

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования**

«Национальный исследовательский университет ИТМО»

На правах рукописи

Орлов Юрий Александрович

Транспортеры CTR1 и DMT1: альтернативные пути импорта меди в клетку и их
биологические роли

1.5.4 – Биохимия

диссертация на соискание

ученой степени кандидата биологических наук

научный руководитель

доктор биологических наук, профессор

Пучкова Людмила Валентиновна

Санкт-Петербург,

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
Введение	4
1. Обзор литературы.....	11
1.1. Физико-химическая характеристика меди	11
1.2. Ионы меди в биологических системах	13
1.2.1. Медь как кофактор купроэнзимов.....	15
1.2.2. Некаталитические функции ионов меди.....	21
1.2.3. Токсичность меди.....	27
1.3. Круговорот меди человека	29
1.3.1. Шапероны меди и металлотионеины	32
1.3.2. Созревание купроэнзимов и экспорт меди из клетки. АТФазы АТР7А и АТР7В.....	36
1.3.3. Поступление меди в клетку.....	40
2. Материалы и методы.....	49
2.1. Биологические объекты	49
2.2. Материалы и оборудование	49
2.3. Экспериментальные процедуры	49
3. Результаты и их обсуждение.....	67
3.1. Роль транспортеров СТР1 и DMT1 в клетках Н1299.....	67
3.2. Изучение свойств рекомбинантного NdСТР1 в <i>E. coli</i>	83
3.3. Изучение свойств NdСТР1 <i>in vitro</i>	97
Заключение	109
Выводы	111

Список сокращений и условных обозначений.....	112
Список цитируемых источников	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Медь - жизненно необходимый для живых организмов микроэлемент. Ионы Cu входят в состав многих важных ферментов, которые называют купроэнзимами (*Linder, 1991*). У млекопитающих купроэнзимы участвуют в процессах клеточного дыхания, детоксикации активных форм кислорода (АФК), формирования соединительной ткани, синтезе меланина и нейромедиаторов, созревании нейропептидов, метаболизме и транспорте железа, других процессах (*Linder, 1991; Solomon et al., 2014*). Помимо прямого участия в катализе, ионы Cu выступают в роли аллостерического регулятора транскрипционных факторов, компонентов внутриклеточных сигнальных путей, апоптотических белков, а также ферментов и мембранных рецепторов (*Lewis et al., 2003; Mufti et al., 2007; Eckers et al., 2009; Feng et al., 2009; Brady et al., 2014; Krishnamoorthy et al., 2016; Li et al., 2016; Yuan et al., 2017*).

Широкие физиологические функции биоактивной меди, заключенной в координационные сферы купроэнзимов, сочетаются с высокой токсичностью ее свободных ионов. Несвязанные белками ионы Cu, реагируя с пероксидом водорода, становятся причиной появления АФК, которые в свою очередь разрушают нуклеиновые кислоты, белки и липиды (*Valko et al., 2005*). Ионы Cu также могут нарушать структуру Fe-S кластеров, замещать ионы Zn в белках, содержащих мотив типа цинковый палец, препятствовать фолдингу белковых молекул или вызывать агрегацию уже уложенных полипептидов (*Macomber & Imlay, 2009; Shimberg et al., 2017; Yuan et al., 2017; Saporito-Magriñá et al., 2018*). Высокая токсичность несвязанных ионов Cu, появление которых вызвано врожденными или экологически обусловленными нарушениями её метаболизма, хорошо иллюстрируется вызываемыми ими нейродегенеративными, метаболическими и онкологическими заболеваниями (*Lutsenko et al., 2007; Kaler, 2013; Denoyer et al., 2015; Ferreira & Gahl, 2017; Lowe et al., 2017; Marchi et al., 2019; Bisaglia & Bubacco, 2020; Ejaz et al., 2020*).

В соответствии с двуликим характером ионов Cu живые организмы в ходе эволюции выработали слаженную систему её транспорта и метаболизма. В её рамках ионы Cu передаются от одного компонента к другому в результате прямых белок-белковых контактов по градиенту силы связывания иона. Высокая аффинность участников этой системы к меди позволяет безопасно доставлять её в места формирования купроэнзимов, поддерживая концентрацию свободных ионов металла пренебрежимо малой (*Rae et al., 1999*). Описанная клеточная система транспорта меди человека включает в себя её импортеры в клетку (CTR1, DMT1), цитозольные шапероны (CCS, ATOX1, COX17 и другие) и экспортирующие переносчики (АТР7А, АТР7В) (*Kaplan & Maryon, 2016*). Несмотря на достижения в понимании молекулярных механизмов работы этой системы, остаётся целый ряд открытых вопросов, касающихся в том числе и импорта меди в клетку, на этапе которого контролируется как скорость поступления металла, так и его внутриклеточное распределение. CTR1 - единственный описанный селективный и высоко аффинный транспортер меди в клетку, консервативный на широком филогенетическом интервале от дрожжей до человека (*Mandal et al., 2020*). Его гомотример образует в мембране купрофильную пору, проницаемую для ионов Cu(I) (*Tsigelny et al., 2012*). Альтернативным переносчиком служит DMT1 (Me^{2+}/H^{+} -симпортёр), он способен переносить целый ряд двухвалентных катионов, в том числе и Cu(II) (*Arredondo et al., 2014; Lin et al., 2015*). Чёткое разделение клеточной меди на два пула: каталитический и регуляторный, наличие двух описанных транспортеров, переносящих разные формы меди, позволяет предположить, что CTR1 и DMT1 селективно переносят ионы Cu для участия в двух типах медь-зависимых процессов с принципиально различными механизмами использования этого металла. Недостаточно изучена и роль N-концевого эктодомена CTR1 (NdCTR1) в первичном связывании внеклеточной меди. Понимание работы NdCTR1 важно также для выяснения механизмов поступления в клетку противоопухолевого препарата цисплатина, который поступает туда через CTR1, конкурируя с ионами Cu (*Kuo et al., 2021*).

Настоящая работа фокусируется на изучении альтернативных путей поступления меди в клетку человека. Актуальность исследования обусловлена жизненной важностью ионов Cu, их вовлеченностью в патогенез социально-значимых заболеваний и центральной ролью этапа клеточного импорта в составе системы метаболизма меди.

Цель исследования - изучение поступления меди в клетку человека через транспортеры CTR1 и DMT1, выяснение их биологических ролей, а также свойств N-концевого эктодомена CTR1.

Для достижения цели поставили **задачи**:

1. Получить клеточные линии человека, с нокаутированными генами *CTR1*, *DMT1* и одновременным отсутствием обоих.
2. В полученных модельных клетках рассмотреть субклеточное распределение ионов Cu, ионов Ag(I), как маркера метаболических путей Cu(I), устойчивость клеток к этим металлам. Изучить влияние отсутствия транспортеров на экспрессию генов, кодирующих купроэнзимы и медь-регулируемые белки.
3. Изучить свойства NdCTR1 в *E. coli* и *in vitro*.

