии сульфата меди в зависимости от способа введения не обнаруживается. Повышение оксидазной активности наблюдается уже через 10 мин после введения сульфата меди, а через 4 ч уровень оксидазной активности практически восстанавливается и сохраняется не менее 72 ч на фоне Ag-диеты (рис. 9). Прямое добавление ионов меди (II) к сыворотке Ag-животных не вызывает повышения ее оксидазной активности.



**Рис 9. Однократное введение сульфата меди восстанавливает статус меди.** А. Изменение оксидазной активности в геле сыворотки крови Ag-крыс (I и II) и Ag-мышей (III и IV) после введения  $\text{CuSO}_4$  внутривентриально (I и III) или *per os* (II и IV). I-III: 1-контроль, 2-Ag-животные, 3-6-Ag-животные через 1 час, 4, 24, 72 часа после введения  $\text{CuSO}_4$ . IV: 1-контроль, 2-Ag-животные, 3-8-Ag-животные через 20, 40 мин, 1 час, 4, 24, 72 часа после введения  $\text{CuSO}_4$ . Б. Количественная оценка оксидазной активности тех же образцов сыворотки крови, отн. ед. Приведены средние значения по измерениям у 5-ти животных в каждой группе. Данные выражены как среднее значение  $\pm$  среднее квадратичное отклонение.



**Рис. 10. Изменение соотношения между холо-ЦП и апо-ЦП Ag-животных после введения  $\text{CuSO}_4$ .** Обозначения: см. рис. 9. Соотношения вычислены, исходя из денситометрических данных по соотношению двух форм ЦП на иммуноблотинге.

В экспериментах типа пульс-чейз показано, что повышение оксидазной активности происходит быстрее (через 20 мин), чем новосинтезированный ЦП появляется в кровотоке (через 40 мин) (рис. 11, см. вкладку). Это означает, что медь включается в полипептид ЦП, находящийся уже в аппарате Гольджи. При этом существенного увеличения содержания иммунореактивного ЦП не наблюдается (рис. 10). Очевидно, медь, введенная в ЖКТ или внутривентриально, уже через несколько минут поступает в печень, и метаболически посттрансляционно в комплексе Гольджи включается в ЦП.

### 7. Использование Ag-мышей для изучения влияния дефицита меди, ассоциированной с церулоплазмином, на скорость роста опухолей различного происхождения

Чтобы экспериментально изучить влияние дефицита меди, ассоциированной с ЦП, на рост опухолей *in vivo*, нами были использованы иммунодефицитные мыши, которым подкожно были введены клетки

человеческой колокарциномы линии НСТ116. Эксперименты проводили на двух группах животных:

1) Контроль – мыши с подсаженными опухолями, получавшие стандартную диету.

2) Ag-мыши, переведенные на диету, содержащую серебро, одновременно с подсадкой опухолей и получавших ее в течение всего последующего эксперимента.

Динамика роста опухолей у этих животных приведена на рис. 12 (см. вкладку). Оказалось, что у Ag-мышей в пяти случаях из шести опухоли не развились, и только у одной мыши наблюдался рост опухоли. По этой причине дисперсия размеров опухолей в этой группе с учетом всех случаев оказалась довольно большой ( $390 \pm 560$  мг, по сравнению с  $760 \pm 450$  мг в контрольной группе). У Ag-мышей с подсаженными опухолями, как и у интактных мышей, серебро накапливается в печени (до 240 мкг/г ткани). В опухолях концентрация серебра тоже возрастает, хотя и не так значительно (до 30 мкг/г ткани), в то же время концентрация меди в них снижается почти на 30%. Однако не похоже, что опухоли не растут из-за дефицита внутриклеточной меди. По крайней мере, по данным ОТ-ПЦР и иммуноблотинга, в опухолях Ag-мышей не изменяется уровень экспрессии генов основных медьтранспортных белков и купроэнзимов. К тому же, клетки этой опухоли синтезируют и секретируют оксидазный ЦП человека.

Определение уровня проапоптотических факторов методом иммуноблотинга показало, что в цитозоле опухолевых клеток Ag-мышей содержание белка p53 не меняется, но обнаруживается несколько повышенный уровень митохондриальной протеазы HTRA2. При этом наблюдается перераспределение цитохрома *c* между митохондриями и цитозолом, то есть в клетках Ag-мышей происходит переход этого белка из митохондрий в цитоплазму, что может являться одним из свидетельств апоптоза. Возможно, это объясняет подавление развития опухолей у Ag-мышей, однако, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

## **8. Ионы серебра, присутствующие в среде культивирования, влияют на рост клеток и токсическое действие цисплатина**

Для изучения влияния ионов серебра на рост клеток колонокарциномы человека (линия НСТ116) и их восприимчивость к действию цисплатина, были проведены эксперименты по культивированию клеток в среде, обогащённой ионами серебра. Среду культивирования, равновесно насыщенную ионами серебра ( $[Ag] 52.7 \cdot 10^{-6}$  М), разводили полной стандартной средой культивирования в два – Ag50%, в четыре – Ag25% и в так далее раз. Тотальная концентрация меди в среде составляла  $6.3 \cdot 10^{-8}$  М и оставалась постоянной во всех случаях.

Результаты МТТ-анализа количества жизнеспособных клеток, представленные на рис. 13,А (см. вкладку), демонстрируют четкую концентрационную зависимость роста клеток от концентрации серебра. Наличие ионов серебра во внеклеточной среде снижает действие цисплатина, и этот

эффект также носит дозозависимый характер (рис. 13,Б, см. вкладку). Эксперимент показывает, что чем больше серебра содержится в среде, тем менее восприимчивыми к цисплатину становятся культивируемые в ней клетки НСТ116.

### **9. Влияние статуса меди на распределение цисплатина в организме мышей *in vivo***

Оценка выдвинутой рабочей гипотезы была проведена также в опытах *in vivo* на Ag-мышьях. Мы исходили из того, что, если цисплатин переносится через пору CTR1 с участием меди, то дефицит меди во внеклеточном пространстве должен замедлять поступление цисплатина в клетки. Распределение платины в организме контрольных и Ag-мышьях было определено через 30 мин, 2 часа и через сутки после внутрибрюшинного введения цисплатина в концентрации 4 мг/кг массы тела. Концентрация платины была определена в сыворотке крови, желчи и моче прямо, без специальной подготовке проб (мкг Pt /л). В печени, почках, мочевом пузыре и желчном пузыре содержание платины было определено в тотальном клеточном содержимом (мкг Pt /г сырой ткани), а в печени и почках – дополнительно и во фракции ДНК (мкг Pt/г ДНК). Оказалось, что у Ag-мышьях цисплатин дольше циркулирует в кровотоке, чем у контрольных животных, его экскреция с мочой и желчью также отстает от таковой у контрольных мышьях. Через сутки концентрация платины в жидкостях организма падает и выравнивается между контрольными и Ag-мышьями

На ранних сроках после введения цисплатина скорость поступления платины в печень и почки (рис. 14, см. вкладку) у Ag-мышьях ниже, чем у контрольных животных. Но через 24 часа удельное содержание платины выравнивается. В почках и печени картина распределения платиновых аддуктов в ДНК в течение опыта в целом совпадает с таковой для клеточных компонентов.

Таким образом, данные демонстрируют, что низкий уровень меди в крови замедляет поступление платины в органы, что полностью согласуется с выдвинутой гипотезой.

Если выдвинутая гипотеза верна, а это подтверждается *in vitro* и *in vivo* данными, представленными в работе, то органоспецифический уровень экспрессии гена CTR1 должен симбатно соответствовать концентрации меди в органах, а также их способности поглощать серебро и цисплатин. В этом разделе проведено сравнение перечисленных параметров.