Научная новизна. Это первое исследование ролей CTR1 и DMT1 человека в условиях одновременного перманентного нокаута двух этих генов. Удалось показать различия в направлениях меди, поступающей через транспортеры, а также специфичность каждого из них. Так, CTR1 преимущественно переносил Ag(I), аналог Cu(I), тогда как DMT1 был важнее для поступления Cu в митохондрии и ядерную фракцию. Наблюдали компенсаторные эффекты, выражающиеся в повышенной экспрессии одного транспортера при отсутствии другого. Проведенные эксперименты подчёркивают важность ионов Cu для функционирования митохондрий и ядра, которые могут выступать и в качестве его депо при недостаточности металла, тогда как цитозоль модельных клеток почти полностью лишался ионов Cu при нокауте любого из переносчиков. Показан дифференциальный отклик ряда медь-ассоциированных генов на отсутствие

каждого из транспортеров. Нокаут DMT1 активировал экспрессию *CCS*, *XIAP* и *HIF1 α* , тогда как отсутствие CTR1 также активировало *HIF1 α* , но снижало активность *NF-kB* и *SOD1*. Судя по результатам, отсутствие меди, поступающей через DMT1, может выступать в качестве сигнала о её дефиците, что приводит к реализации клеточной стратегии по сохранению этого металла, реализованной через XIAP, CCS и COMMD1.

В работе впервые исследованы свойства рекомбинантного NdCTR1 в *E. coli*. Показано, что он способен хелатировать ионы Cu и Ag(I), за счет этого снижая их токсичность, тем самым увеличивая устойчивость бактерий и к наночастицам серебра. Показано, что NdCTR1 чрезвычайно склонен к агрегации, что обсуждается в контексте его роли в олигомеризации CTR1, находящегося в мембране. Выделен хорошо растворимый рекомбинантный слитый белок GB1-NdCTR1, позволяющий исследовать NdCTR1 *in vitro*. Показано, что NdCTR1 связывает как ионы Cu(II), так и Ag(I). Этот процесс протекает в три стадии, в ходе чего образуются комплексы, где четыре молекулы белка связывают один ион металла со значением константы диссоциации в интервале 10-100 нМ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты проливают свет на пути поступления меди, которая имеет разную судьбу внутри клетки: участвует в каталитических реакциях или внутриклеточной регуляции и сигналинге. Учитывая вовлеченность ионов Cu в протекание клеточных процессов первоочередной важности, представленные данные о ролях CTR1 и DMT1 в клетке человека имеют большое значение с точки зрения приумножения знаний о метаболизме меди в целом и процессе её клеточного импорта в частности. То же можно сказать и про исследованный NdCTR1, практически вся имеющаяся информация о котором получена в экспериментах на пептидах, входящих в его состав, а не полноразмерном белке. CTR1 считается одним из главных маршрутов поступления противоопухолевого препарата цисплатина в клетку, а мутации в этом переносчике ответственны за устойчивость злокачественных новообразований к этому препарату (*Kuo et al., 2021*). В связи с

этим изучение NdCTR1 также способствует выяснению механизмов импорта цисплатина в клетку. Работа подтверждает, что NdCTR1 хелатирует ионы Cu(II) и, судя по способности связывать Ag(I), также Cu(I), а значит подкрепляет концепцию работы CTR1, в которой NdCTR1 выполняет роль первичного внеклеточного акцептора ионов Cu от внецитозольных доноров. Сделаны заключения о возможности вклада гидрофобных взаимодействий NdCTR1 разных субъединиц в процесс олигомеризации функционального CTR1 в мембране.

В рамках исследования оценили устойчивость полученных клеточных моделей с нокаутом CTR1/DMT1 к ряду агентов, используемых в противоопухолевой терапии. Факт повышения устойчивости раковых клеток к нескольким из них при отсутствии CTR1 позволит клиницистам более гибко подходить к лечению пациентов, учитывая влияние уровня экспрессии *CTR1* не только на терапию платиносодержащими препаратами, но и другими веществами. В работе, на основе полученных доказательств способности NdCTR1 хелатировать медь и серебро, обсуждается возможное использование NdCTR1 в качестве естественного хелатора меди, который лишён недостатков синтетических функциональных аналогов, применяемых при медь-ассоциированных заболеваниях.

Методология и методы исследования. Эксперименты проведены на культивируемых клетках человека линии H1299 и бактериях *E. coli* BL21(DE3), синтезирующих различные рекомбинантные белки, а также на очищенном препарате белка GB1-NdCTR1. В работе использован широкий спектр генноинженерных, биохимических, молекулярно-биологических и биофизических методов, в том числе такой передовой как модификация генома эукариот с помощью системы CRISPR/cas9. Кроме этого, применяли следующие методы: ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинг и иммунопреципитация, аффинная хроматография и гель-фильтрация, MTS-тест, атомно-абсорбционная спектрометрия, UV/vis-спектрофотометрия, дифференциальное и равновесное центрифугирование, проточная цитометрия, просвечивающая электронная

микроскопия, времяпролётная масс-спектрометрия, изотермическая калориметрия титрования.

Положения, выносимые на защиту:

1. В клетках H1299 транспортеры CTR1 и DMT1 проявляют по отношению друг к другу компенсаторные функции. CTR1 переносит Cu(I), тогда как DMT1 импортирует Cu(II) в большей степени чем Cu(I).
2. Ядро и митохондрии имеют наивысшую потребность в меди среди клеточных органелл, тогда как цитоплазма содержит лабильный пул этого металла.
3. Дифференциальная экспрессия медь-зависимых генов при нокаутах CTR1 и DMT1 свидетельствует о том, что транспортёры не взаимозаменяемы.
4. NdCTR1 обладает способностью олигомеризоваться и хелатировать Cu(II) и Ag(I) в *E. coli* и *in vitro*.

Достоверность представляемых результатов. Достоверность полученных данных обеспечивается использованием адекватных современных методов исследования и специализированного рабочего оборудования, проведением экспериментов на репрезентативных группах с необходимой повторностью и воспроизводимостью результатов. В ходе анализа данных использовали корректные методы их обработки, имплементированные в специализированные программные пакеты.

Апробация результатов. Главные результаты работы представлены и обсуждены на ряде конференций: 5th International Symposium on Metallomics (9-12 сентября 2015 г., г. Пекин, Китай), 17-ой и 18-ой зимних молодежных школах ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (29 февраля-5 марта 2016 г. и 11-16 марта 2017 г., пос. Роцино, Ленинградская область), международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, Белоруссия 28-30 июня 2016 г., г. Минск, Беларусь), Joint 16th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (26-29 июня 2017 г., г. Санкт-Петербург), 42nd FEBS Congress (10-14 сентября 2017

г, г. Иерусалим, Израиль), 12-ых чтениях памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова (18-22 сентября 2017 г., г. Москва), 43rd FEBS Congress (7-12 июля 2018 г, г. Прага, Чехия), 23-ей Пуцинской международной школе-конференции молодых учёных "Биология - наука 21 века" (15-19 апреля 2019 г., г. Пушино, Московская область), 44th FEBS Congress (6-11 июля 2019 г, г. Краков, Польша).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в работе на всех её этапах от формулировки целей исследования и планирования экспериментов до их проведения, анализа данных и написания статей, представления данных на тематических конференциях.