Данные, представленные на рис. 15 (см. вкладку), показывают, что максимальный уровень экспрессии гена CTR1 обнаруживается в печени, надпочечниках и почках. Легкие, сердце и мозг относятся к органам со средним уровнем активности гена CTR1. В скелетных мышцах, селезенке и семенниках уровень активности гена CTR1 – низкий. Уровень CTR1-мРНК в основном отражает уровень купроэнзимов в этих органах.

Способность анализируемых органов накапливать серебро в целом коррелирует с концентрацией меди и с активностью гена CTR1 в них. Обращает на себя внимание способность печени накапливать серебро в больших

количествах, чем его накапливают другие внутренние органы. Разница, вероятно, объясняется тем, что серебро поступает в клетки печени из кровотока в большом избытке по сравнению с медью, а в клетки внутренних органов – от Ag-ЦП. Так как третичная структура Ag-ЦП нарушена, должно быть нарушено и его взаимодействие с N-доменом CTR1. Качественное несоответствие наблюдается в мозгу. Серебро почти не аккумулируется в этом органе, вероятно, что серебро не пересекает гематоэнцефалический барьер. К сожалению, о механизме поступления меди в мозг взрослых млекопитающих очень мало известно, и даже нет убедительных данных, свидетельствующих о том, что у взрослых млекопитающих медь пересекает гематоэнцефалический барьер.

Через 30 мин после введения цисплатина в распределении платины и в активности гена CTR1 в разных органах прослеживается симбатность. Исключение составляет мозг. Цисплатин на коротких сроках эксперимента практически не пересекает гематоэнцефалический барьер. Но гемато-тестикулярный барьер он пересекает, что полностью согласуется с высокой эффективностью подавления цисплатином роста опухолей в этом органе. В целом данные хорошо согласуются с представлениями, что CTR1 участвует в транспорте цисплатина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теоретический анализ внеклеточного N-концевого домена CTR1 позволил обосновать свойства локализованных на его последовательности трех медьсвязывающих сайтов (МСС). Результаты этого анализа показывают, что N-конец CTR1 улавливает ионы меди (II) и обеспечивает их внутримолекулярное восстановление у устья купрофильного канала. Модель объясняет механизм переноса платины через купрофильный канал: цисплатин связывается с метиониновым МСС, а Cu(II), находящаяся в гистидиновом МСС, вытесняет платину из S-аддуктов. Выводы хорошо совпадают с данными, полученными *in vitro* с синтетическими пептидами, соответствующими МСС CTR1 по первичной структуре, а также с данными о свойствах (Pt-S)-комплексов (Rubino *et al.*, 2010; Arnesano *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2004; De Feo *et al.*, 2009; Sze *et al.*, 2009; Sceng *et al.*, 1998; Sinani *et al.*, 2007). Модель предусматривает, что транспорт платины может быть связан с уровнем внеклеточной меди: при дефиците меди на МСС2 поступление платины в клетки может замедляться. Ожидаемый эффект воспроизводится *in vitro* на клетках линии НСТ116. Показано, что заполнение МСС ионами серебра приводит к снижению действия цисплатина. Продемонстрировано, что *in vivo* круговорот платины у животных с низким статусом меди замедляется. Эти данные поддерживают сформулированную рабочую гипотезу.

Полученные данные показывают, что предложенная нами модель Ag-животных может быть использована для изучения связи статуса меди с опухолевым ростом и действием цисплатина.

К ценным свойствам модели относятся следующие:

1. Использование Ag-диеты гарантирует синхронное и одинаковое по значению (100% и 60% у крыс и мышей, соответственно) падение концентрации меди и

нулевую оксидазную активность в сыворотке крови у любой по численности группы животных.

2. Статус меди может быть восстановлен в течение 4 часов однократным введением сульфата меди.

3. Природа дефицита меди точно известна. Это дефицит меди, ассоциированной с ЦП.

4. У Ag-животных с нулевой оксидазной активностью в сыворотке крови, поддерживаемой в течение 3 недель, в печени не нарушается распределение и локализация меди, на уровне транскрипции и трансляции не изменяется экспрессия генов медьтранспортных белков и купроэнзимов, и активность внутриклеточных купроэнзимов сохраняется.

5. Ионы серебра остаются в обменной форме, и их полное выведение у взрослых грызунов через желчь происходит в течение нескольких дней.

## ВЫВОДЫ

1. Высоко аффинный транспортер меди CTR1 обладает набором внеклеточных нуклеофильных сайтов, строение которых обуславливает их специфичность по отношению к Cu(I) и к Cu(II). Сближенность этих сайтов создает условия для внутримолекулярного восстановления меди (II) и транспорта цисплатина при ее участии.

2. Ионы Ag(I), изоэлектронные Cu(I), узнаются белками медьтранспортной системы и переносятся ими по межклеточным и внутриклеточным маршрутам меди. Серебро метаболически включается в ЦП, что приводит к снижению количества атомов меди на молекулу ЦП, к нарушению его третичной структуры и потере каталитических активностей. В печени Ag-животных синтез и активность генов медьтранспортных белков и купроэнзимов не изменяется, однако, происходит снижение статуса меди: падение в крови концентрации меди, ассоциированной с ЦП.

3. Ag-мыши являются удачной моделью для изучения роли статуса меди в канцерогенезе и платиновой терапии, так как у них дефицит меди носит полностью воспроизводимый специфический и управляемый характер.

4. Дефицит меди, связанной с ЦП, снижает скорость роста опухолей человека у иммунодефицитных мышей.

5. Наличие ионов серебра во внеклеточной среде влияет на цитотоксические свойства цисплатина *in vitro*. У мышей с низким уровнем внеклеточной меди снижается скорость поступления цисплатина в почки и печень.

## ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Zatulovskiy E., Samsonov S., Skvortsov A. Docking study on mammalian CTR1 copper importer motifs // BMC Systems Biology, 1 (Suppl 1): 54, 2007.

2. Клотченко С. А., Цымбаленко Н. В., Соловьёв К. В., Скворцов А. Н., Затоловский Е. А., Бабич П. С., Платонова Н. А., Шавловский М. М., Пучкова Л. В., Броджини М. Влияние

- ионов серебра на метаболизм меди и экспрессию генов медьтранспортных белков в печени крыс // Доклады Академии Наук, 418 (4): 549—552, 2008.
3. **Бабич П.С., Цымбаленко Н.В., Клотченко С.А., Платонова Н.А., Масалова О.О., Затуловский Е.А., Шавловский М.М., Сапронов Н.С., Пучкова Л.В.** Влияние дефицита церулоплазминовой меди в сыворотке крови на метаболизм меди в мозге // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, том 147, №10, стр. 393-398, 2009.
  4. **Скворцов А.Н., Ильичева Е.Ю., Затуловский Е.А., Савельев А.Н., Цымбаленко Н.В., Шавловский М.М., Пучкова Л.В.** Частичная характеристика церулоплазмينا крысы, выделенного из сыворотки крови животных, получавших с пищей соли серебра // Цитология, т. 52, № 11, с. 70-76, 2010.
  5. **Ilyechova E.Yu., Skvortsov A.N., Zatulovsky E.A., Tsymbalenko N.V., Shavlovsky M.M., Broggin M., Puchkova L.V.** Experimental switching of copper status in laboratory rodents // J. Trace Elem.Med. Biol., V. 24, 4, 2010. doi:10.1016/j.jtemb.2010.08.002 (published online ahead of print)
  6. **Затуловский Е.А., Клотченко С.А., Соловьев К.В., Скворцов А.Н.** Влияние серебра на статус меди у крыс. 11-ая Международная Пушинская школа-конференция, Пушино-на-Оке, 29 октября – 2 ноября, 2007, С. 42.
  7. **Цымбаленко Н.В., Клотченко С.А., Затуловский Е.А., Скворцов А.Н., Бабич П.С., Шавловский М.М., Пучкова Л.В.** Влияние ионов Ag на метаболизм Cu и синтез купроэнзимов у крыс. Сборник материалов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008 г., Новосибирск. С. 510.
  8. **Затуловский Е.А., Ильичева Е.Ю., Скворцов А.Н., Самсонов С.А., Цымбаленко Н.В., Пучкова Л.В.** Распределение микроэлементов и экспрессия генов Cu-транспортных белков и купроэнзимов в печени мышей, получавших ионы Ag. Сборник материалов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008 г., Новосибирск. С. 448.
  9. **Zatulovskiy E.A., Skvortsov A.N., Tsymbalenko N.V., Babich P.S., Ilyeichyova E.Yu., Shavlovsky M.M., Broggin M., Puchkova L.V.** The model to study effects of blood serum copper deficiency on d-element metabolism in liver and brain of rodents. Abstract book of 38<sup>th</sup> International Conference on Coordination Chemistry, Jerusalem, Israel, July, 2008, P. 310.
  10. **Затуловский Е.А., Ильичева Е.Ю., Скворцов А.Н., Пучкова Л.В.** Исследование влияния ионов серебра на метаболизм меди и поступление препаратов платины в клетки млекопитающих. Сборник научных трудов по материалам I Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов биологов “Симбиоз Россия 2008” 6-10 июля 2008 г., “Биология: традиции и инновации в 21 веке” Издательство Казанского университета, Казань, 2008, С. 90-91.
  11. **Затуловский Е.А., Ильичёва Е.Ю.** Участие метаболической системы меди в поступлении ионов серебра в организм лабораторных мышей. 12-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, 10-14 ноября 2008, Пушино-на-Оке. С. 87-88.
  12. **Самсонов С.А., Скворцов А.Н., Затуловский Е.А., Бабич П.С., Ильичева Е.Ю., Цымбаленко Н.В., Пучкова Л.В.** Экспрессия гена *Ctrl*, кодирующего высокоаффинный импортер меди, в органах крыс при различных состояниях обмена меди. Материалы V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС), Москва, июнь, 2009, стр. 88.
  13. **Затуловский Е.А., Скворцов А.Н., Ильичева Е.Ю., Цымбаленко Н.В., Пучкова Л.В.** Новая животная модель для изучения болезни Вильсона и ацерулоплазминеми. Материалы VI-го Съезда Российского общества Медицинских генетиков, 15-18 мая 2010 г., Ростов-на-Дону, 2010, С. 66.
  14. **Zatulovskiy E., Ilicheva E., Puchkova L., Tsymbalenko N., Babich P., Skvortsov N., Caiola E., Mazzoletti M., Broggin M.** Influence of ceruloplasmin-associated copper deficiency on copper metabolism in mammals. Abstracts of 4<sup>th</sup> International FESTEM Symposium in Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology, June 9-12, 2010, St. Petersburg, Russia, 2010, P. 32.



16. Iliecheva E., Skvortsov A., Zatulovskiy E. Tsymbalenko N., Ruskoni P., Broggin M., Puchkova L. A single injection of copper sulfate restores oxidase activity in blood serum of mammals fed by fodder with silver ions. Abstracts of 4<sup>th</sup> International FESTEM Symposium in Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology, June 9-12, 2010, St. Petersburg, Russia, 2010, P. 24.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-04-49786 и 09-04-01165

## **THEORETICAL AND EXPERIMENTAL APPROACHES FOR STUDYING THE MECHANISMS OF CISPLATIN TRANSPORT BY CTR1 PROTEIN**

**Evgeny Zatulovskiy**

Supervisors: Ludmila V. Puchkova, Alexej N. Skvortsov

Research performed in St. Petersburg State Polytechnical University and Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Dissertation defended in Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Copper acts as a necessary cofactor for many vital enzymes. Furthermore, it participates in cell cycle control and reprogramming of energetic metabolism in tumour cells (Warburg effect). The process of copper transfer into the cells is a crucial moment for all these biological functions. This transport is performed by a protein of the CTR1 (copper transporter 1) high affinity copper transporters family. Moreover, the CTR1 protein also participates in the import of cisplatin – a platinum-containing antitumour drug. In spite of the intense studies of CTR1 performed in the last decade, it is not known how CTR1 protein can transport both copper and platinum into a cell despite the fact that their coordination chemistry is completely different. Important questions that also remained to be uninvestigated so far are: how platinum transport might be dependent on copper status and what extracellular carriers transport copper to the N-terminal domain of CTR1 in mammals.

In this study we aimed to create, describe and proof an animal model that would be suitable to study the link between copper status and cisplatin import into the cells. To reach these goals we have solved a number of problems. First, we have analysed the coordination properties of the conserved N-terminal metal-binding domains of CTR1 protein and created a theoretical model describing the ability of CTR1 to transport platinum. Second, we have established an animal model with a switching copper status. And third, we have tested this animal model to confirm its applicability for exploration of the correlation between copper metabolism and platinum transport.

All results described in this thesis are novel; they shed light on copper and platinum import mechanisms and their interdependence. Using the methods of molecular evolution and quantum chemistry we have shown that CTR1 protein has an array of extracellular nucleophilic sites whose structure provides their specificity to Cu(I) and Cu(II). Proximity of these sites leads to the emergence of the possibility for intramolecular reduction of Cu(II) and its participation in Pt transport. Thus CTR1 works as a symport for copper and platinum.

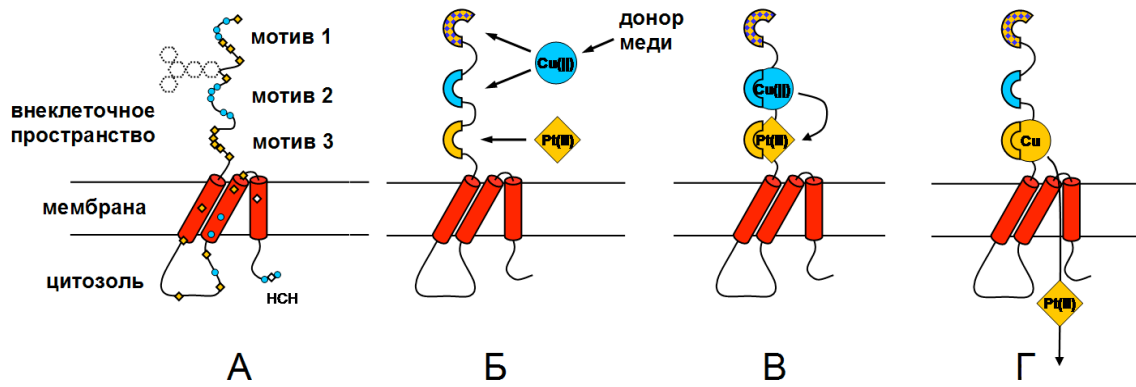
On mice fed with a silver-containing fodder it was shown that Ag(I) ions, which are isoelectronic to Cu(I), are recognised by proteins of copper metabolic system and transferred by them using the same extra- and intracellular pathways that are utilised for copper. Silver is metabolically inserted into ceruloplasmin (Ag-Cp), which leads to the decrease of an average number of copper atoms per one Cp molecule, to distortion of Cp ternary structure and loss of its catalytic activity. In the liver of Ag-animals there were no changes in the activity and synthesis of cuproenzymes and copper transporting proteins observed. Thus Ag-diet causes a decrease of copper status in blood. Deficit of Cp-associated copper reduces the growth rate of human tumours transplanted into immunodeficient mice. Presence of silver ions in extracellular medium affects the cytotoxic properties of cisplatin drug *in vitro*. Manipulations with copper status *in vivo* leads to significant changes in cisplatin transport dynamics.