Публикации. По теме работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы данных SCOPUS или Web of Science, а также 10 тезисов в сборниках трудов конференций, 5 из которых имеют DOI.

Поддержка исследования. Исследование проведено в МНЛ изучения метаболизма микроэлементов Университета ИТМО за счёт средств программы «5 в 100». Работа поддержана следующими грантами РФФИ: 15-04-06770 А, 18-015-00481 А, 18-515-7811 Итал_т, 19-315-90129 Аспиранты, 20-515-7813 Итал_т.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

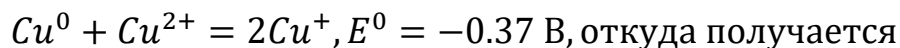
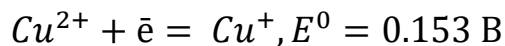
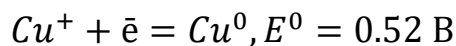
1.1. Физико-химическая характеристика меди

Медь (Cu) - химический элемент 11-ой подгруппы 4-ого периода периодической таблицы Менделеева с атомным номером 29. Атом меди имеет электронную конфигурацию $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$, которая получается в результате перехода одного электрона с 4s подуровня для заполнения последней орбитали 3d подуровня. Несмотря на $4s^1$ конфигурацию, свойства Cu сильно отличаются от свойств щелочных металлов. Благодаря электронному переходу с $3d^{10}$ на $4s^1$ подуровень, соответствующему поглощению света с длиной волны сине-зеленого цвета, медь в отличие от многих металлов имеет не серую или серебристую окраску, обусловленную однородным отражением падающих фотонов. Поскольку заполненная $3d^{10}$ оболочка гораздо хуже экранирует заряд ядра для $4s^1$ электрона по сравнению с электронной оболочкой благородного газа, энергия первичной ионизации атома меди выше таковой у щелочных металлов, тогда как энергии его вторичной и третичной ионизации намного ниже чем у элементов 1-ой подгруппы (*Cotton & Wilkinson, 1980*). Таким образом, медь принадлежит к классу переходных металлов.

Природная медь представлена двумя стабильными изотопами ^{63}Cu и ^{65}Cu , распространенность которых 69.15% и 30.85%, соответственно, поэтому молярную массу меди считают равной 63.546(3) г/моль (*Meija et al., 2016*). Описано более тридцати изотопов и ядерных изомеров меди (*Audi et al., 2003*). Большинство из них имеют период полураспада менее минуты, так для ^{54}Cu он равен примерно 75 нс. Самые стабильные изотопы меди - ^{61}Cu , ^{64}Cu и ^{67}Cu характеризуются временами полураспада 3.333(5) часа, 12.5 и 62 часа, соответственно. Изотопы ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu и в особенности ^{64}Cu применяют в позитронно-эмиссионной томографии, радиоиммунологических исследованиях и радиотерапии рака (*Szymański et al., 2012*).

В химических соединениях медь встречается в степенях окисления +1, +2, +3 и +4, при этом последние две наблюдают гораздо реже, и поэтому их относят к

более экзотическим формам. Соединения Cu(I) диамагнитны и, как правило, бесцветны, тогда как Cu(II) парамагнитны и обычно имеют синий или зелёный оттенок. Баланс между Cu(I) и Cu(II) определяется следующими потенциалами (Cotton & Wilkinson, 1980):



$$K = \frac{[Cu^{2+}]}{[Cu^+]^2} = \sim 10^6$$

Взаимные стабильности Cu(I) и Cu(II) в растворах сильно зависят от концентрации меди, присутствующих анионов и окружающих лигандов. В условиях биологических сред возможны только чрезвычайно малые равновесные концентрации Cu(I), а единственные известные стабильные в воде простые соединения Cu(I), хлорид и цианат, крайне плохо растворимы. Некоординированный же Cu(I) почти полностью окисляется кислородом до Cu(II) в течение нескольких минут или даже секунд (Pham et al., 2013). Такая неустойчивость в воде обусловлена меньшей энергией сольватации иона Cu(I) и более высокой константой образования для комплексов Cu(II), вследствие его большего по сравнению с Cu(I) размера (электронные структуры $3d^{10}$ и $3d^9$, соответственно) и вдвое меньшего заряда (Cotton & Wilkinson, 1980). Предпочтительное число доноров электронной пары в координационных соединениях Cu(I) лежит в интервале от 2 до 4 с оптимумом между 3 и 4 (Kaim & Rall, 1996).

Форма Cu(II) - основная форма меди в водной среде, так как дальнейшее её окисление до Cu(III) затруднено (значение потенциала пары Cu(II)- Cu(III) сильно зависит от окружающих лигандов и лежит в интервале 0.45-1.02 В). В воде Cu(II) сольватируется и присутствует в виде гексагидрата $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$, в котором пятая и шестая молекулы воды находятся дальше от атома меди и связаны слабее остальных из-за эффекта Яна-Теллера. Добавление лигандов к описанному

сольвату приводит к последовательному формированию соответствующих комплексов за счет замещения молекул воды, пятый и шестой лиганды практически не связываются по уже упомянутой причине (*Cotton & Wilkinson, 1980*). Координационные числа в комплексах Cu(II) обычно равны 4, 5 или 6 (*Kaim & Rall, 1996*).

Соединения Cu(III) чаще диамагнитны, а сам ион в них координирован четырьмя или пятью лигандами. Хотя форма Cu(III) встречается реже, чем Cu(I) Cu(II), описан ряд в том числе и простых соединений с её участием. Известно, что комплексы депротонированных пептидов и Cu(III) в щелочных растворах демонстрируют высокую устойчивость, а в последние десятилетия появляются свидетельства о возможной роли Cu(III) в биологических реакциях (*Itoh, 2015; Keown et al., 2017; Kardos et al., 2018*). Степень окисления Cu(IV) наблюдается чрезвычайно редко, количество хорошо описанных веществ с медью в этой форме крайне мало (*Cotton & Wilkinson, 1980*).

1.2. Ионы меди в биологических системах

Медь стала биодоступна после кислородного взрыва около 2-3 млрд. лет назад, благодаря изменению восстановительного характера атмосферы на окислительный, вызванного повышением парциального давления кислорода. Это способствовало выходу меди из нерастворимых сульфидов и образованию её более устойчивого состояния Cu(II) (*Linder, 1991; Fru et al., 2016*). Медь - жизненно необходимый для живых организмов (микроорганизмы, растения, животные) микроэлемент. Анаэробные бактерии и археи, которые представляют наиболее древнюю форму жизни, хотя и используют медь крайне ограничено в силу своего бескислородного существования, в то же время зачастую имеют соответствующий метаболический аппарат для детоксикации её ионов (*Festa & Thiele, 2011*).