The obtained results improve an existing knowledge about mechanisms underlying copper metabolism disorders and broaden the general understanding of metals metabolism in mammalian organisms. From practical point of view, the utilization of introduced animal model with a switching copper status allows one to study the role of copper in tumours growth. The revelation of the correlation between copper status in extracellular medium, cytotoxic effect of cisplatin *in vitro*, as well as dynamics of cisplatin influx into cells, provides possibilities for the optimization of this drug clinical usage protocols.

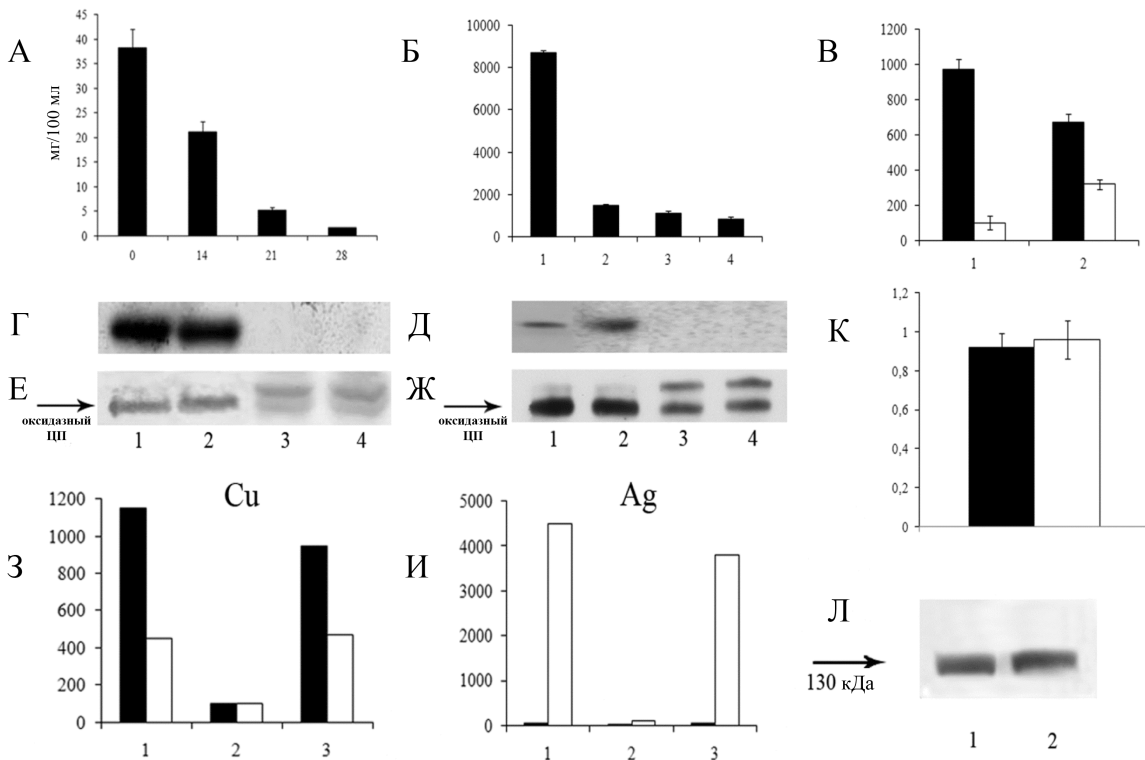
## СОКРАЩЕНИЯ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ТЕКСТЕ АВТОРЕФЕРАТА

- Ag-диета – увлажненный гомогенизированный стандартный корм, содержащий хлорид серебра из расчета 50 мг AgCl на 1 кг массы тела
- Ag-животные – животные, получающие с пищей соли серебра
- CDDP – цис-диаминдихлорплатина (II), цисплатин
- FAAS – беспламенная атомная абсорбционная спектроскопия
- PBS – фосфатно-солевой буферный раствор (0.15 М NaCl, 10 мМ К-Рi буфер, pH7.4)
- TMPD – *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine
- АТР7А/АТР7В – соответственно АТФаза Менкеса и АТФаза Вильсона
- ГФИ-ЦП – церулоплазмин, связанный с мембраной через гикозилфосфатидилинозитоловый якорь
- ЖМКО – концепция жестких и мягких кислот и оснований Пирсона
- МСМ – метаболическая система меди
- МСС – медьсвязывающий сайт
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, тетразолий желтый
- СОД1 – Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>-супероксиддисмутаза
- СОХ – цитохром-*c*-оксидаза
- ТМД – трансмембранный домен
- ЦП – церулоплазмин

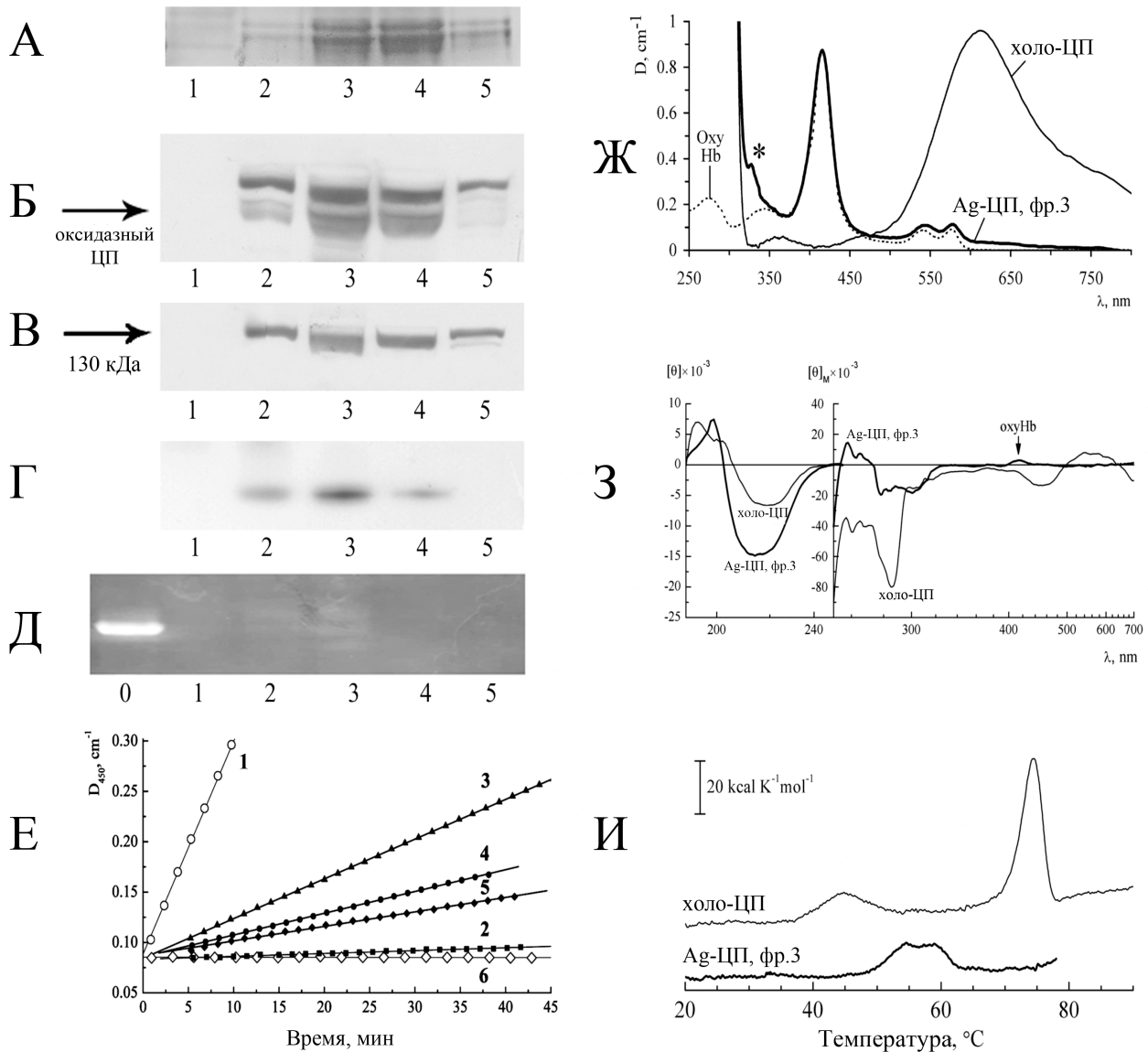




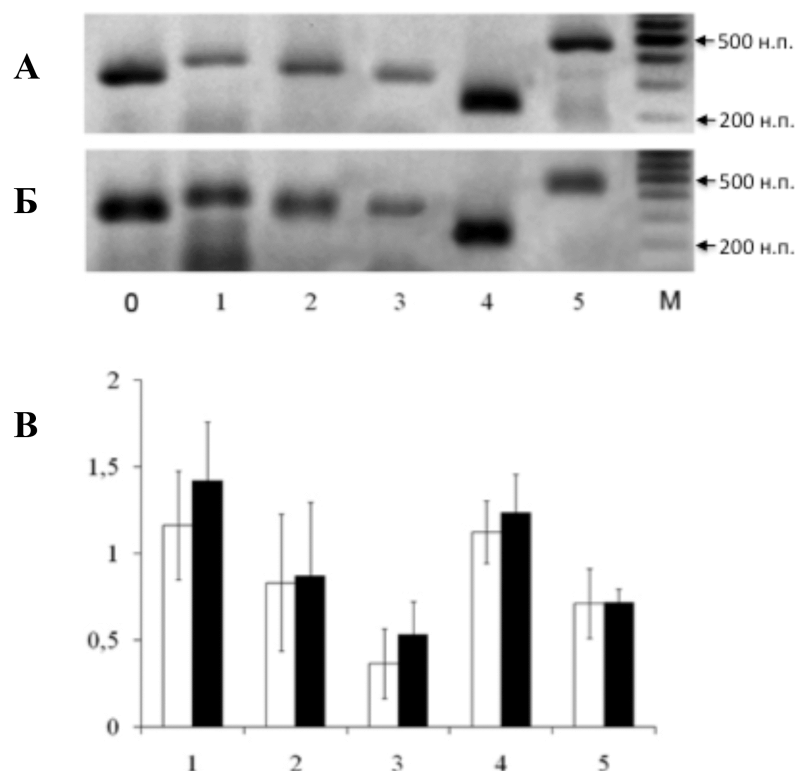
**Рис. 3.** Гипотетическая схема импорта цисплатина в клетки через CTR1 с участием ионов меди. Для наглядности показана только одна из субъединиц гомотримера. **А** – размещение нуклеофильных сайтов, голубые – His, желтые – Met. **Б** – платина кинетически предпочтительно связывается с мотивом 3, медь (II), поставляемая донором меди, связывается с доменами 1 и 2. **В** – медь (II) катализирует отщепление платинового комплекса от остатков метионина в мотиве 3. **Г** – Медь (I) занимает мотив 3 и "вытесняет" платиновый комплекс внутрь канала.



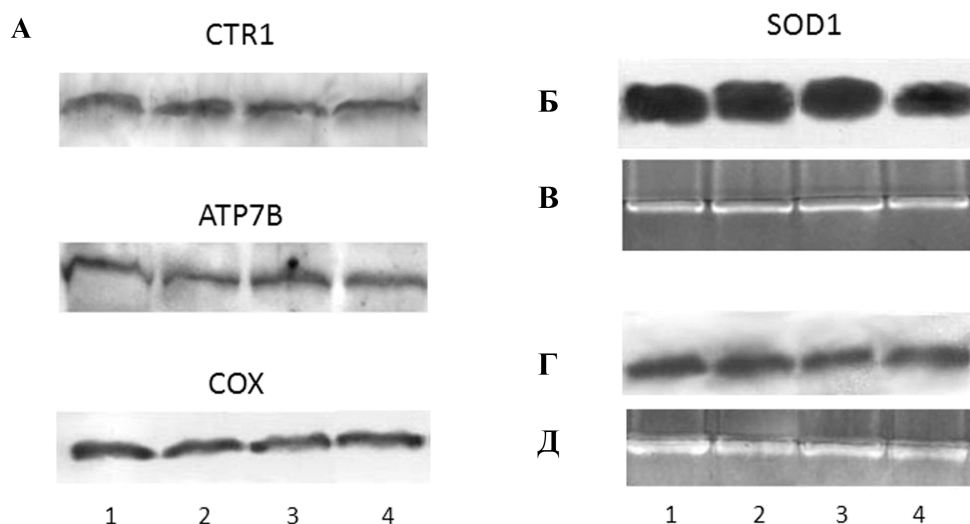
**Рис. 4.** **А** – оксидазная активность в сыворотке крови крыс. По оси абсцисс: время, сутки; по оси ординат: концентрация ЦП, мг/100 мл.  $n = 10$ . **Б** – интенсивность зон геля, окрашиваемых орто-дианизидином. 1 – контроль, 2–4 – 1, 2 и 3 недели, в течение которых животные получали Ag-корм; по оси ординат: оксидазная активность, условные единицы.  $n = 7$ . **В** – концентрация Cu в сыворотке крыс (1) и мышей (2),  $n = 7$ . **Г** и **Д** – сыворотка крови крыс (**Г**) и мышей (**Д**) подвергнута электрофорезу в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях, гели окрашены орто-дианизидином. 1 и 2 – контроль, 3 и 4 – Ag-животные. **Е** и **Ж** – то же, иммуноблотинг с антителами к ЦП. **З** и **И** – выявление Cu и Ag в сыворотке (1), в супернатанте (2) и в образовавшемся преципитате (3). По оси ординат: концентрация металла, мкг/л. **К** – содержание иммуноактивного ЦП у контрольных и Ag-мышей по данным иммуноблотинга. **Л** – иммуноблотинг белков аппарата Гольджи, выделенного из печени мышей, с антителами к ЦП человека. 1 – контроль, 2 – Ag-мышь. Черные столбики – контроль, светлые – Ag-животные.