Аминокислотные остатки в составе белков имеют множество доноров электронной пары, поэтому ионы Cu хорошо координируются пептидами и белками, выступая в роли кислоты Льюиса. Согласно принципу жестких и мягких кислот и оснований Пирсона (HSAB) ион Cu(II) проявляет свойства более жёсткой

кислоты по сравнению с Cu(I), в силу большего заряда, меньшего размера и большей электроотрицательности первого (Pearson, 1963). Таким образом, в качестве предпочтительных лигандов Cu(II) выступают жёсткие основания, такие как азот и кислород, поэтому в связывании Cu(II) принимают участие боковые цепи остатков гистидина (His), аспарагиновой (Asp) и глутаминовой кислот (Glu). В свою очередь Cu(I) обычно образует координационные соединения с тиолами и тиозфирами, то есть с остатками серосодержащих аминокислот: цистеином (Cys) и метионином (Met) (Festa & Thiele, 2011).

На основании оптических и электронно-парамагнитных (ЭП) свойств определено несколько видов медьсодержащих сайтов в белках. Большинство белков содержат в своём составе сайты связывания меди только одного типа, но существуют примеры наличия сразу нескольких видов медьсвязывающих сайтов в одном полипептиде (Scheiber et al., 2013). Растворы белков, содержащих медный центр 1-ого типа, имеют выраженную синюю окраску благодаря электронному переходу Cu(II)-S_{Cys}, соответствующему поглощению в районе 600 нм, поэтому эти белки также называют синими медными белками (Linder, 1991). Ион Cu в нем координирован двумя остатками His и боковой цепью цистеина Cys, которые лежат в одной плоскости с ним. Кроме трёх лигандов, лежащих в одной плоскости с ионом, присутствуют четвертый, представленный боковой группой Met или глутамина (Gln), а иногда и пятый аксиальные лиганды, в роли которого выступает, карбонильная группа пептидного остова (Holm et al., 1996; Olsson et al., 1999). Структура медных центров первого типа представляет собой нечто среднее между оптимумами для связывания Cu(I) и Cu(II), что вместе с их довольно высокой жёсткостью, обеспечивающей минимальное изменение окружения при переходе иона между степенями окисления, опосредует низкую энергию реорганизации сайта в ходе реакции и способствует быстрой передаче электрона из него (Gray et al., 2000). Ион Cu в сайтах 2-ого типа координирован атомами азота и/или кислорода, лежащими в вершинах квадрата, находящимися в одной плоскостью с ионом (плоско-квадратная структура) (Linder, 1991). Бинуклеарные Cu-центры 3-его типа не обнаруживаются на ЭП спектрах по причине антиферромагнитного

сопряжения двух ионов Cu, которые входят в его структуру, и не имеют оптических особенностей (*Solomon et al., 2014*). Каждый из двух близкорасположенных ионов Cu в центрах 3-его типа координирован тремя остатками His. Оба иона могут быть обратимо связаны между собой через молекулу кислорода (*Scheiber et al., 2013*).

В дополнение к 1, 2 и 3 типам описан еще ряд Cu-центров, например CuA. CuA центр содержат 2 иона Cu на расстоянии 2.5 Å, каждый из которых координирован остатком His, один из них остатком Met, а другой кислородом карбонильной группы пептидного остова. Между собой ионы связаны посредством атомов серы двух близлежащих остатков Cys (*Holm et al., 1996; Kaim & Rall, 1996; Solomon et al., 2014*). Представленный список не охватывает все встречающиеся варианты медных центров, но включает наиболее распространенные и изученные классы.

Тип медьсвязывающего сайта белка зависит от его функции. Сайты купроэнзимов, использующие переход Cu(I)/Cu(II) для катализа биохимических реакций, обычно характеризуются большими координационными числами (4-5). Высокоаффинное связывание в этом случае позволяет избежать утечки электронов при протекании окислительно-восстановительного цикла. Белки, транспортирующие медь, в соответствии с необходимостью дальнейшей передачи ионов содержат медные центры с меньшими координационными (2-3), что позволяет ионам Cu переходить от одного переносчика к другому по градиенту плотности связывания (*Rubino & Franz, 2012*).

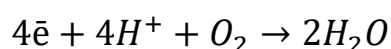
1.2.1. Медь как кофактор купроэнзимов

В ходе многолетних исследований было обнаружено, что роль ионов Cu в купроэнзимах обычно сводится к обеспечению одного из следующих процессов: перенос электрона, активация или восстановление кислорода, восстановление NO_2^- или NO_2 (*Holm et al., 1996; Solomon et al., 2014*). Благодаря широкому диапазону окислительно-восстановительных потенциалов пары Cu(I)-Cu(II) (лежат в интервале значений от 180 до 1000 мВ) ионы Cu могут выступать как в роли донора, так и акцептора электрона (*Olsson et al., 1999*). Причина такого разброса кроется в

целом ряде параметров, от которых зависит конкретное значение, к ним относят степень десольватации и гидрофобность самого активного центра; природу лигандов, координирующих ионы Cu; вовлеченность S_{cys} , координирующего ион Cu, в образование водородных связей; жесткость пептидного остова, которая определяет подвижность участвующих в координации иона доноров электронной пары в медном центре; внутрибелковые электростатические взаимодействия, приводящие к дополнительной дестабилизации определенной формы иона Cu, например за счет появления электростатического отталкивания (*Li et al., 2004; Fowler et al., 2017*).

В соответствии с выполняемой медью ролью в купроэнзимах наиболее актуально использование ионов Cu для аэробных организмов, использующих окислительные свойства кислорода в своём метаболизме (*Ridge et al., 2008*). Атмосферный кислород участвует в большом числе биохимических процессов, но свою главную функцию он выполняет в процессе клеточного дыхания, выступая в роли конечного акцептора электронов и протонов, образующихся в ходе процесса окислительного фосфорилирования, который поставляет большую часть аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) у животных и растений (*Wilson, 2017*).

Цитохром с-оксидаза (комплекс IV, COX) - терминальный комплекс в цепи переноса электронов реализует функцию восстановления кислорода до воды, сопряженную с окислением молекулы-переносчика электронов цитохрома c:



Каждая из двух субъединиц (CE) COX млекопитающих и птиц, белок обычно функционирует как гомодимер, состоит из 13 CE, 1, 2 и 3 (COX1, 2 и 3) из которых, как правило, кодируются митохондриальным геномом, тогда как остальные ядерным. COX1, 2 и 3 формируют активный центр фермента, имеющий схожую структуру на широком филогенетическом интервале от прокариот до животных (*Kadenbach & Hüttemann, 2015*). COX2 помимо других простетических групп содержит бинуклеарный CuA сайт, через который электроны «входят» в весь комплекс. Из него электроны переходят на гем а₃, а оттуда передаются в активный

кислород-связывающий сайт, организованный в СОХ1 гемом аз и мононуклеарным медным сайтом типа CuB, в котором ион Cu координирован тремя остатками His в пирамидальной геометрии (*Horn & Barrientos, 2008*).