**Рис. 5.** *А* – Хроматографические фракции Ag-ЦП, элюированные соответственно 150, 200, 250 и 300 мМ NaCl, анализированы методом неденатурирующего электрофореза в ПААГ, окрашено на общий белок. *Б* – Иммуноблоттинг с антителами к ЦП тех же фракций. *В* – То же, электрофорез проведен в денатурирующих условиях. *Г* и *Д* – Оксидазная и феррооксидазная активности, соответственно, в геле после неденатурирующего электрофореза. *Е* – Кинетика окисления орто-дианизидина хроматографическими фракциями Ag-ЦП. По оси ординат – оптическая плотность при 450 нм ( $D_{450}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ). На 1 мл реагента вносили 10 мкл пробы белка. 1 – ЦП контрольных крыс, 1 г/л; 2–5 – фракции Ag-ЦП, 6 – 10 мМ  $\text{CuSO}_4$ . *Ж* – Спектры поглощения холо-ЦП и Ag-ЦП, элюированного 200 мМ раствором NaCl. По оси ординат – поглощение образца в 0.05 см кювете, концентрация белка 22 мг/мл. Звездочкой отмечена полоса, присущая только Ag-ЦП. *З* – Спектры кругового дихроизма тех же препаратов холо-ЦП и Ag-ЦП. По оси ординат – удельная эллиптичность на 1 а.о. град·см<sup>2</sup>/дмоль, и молярная эллиптичность  $[\theta]_M$ , град·см<sup>2</sup>/дмоль. *И* – Кривая удельной теплоемкости тех же препаратов холо-ЦП и Ag-ЦП. По оси ординат – избыточная удельная теплоемкость 1.5 мг/мл раствора белка в 50 мМ ацетатном буфере, pH 5.5, скорость нагрева 1 К/мин.

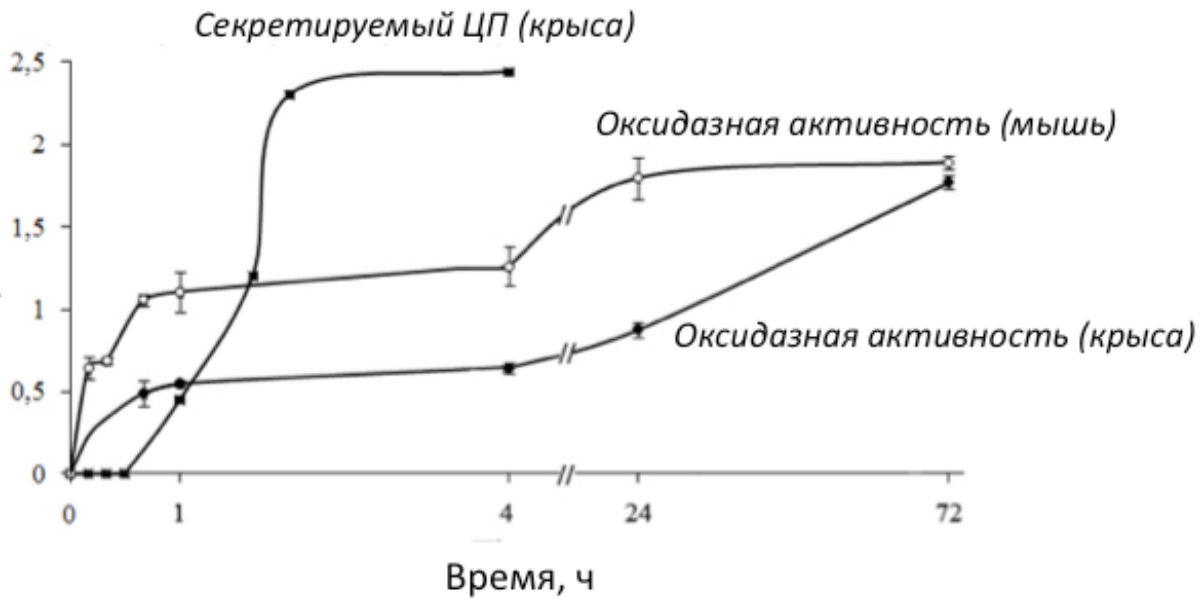


**Рис. 7. Экспрессия генов медьтранспортных белков и купроэнзимов в печени контрольных (А) и Ag-мышей (Б).** Обозначения: 0 -  $\beta$ -актин (для нормировки), 1 - ЦП, 2 - CTR1, 3 - ATP7B, 4 - SOD1, 5 - Cox4i1, М - маркер молекулярных весов. **В** - результат денситометрического анализа гелей А и Б. Обозначения: 1 - ЦП, 2 - CTR1, 3 - ATP7B, 4 - SOD1, 5 - Cox4i1; белые столбцы соответствуют контрольным мышам, чёрные - Ag-мышам.

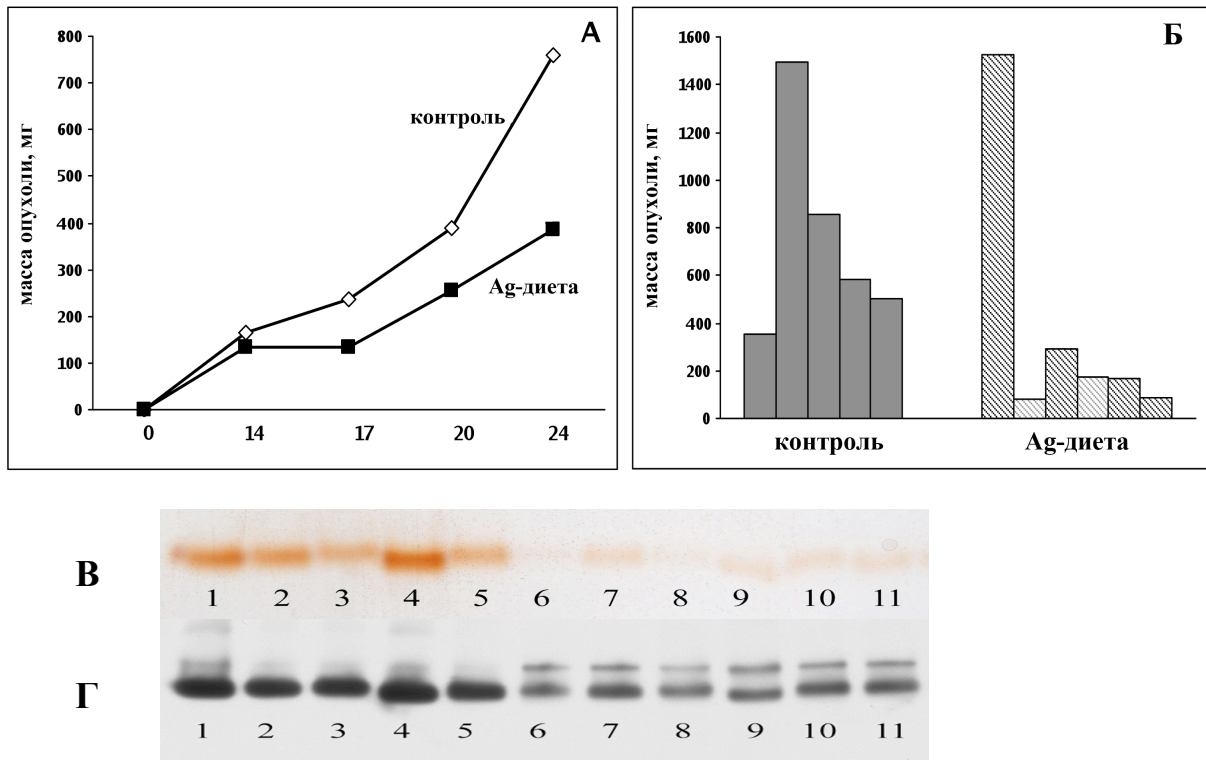


**Рис. 8. Относительное содержание иммунореактивных полипептидов CTR1, ATP7b и Cox4i1 (А), а также SOD1 в цитоплазме (Б) и в митохондриях (Г).** В и Д - Ферментативная активность SOD1 в цитозоле (В) и в межмембранном пространстве митохондрий.

Обозначения: 1 и 2: контрольные мыши, 3 и 4: Ag-мыши.