Интересный пример использования меди живыми организмами, представляют собой **мультимедные голубые белки** (ММГБ). В большую группу ММГБ, представители которой присутствуют во всех доменах жизни, входят белки, проявляющие оксидазную: аскорбат оксидазную, ферроксидазную, лакказную, а также нитрит редуктазную и другие активности (*Vasin et al., 2013*). Все ММГБ содержат два, три или шесть купредоксиновых домена. Купредоксинами, по аналогии с ферредоксинами, называют группу медьсодержащих белков, которые за счёт ионов Cu, переносят электроны между ферментами в окислительно-восстановительных реакциях. Купредоксиновый фолд представляет собой β -бочку, сформированную восьмью β -тяжами, на периферии этого домена купредоксины содержат медный центр 1-ого типа (*Latorre & Baez-nieto, 2013*).

Так, **нитрит редуктазы** из числа ММГБ катализируют реакцию восстановления нитрит аниона до оксида азота (II), сопряженную с переносом электрона от белкового донора (*Komori & Higuchi, 2010*). Эти белки функционируют в виде кольцевого гомотриметра, медный центр 1-ого типа находится в N-концевом домене, а интерфейс двух соседних белковых молекул образует сайт 2-ого типа. В ходе ферментативной реакции медный центра 1-ого типа играет роль окислителя, принимая электрон от переносчика (например, азурин или цитохром c), тогда как второй осуществляет одноэлектронное восстановление нитрита (*Komori & Higuchi, 2010*).

Вторая более разнообразная группа ММГБ включает в себя **мультимедные оксидазы** (ММО). Представители этого класса функционируют как мономеры и обнаружены в бактериях, грибах, растениях, насекомых. В белковой глобуле находятся медные центры трех типов: в С-концевом домене - 1-ого типа, а интерфейс N- и С-концевого образуют сайты 2-ого и 3-его типа, которые вместе

составляют тринуклеарный центр, ионы Cu в нём расположены в вершинах равностороннего треугольника на расстоянии порядка 4 Å друг от друга (*Holm et al., 1996*). Как и в случае нитрит редуктаз, сайт 1-ого типа окисляет субстрат, два медных центра находятся на расстоянии около 13 Å и связаны между собой консервативным мотивом His-Cys-His, по которому электрон и передаётся во время протекания реакции (*Gräff et al., 2020*). В тринуклеарном центре происходит, сопряженное с ферментативной реакцией восстановление кислорода до воды.

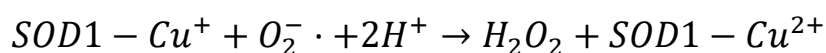
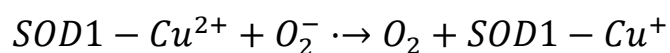
К ММО относят гомологичные феррооксидазы позвоночных **церулоплазмин** (ЦП), **гефестин** и **циклопен**, которые способны окислять и другие субстраты, активность проявляют в виде мономеров (*Vasin et al., 2013*). Каждый четный домен этих белков содержит по медному центру 1-ого типа, а в интерфейсе 1-ого и 6-ого доменов (N- и C-концевые, соответственно) находится тринуклеарный центр, аналогичный описанному выше. В ходе каталитического окисления иона Fe(II) до Fe(III) медный центр 1-ого типа принимает электрон от окисляемого субстрата, передавая его в тринуклеарный центр, где происходит восстановление кислорода (*Komori & Higuchi, 2010*). Структуру гомологичную с ЦП имеют и два других белка, обнаруженных у позвоночных: **факторы свёртываемости V и VIII**. Они играют роль кофакторов в процессе образования кровяного сгустка, стабилизируя и повышая процессивность эффекторных протеаз (*Camire & Bos, 2009*). Эти белки не относятся к купроэнзимам, хотя несут ион Cu, который, по-видимому, выполняет функцию структурного кофактора, так как необходим для правильной работы белков (*Villoutreix & Dahlbäck, 1998*).

Хотя ММГБ участвуют в реакциях разного типа и функционируют в различном олигомерном состоянии, их модульное строение чрезвычайно схоже (*Gräff et al., 2020*). Предполагается, что все ММГБ произошли от общего предка, имевшего единственный купредоксиновый домен, а всё наблюдаемое многообразие ММГБ появилось в результате многократных дупликаций. Так, в случае высших эукариот, они должны были случиться минимум 4 раза, чтобы

образовались все 5 наблюдаемых 6-доменных гомологов: ЦП, гестин, циклопен, факторы свёртываемости крови V и VIII (*Vasin et al., 2013*).

Передача электронов молекуле кислорода (процесс, катализируемый многими купроэнзимами), неразрывно связана с образования активных форм кислорода (АФК), в данном случае супероксид радикала $O_2^{\cdot-}$, который появляется при неполном протекании реакции. Супероксид радикал, имея свойства окислителя, хотя и с умеренной реакционной способностью, приводит к образованию других видов АФК, вместе с которыми окисляет клеточное окружение, что влечет за собой деактивацию молекулярных машин, нарушение структур мембран и повреждение ДНК (*Snezhkina et al., 2019*).

Фермент супероксиддисмутаза (SOD) играет важную роль в антиоксидантной защите клетки, катализируя реакцию диспропорционирования кислорода (*Fridovich, 1997*). Описано несколько видов SOD, среди которых Cu/Zn-, Mn-, Fe- и Ni-содержащие. У человека встречается две формы **Cu/Zn-SOD**: внутриклеточная (SOD1) и внеклеточная (SOD3). SOD1 присутствует в цитоплазме, межмембранном пространстве митохондрий, лизосомальной фракции и ядре, проявляя активность в виде димера (*Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001*). SOD3 локализована вне клеток: в плазме крови, цереброспинальной жидкости, лимфе и семенной жидкости, функционирует как гомотетрамер (*Antonyuk et al., 2009*). Ион Cu необходим для протекания двухстадийной каталитической реакции, выступая сначала в роли акцептора, а потом донора электрона:



Cu/Zn-SOD обнаружены во всех доменах жизни, где служат первой линией антиоксидантной защиты, а нарушения в их работе часто влекут за собой неблагоприятные последствия для жизнедеятельности организма (*Ridge et al., 2008; Wang, Y. et al., 2018*).

Ионы Cu необходимы для работы **лизилоксидаз** (LOX). LOX катализируют конверсию концевых аминов остатков лизина коллагена и эластина в высоко реактивные альдегидные группы, которые спонтанно реагируют с близлежащими молекулами, обеспечивая структурирование внеклеточного матрикса за счет появления внутри и межмолекулярных сшивок (*Martínez-González et al., 2019*). Недостаточность меди вызывает угнетение функции LOX, которое влечет за собой нарушения в формировании соединительной ткани (*Mäki et al., 2005*). Известны также четыре LOX-подобных (LOXL 1-4) секреторных белка. Все они имеют сходный с LOX каталитический центр, включающий медь-связывающий мотив, лизин/тирозилхиноновый кофактор и домен, подобный цитокиновому рецептору. Функции LOXL окончательно не установлены. Показано, что они могут быть как онкосупрессорами, так индукторами инвазии и метастазирования опухолей (*Wu & Zhu, 2015*).

Купроэнзимы встречаются в эндокринной и нервной системах: **пептидил-глицин α -амидирующая монооксигеназа** (РАМ) и **дофамин- β -гидроксилаза** (DBH), участвуют в активации нейропептидов, путём превращения С-концевого глицина в амид, и метаболизме катехоламинов, гидроксилируя дофамин, соответственно. Оба фермента в ходе реакции окисляют аскорбат (*Lutsenko et al., 2019*).

Тирозиназа меланоцитов млекопитающих, содержащая медь в активном центре, контролирует процесс образования меланина, полимерного пигмента эукариотов, ответственного за окрашивание покровных тканей и их производных, организующих защиту организма от УФ-излучения (*Noh et al., 2020*). Существуют предположения об участии пока недостаточно изученных медьзависимых **фенолоксидаз** моллюсков в иммунной реакции на их заражение паразитическими организмами. Липополисахаридные или углеводные компоненты паразита инициируют активацию профермента, который в ходе катализируемого окисления фенолов продуцирует различные токсичные формы кислорода и азота, атакующие чужеродные ткани вокруг (*Coaglio et al., 2018*).

1.2.2. Некаталитические функции ионов меди

С первой половины 20 века, когда медь обнаружили в крови, а её недостаток связали с анемией вследствие нарушений метаболизма железа (*Mills, 1930*), этот металл долгое время рассматривали исключительно как кофактор купроэнзимов. В противоположность концепции «статичной меди» за последние годы появилось множество свидетельств о динамической роли её ионов в биологических системах. К настоящему времени известно, что медь может быть мобилизована клетками для участия во внутриклеточном и межклеточном сигналинге в роли вторичного мессенджера, точно контролируя активность белков или определяя метаболизм клетки в целом (*Ackerman & Chang, 2018*). Выступая в роли аллостерического кофактора, ионы Cu также регулируют работу транскрипционных факторов, мембранных рецепторов, ферментов. По всей видимости, при протекании всех упомянутых процессов ион Cu не меняет степень окисления.

Ещё в конце 20 века были опубликованы данные, подтверждающие высвобождение Zn во внеклеточное пространство в ходе нейрональной активности гиппокампа (*Assaf & Chung, 1984*). Это показало принципиальную возможность участия переходных металлов в нейросигналинге. Впоследствии подобные наблюдения появились и для ионов Cu. Первые работы из этой области описывали накопление радиоактивной ^{67}Cu в синапсах нейронов гиппокампа с последующим её высвобождением при деполяризации, вызванной добавлением ионов калия. Предпосылками к исследованию стала высокая концентрация ионов Cu наблюдаемая в секреторных везикулах пресинаптической области (*Hartter & Barnea, 1988*). К высвобождению радиоактивной меди приводила и активация нейронов нейромедиатором NMDA (*Schlieff et al., 2005*). В дальнейшем благодаря появлению специфичных к ионам Cu флюоресцентных проб удалось наблюдать их антероградный транспорт в нейронах (*Ackerman & Chang, 2018*). Хотя до сих пор **нейрофизиологическая** сторона биологического действия меди исследована плохо и существует явный дефицит экспериментальных данных, предполагается, что её функция в первую очередь заключается в модуляции нервных процессов за

счет ингибирования центральных сигналов торможения (*Kardos et al., 2018*). Это подтверждается в том числе детектируемым учащением спонтанной активации нейронов гиппокампа при снижении уровня меди в них после инкубации с хелаторами меди (*Dodani et al., 2014*).

За развитие рака ответственны в первую очередь мутации в генах, продукты которых отвечают за клеточную пролиферацию, дифференциацию и апоптоз. Один из известных сигнальных путей, мутации в компонентах которого приводят к развитию большого числа злокачественных новообразований - **сигнальный путь MAPK** (*Davies et al., 2002*). Последовательное взаимодействие киназ Ras-Raf-MEK-ERK передаёт сигнал от связывания внеклеточных митогенов с мембранным рецептором в ядро клетки, где вызывает продукцию пролиферативных факторов (*Peyssonnaux & Eychène, 2001*). В 2012 году было обнаружено, что снижение поступления меди в клетку путём нокаута её транспортеров или хелированием ведёт к угнетению активности пути MAPK (*Turski et al., 2012*). Как выяснилось позже, киназа MEK способна связываться и фосфорилировать нижележащий по сигнальному пути фермент ERK только в комплексе с двумя ионами Cu. Ограничение биодоступности этого металла снижало активность пути MAPK и замедляло темпы роста опухоли как *in vitro*, так и *in vivo* (*Brady et al., 2014*). В соответствии с этим обогащение диеты лабораторных мышей медью вызывало активацию MAPK пути, а также повышало активность нижележащего NF-κB (*Liu et al., 2020*).

Ионы Cu принимают участие в регуляции и другого сигнального пути со сходными функциями: **PI3K-Akt**. Инкубация фибробластов человека, клеточных линий HeLa, HepG2 и других типов клеток в присутствии сублетальных концентраций меди активировала сигнальный каскад PI3K-Akt, что может приводить к избеганию апоптоза клетками (*Ostrakhovitch et al., 2002; Eckers et al., 2009*). Стимуляция пути, судя по экспериментальным данным, не зависит от вышележащих относительно PI3K белков. Предполагается, что она может быть

связана с прямым взаимодействием ионов Cu и тиольных групп в РІЗК или регулирующих её белках (*Eckers et al., 2009*).

Ионы Cu вовлечены в процесс апоптоза через взаимодействие и с другим эффекторным белком - **X-сцепленным ингибитором апоптоза (XIAP)**. Он способен напрямую связываться с несколькими каспазами, блокируя их протеолитическую активность в качестве конкурентного ингибитора, кроме того XIAP проявляет E3-убиквитин-лигазную активность (*Galbán & Duckett, 2010*). Как выяснилось, XIAP регулирует уровень белка COMMD1, отвечающего за экскрецию ионов Cu из клетки, путём его убиквитинилирования, что ведёт к деградации COMMD1 и накоплению внутриклеточной меди (*Mufti et al., 2007*). XIAP и сам регулируется ионами Cu. Взаимодействия с ними влечёт за собой снижение времени жизни полипептида, нарушает его связывание с каспазами (*Mufti et al., 2007*), и увеличивает убиквитин-лигазную активность (*Liao et al., 2020*). С механистической точки зрения это связано с медь-зависимым окислением остатков Cys в доменах VIRI и VIRIII XIAP, которые принадлежат к семейству мотивов, характерных для белков-ингибиторов апоптоза (*Hou et al., 2017*). VIRIII способен координировать несколько ионов Cu. Все эти события приводят к существенному изменению конформации XIAP, возможной мультимеризации и модификации, судя по всему, отражающимся и на его функции (*Chen et al., 2019*). Известно, что модуляция активности XIAP ионами Cu тесно переплетена с активацией NF- κ B (*Lu et al., 2007; Galbán & Duckett, 2010*).