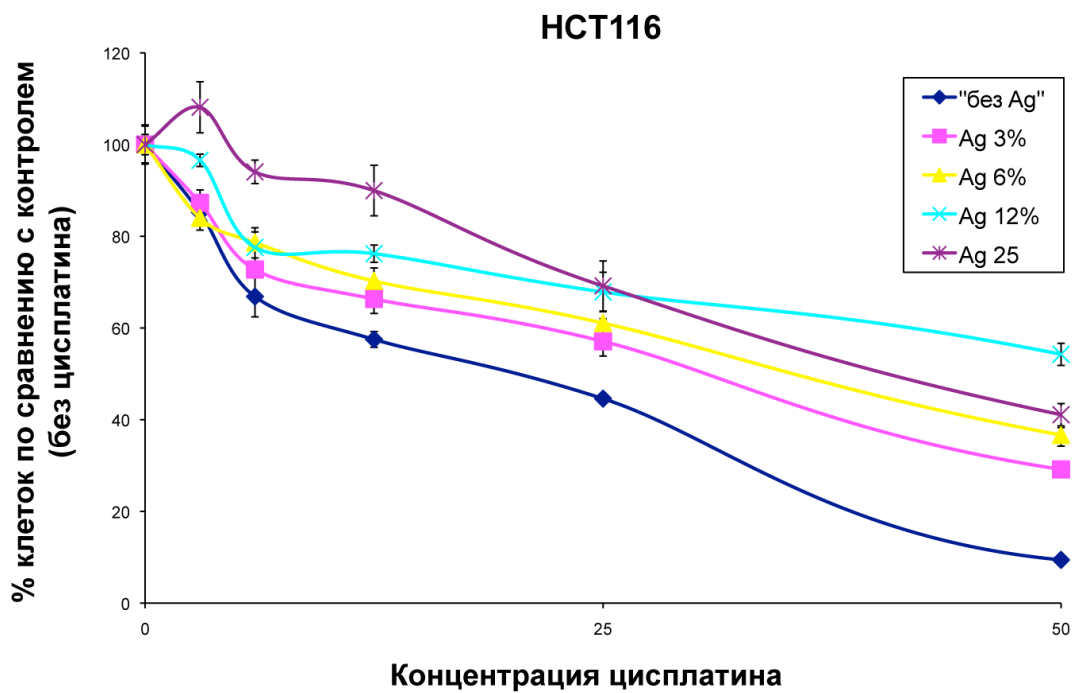
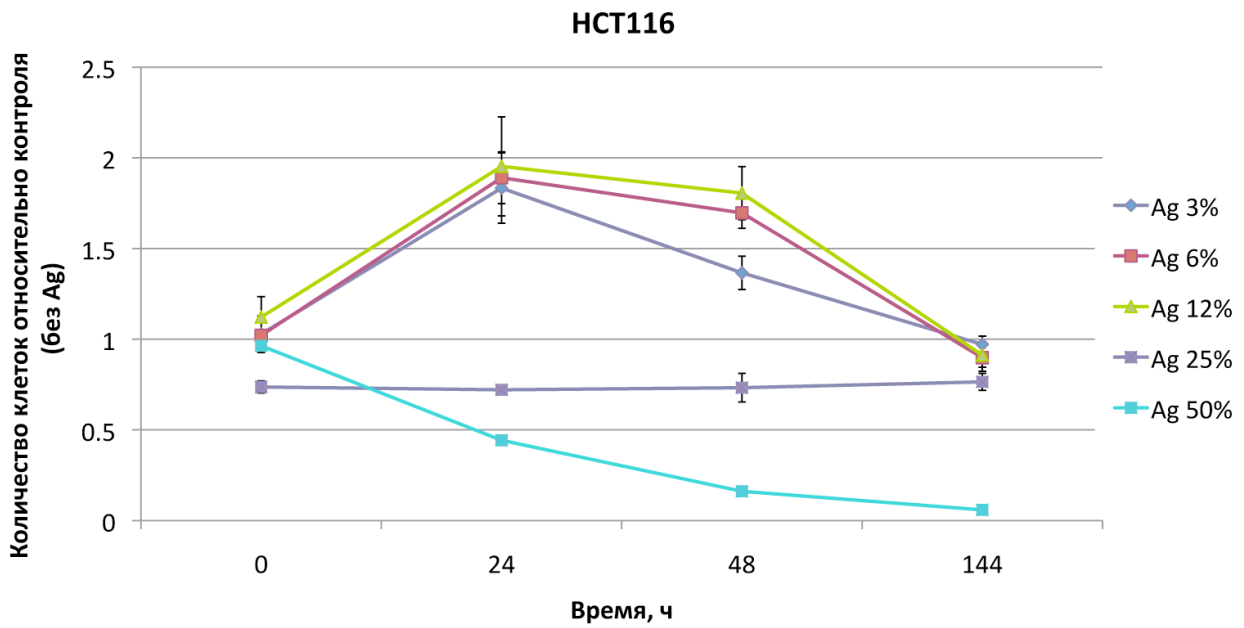


**Рис. 11.** Уровень секреции [ $^{14}\text{C}$ ]-ЦП, оксидазного ЦП мышей и крыс. Ось абсцисс: время, час. Ось ординат: [ $^{14}\text{C}$ ]-ЦП (% от общей радиоактивности); оксидазная активность (выражена: % от оксидазной активности сыворотки контрольных животных, деленный на 50 для сохранения масштаба).



**Рис. 12.** Ag-диета снижает скорость роста опухолей из клеток линии НСТ116, перевитых подкожно иммунодефицитным мышам.

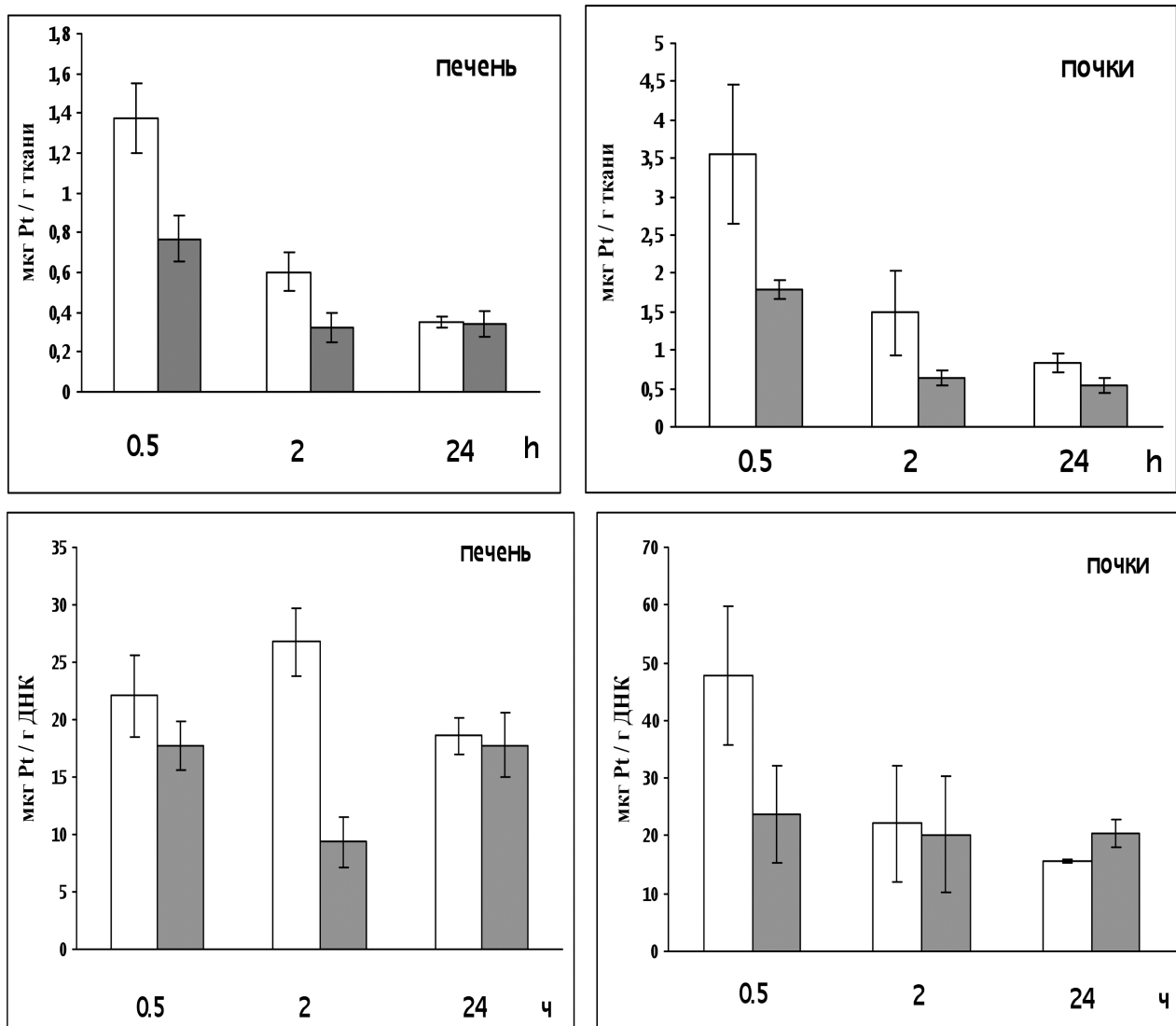
**А** – динамика роста опухолей у контрольных ( $n = 5$ ) и Ag-мышей ( $n = 6$ ). По оси абсцисс: время, дни; по оси ординат: средний вес опухолей, мг. **Б** – размер опухолей человека, выросших у контрольных и Ag-мышей. Приведены данные по отдельным особям. По оси ординат: вес опухоли, мг. **В** – оксидазная активность в сыворотке этих же мышей (1 – 5 – контроль, 6 – 11 – Ag-мыши). **Г** – иммуноблоттинг этих же сывороток с антителами к ЦП человека.