HIF1 α , α -субъединица HIF1 (фактор, индуцируемый гипоксией, 1) - центральный регулятор, отвечающий за клеточную адаптацию в условиях гипоксии, который регулирует транскрипцию более чем 100 генов (*Masoud & Li, 2015*). Под контролем HIF1 в том числе находятся процессы эритропоэза, энергетического метаболизма, клеточной пролиферации, ангиогенеза (*Xiao et al., 2020*). В наблюдениях за животной моделью сердечной гипертрофии, вызванной гипертонией было замечено, что депривация меди влияет на экспрессию фактора роста эндотелия сосудов VEGF, которая в свою очередь регулируется HIF1 (*Jiang*

et al., 2007). Выяснилось, что ионы Cu принимают участие в сборке транскрипционного комплекса с участием HIF1, ингибируя оксигеназу FHN-1, предотвращающую этот процесс (*Feng et al.*, 2009). Помимо этого, ионы Cu необходимы для связывания собранного комплекса с последовательностью цис-элемента HRE (Hypoxia Responsive Element) в промоторной области регулируемых генов. В дальнейших работах было показано, что ионы Cu выполняют еще и тонкую настройку взаимодействия HIF1 с промоторными областями. Несмотря на существенное снижение числа областей, с которыми может связаться HIF1 при гипоксии в условиях секвестрации меди, в этих условиях был активирован не только ограниченный ряд каноничных для HIF1 генов, но и набор участков генома, зависимость которых от него никогда не наблюдали в нормальных условиях (*Wu et al.*, 2019).

NF-kB - семейство транскрипционных факторов, под контролем которого находится множество процессов. Главной областью действия NF-kB считается модулирование интенсивности работы врожденного и приобретённого иммунитета, от чего зависят, например, клеточная пролиферация и апоптоз, миграция и инвазия. (*Taniguchi & Karin*, 2018). Работа NF-kB тесно связана с течением воспаления и заживлением тканей, а его дерегуляция может приводить к образованию злокачественных опухолей. Рядом работ показано влияние дефицита и избытка меди на функционирование NF-kB. К настоящему времени получены результаты, свидетельствующие как о активации сигнального пути NF-kB ионами Cu, так и его ингибировании ими (*Kenneth et al.*, 2014). Например, при внутривенном введении ионов Cu наблюдали увеличение активности NF-kB в разных видах клеток организма (*Persichini et al.*, 2006), тот же эффект воспроизводили и на клетках гепатокарциномы человека HepG2 (*McElwee et al.*, 2009). В то же время эксперименты с несколькими модельными клеточными линиями, в том числе HEK293, продемонстрировали снижение активности NF-kB в ответ на повышение внутриклеточной концентрации меди, путём её доставки туда с помощью ионофора клиохинола (*Kenneth et al.*, 2014). Хелирование меди тетраиомолибдатом, влекущее уменьшение её биодоступности, приводило к

снижению связывания NF-κB со своим сайтом на ДНК в клеточной линии SUM149, полученной из опухоли молочной железы человека (*Pan et al., 2003*). При культивация человеческих моноцитов линии THP-1 с сублетальными концентрациями ионов Cu в течение 24 часов не регистрировали никакого эффекта, заключающегося в изменении активности NF-κB (*Lewis et al., 2003*). Очевидно, что активность NF-κB модулируется ионами Cu, хотя механизм подобной регуляции пока остаётся непонятным. Среди предполагаемых вариантов рассматривают ингибирование киназного комплекса ИКК, отвечающего за активацию NF-κB (*Pan et al., 2003; McElwee et al., 2009*), или нарушение его активации воздействием через окислительный стресс (*Persichini et al., 2006; Kenneth et al., 2014*). Кажущаяся противоречивость результатов может объясняться тем, что результаты получены на клетках разного происхождения. Особенности метаболизма меди первичных тканей, их роль в поддержании её гомеостаза на уровне всего организма, могут определять как специфическую чувствительностью дочерних клеток к ионам Cu, так и характер наблюдаемых процессов.

Согласно ряду Ирвинга-Вильямса ионы Cu могут вытеснять ионы Zn из координационных соединений, к которым относятся и металлопротеины, так как её комплексы с лигандами, присутствующими в белковых молекулах, более устойчивы (*Festa & Thiele, 2011*). Домены, содержащие в своей структуре ион Zn(II), координированный боковыми цепями цистеина и гистидина, носят название **цинковых пальцев (ZF)**. Белки, имеющие такой домен (ZFP), способны связываться с нуклеиновыми кислотами и другими белками. Классический домен ZF координирует Zn двумя His и двумя Cys, всего описано около 30 различных видов структуры ZF (*Cassandri et al., 2017*). Из-за того, что Cu(I) лучше координируется мягкими лигандами, к которым относятся атомы S, боковых цепей Cys, он имеет высокое сродство к структурам ZF, в которых способен замещать ионы Zn. Это влечёт за собой изменение структуры ZF и всего полипептида, что продемонстрировали в ряде экспериментов на белках с разными типами ZF (*Doku et al., 2013*).

Белок **тристетрапролин**, содержащий 2 ZF, контролирует процесс воспаления, путём связывания с некоторыми цитокиновыми мРНК, что в свою очередь приводит к их деградации. Показано, что ионы Cu способны не только занимать РНК-связывающий домен апо-белка, но и вытеснить из него ионы Zn, тем самым предотвращая связывание с РНК (*Shimberg et al., 2017*).

Sp1 - другой общий транскрипционный фактор, *цис*-элементы которого находятся в промоторной области многих генов, содержит три канонических ZF, опосредующих его связывание с ДНК (*Hsu et al., 2012*). Он также регулирует поступление меди в клетку по принципу отрицательной обратной связи (*Yan et al., 2016*). С помощью проведенных спектрометрических экспериментов удалось показать факт вытеснения ионов Zn из ZF ионами Cu. Несмотря на сохранение структуры близкой к первоначальной, «медный палец» не связывался с целевыми мотивами ДНК, что предположительно служит клеточным сигналом к уменьшению поступления меди к клетку (*Yuan et al., 2017*).

Наблюдаемое увеличение массы белой жировой ткани при врожденных ошибках метаболизма меди однозначно свидетельствует о её участии в **регуляции липидного обмена** (*Liggi et al., 2013; Lutsenko, 2014*). Липолиз, процесс расщепления триацилглицеридов на глицерол и жирные кислоты, регулируется через цАМФ-зависимый сигналинг. Образующаяся цАМФ стимулирует протеин киназу А, активизирующую липолиз в адипоцитах. Показано, что ионы Cu служат негативным аллостерическим регулятором **фосфодиэстеразы 3 (FDE3B)**, которая расщепляет цАМФ. При дефиците меди активность FDE3B повышается и уровень цАМФ снижается, что влечет за собой падение скорости липолиза (*Krishnamoorthy et al., 2016*).