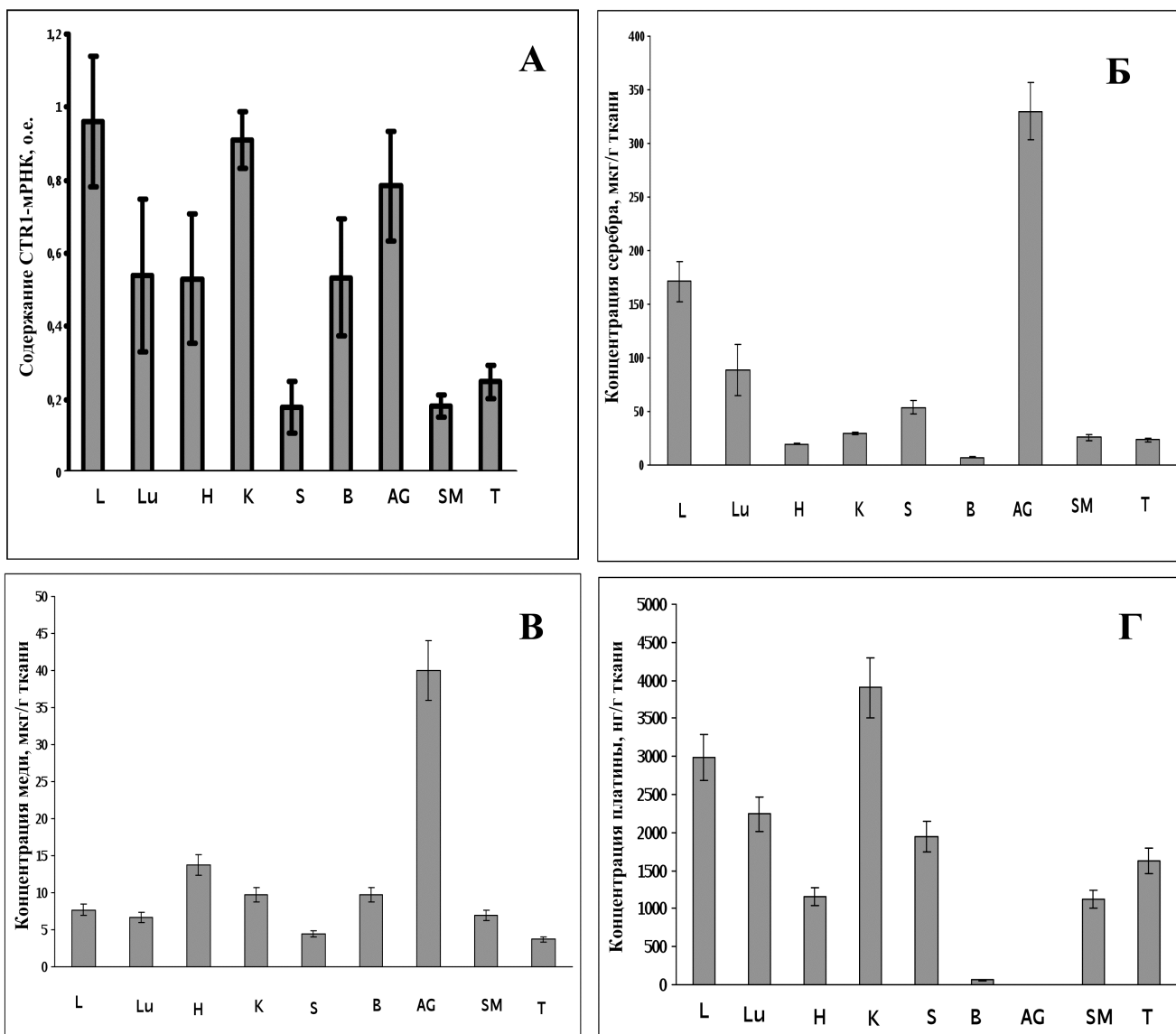
**Рис. 13. Вверху:** Зависимость скорости роста клеток НСТ116 в культуре от концентрации ионов серебра в среде роста (МТТ-анализ).

**Внизу:** Влияние ионов серебра на эффективность цитостатического действия цисплатина на клетки НСТ116. Приведены относительные количества клеток по сравнению с контролем.





**Рис. 14.** Распределение платины в клеточных экстрактах печени и почек (вверху) и в препаратах ДНК (внизу) контрольных и Ag-мышей. По оси абсцисс: время после введения цисплатина, часы. По оси ординат: концентрация платины, мкг Pt/г ткани, или мкг Pt/г ДНК. Белые столбцы – контроль, серые – Ag-мыши.



**Рис. 15.** Профиль экспрессии гена *CTR1* в органах взрослых мышей (*A*) и распределение в них меди (*B*), серебра (*B*) и платины (*Г*). Уровень *CTR1*-мРНК отнесен к содержанию мРНК  $\beta$ -актина. По оси ординат: относительные единицы, о.е. (*A*); концентрация серебра и меди, мкг/г ткани (*B* и *B*, соответственно) и концентрация платины, нг/г ткани (*Г*). Steady-state уровень *CTR1*-мРНК и концентрация меди измерены у контрольных животных, концентрация серебра измерена у мышей, получавших Ag-диету в течение 3 недель, концентрация платины измерена у мышей через 30 мин после введения 2 мг цисплатина на 1 кг массы тела. Обозначения по оси абсцисс: L – печень, Lu – легкие, H – сердце, K – почки, S – селезенка, B – мозг, AG – надпочечники, SM – скелетные мышцы, T – семенники. Концентрация платины в надпочечниках не измерялась.