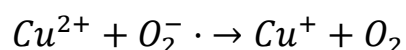
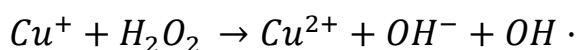
К некаталитическим функциям меди относится её способность модулировать процесс **неоваскуляризации**. Стимуляция этого процесса осуществляется через медь-зависимое повышение активности генов ростовых факторов, стабилизацию HIF1 α , изменение аффинности факторов роста к их рецепторам путем связывания с ними непосредственно (*Fukai et al., 2018*). Медь также служит кофактором

обонятельных рецепторов, распознающих небольшие серосодержащие молекулы (*Li et al., 2016*). У некоторых представителей членистоногих и моллюсков **гемоцианин**, белок гемолимфы, содержит бинуклеарные медные центры 3-го типа. Гемоцианин связывает и транспортирует молекулярный кислород, выступая в роли аналога гемоглобина (*Van Holde et al., 2001*).

Всё вышесказанное позволяет сделать однозначный вывод о широком спектре физиологических функций меди. Ионы Cu как кофактор купроэнзимов напрямую участвуют в катализе ряда жизненно важных реакций, служат аллостерическим регулятором ферментов, рецепторов и компонентов сигнальных путей, модулируют активность транскрипционных факторов, тем самым направляя процессы клеточной пролиферации и дифференциации, апоптоза, неоваскуляризации и другие. Дисгемеостаз меди, влечет за собой нарушения в целом ряде медь-ассоциированных процессов, что может приводить к развитию тяжелых патологий.

1.2.3. Токсичность меди

Важная особенностью ионов Cu - их потенциальная токсичность для всех живых организмов. Они участвуют в двухстадийной каталитической циклической реакции, протекающей по механизму реакции Габера-Вейса с участием пероксида, первая стадия которой носит название реакции Фентона (*Liochev & Fridovich, 2002*):



Механизм этой реакции не пересматривался на протяжении многих лет и только в последнее время появились исследования, сообщающие о формировании относительно короткоживущей формы Cu(III) на её промежуточном этапе (*Pham et al., 2013*). Вне зависимости от конкретного механизма, в результате реакции образуется высоко реактивный гидроксил радикал, самый короткоживущий из биологически релевантных АФК, с временем жизни порядка наносекунд, что

означает ограничение скорости реакции исключительно диффузией молекул (*Sies, 1993*). Так как перекись водорода образуется в ходе жизнедеятельности клетки, в том числе в результате детоксикации супероксид радикала, упомянутыми Cu/Zn-SOD, а указанная реакция циклична, свободные ионы Cu даже в небольшом количестве могут приводить к образованию большого количества АФК.

С токсичным действием меди связан ряд заболеваний. Пожалуй, самыми наглядными примерами её цитотоксичности служат болезнь Вильсона (БВ) человека и медь-ассоциированный печеночный токсикоз Бедлингтон-терьеров (*Fieten et al., 2012*). Причина обоих заболеваний кроется в мутациях, нарушающих клеточную экскрецию меди. Это влечет за собой накопление избытка ионов Cu в различных тканях, в первую очередь печени, мозге и роговице. С прогрессированием заболевания наблюдается развитие гепатотоксических и нейротоксических проявлений (*Lutsenko et al., 2007*). Например, классические симптомы БВ могут включать в себя тремор, дизартрию, депрессию, цирроз и фиброз печени (*Huster & Lutsenko, 2007*).

В то же время способность ионов Cu посредством АФК приводить к нарушению функции биомолекул используется иммунной системой живых организмов для борьбы с инфекциями. Так, было показано, что человеческие фагоциты при стимуляции компонентами бактериальной стенки, начинают накапливать медь. Накопление происходило главным образом в цитоплазматических везикулах и фаголизосомах. Устойчивость мутантных *E. coli* с повышенной чувствительностью к ионам Cu к фагоцитам была ниже чем у дикого штамма, и не отличалась от неё в условиях ограничения меди путём хелатирования или нокаута её транспортёров (*Hodgkinson & Petris, 2012*).

Еще один фактор токсичности меди - её, уже упомянутая, большая по сравнению с многими другими биогенными металлами (в первую очередь Zn и Fe) стабильность в составе координационных соединений (*Festa & Thiele, 2011*). Из-за этого её ионы замещают ионы железа в составе Fe-S кластеров, нарушая их функцию, что наблюдали как *in vitro*, так и *in vivo* (*Macomber & Imlay, 2009*). Тот

же процесс происходит и в случае ZF (*Doku et al., 2013; Shimberg et al., 2017*). Из-за неспецифического взаимодействия с тиольными и отрицательно заряженными группами белковых молекул ионы Cu способны стимулировать агрегацию белка, нарушать его фолдинг *in vivo* и *in vitro* (*Saporito-Magriñá et al., 2018*). Вероятно поэтому, ионы Cu способствуют развитию нейродегенеративных заболеваний человека, наиболее распространены из которых болезни Альцгеймера и болезнь Паркинсона. В случае болезни Альцгеймера было показано, что ионы Cu стимулируют продукцию β -амилоида и его фибрилlogenез (*Noda et al., 2013*), их взаимодействие также приводит к образованию АФК, сопряженному с окислением аскорбата (*Dikalov et al., 2004; Valko et al., 2016*). При болезни Паркинсона ионы Cu стимулируют агрегацию α -синуклеина, скопления которого составляют основу телец Леви (*Rasia et al., 2005*).

Нарушение гомеостаза меди играет заметную роль в развитии злокачественных новообразований, в силу участия её ионов в регуляции неоваскуляризации, клеточной пролиферации, дифференциации и миграции, перепрограммировании энергетического метаболизма (*Ostrakhovitch & Cherian, 2004; Brady et al., 2014; Masoud & Li, 2015; Ashino et al., 2018*), а также апоптоза и других клеточных процессов (*Lu et al., 2007*), как это указано выше.

1.3. Круговорот меди человека

Хотя последний абзац предыдущего раздела не относится к непосредственной токсичности ионов Cu, из него становится понятно насколько серьёзными могут быть последствия нарушений её гомеостаза. Медь - третий наиболее распространенный микроэлемент (элементы, чьи концентрации составляют порядка ppb) в организме человека после железа и цинка. В теле взрослого человека содержится порядка 100 мг меди с максимальными концентрациями этого металла в тканях печени, мозга, сердца, почек и костях (*Linder, 1991*). Ионы Cu поступают в организм вместе с пищей и в меньшей степени с жидкостью. Считается, что за сутки человек усваивает микрограммовые количества Cu, но в случае усиленного обогащения пищи этим микроэлементом

описано поступление порядка 13 мг за месяц (*Linder & Hazegh-Azam, 1996*). Медьсодержащие белки расщепляются в желудке, теряя координируемые ионы Cu. Как показали ранние эксперименты с ^{64}Cu и сегментами кишечника, ионы Cu всасываются преимущественно в тонком кишечнике (*Crampton et al., 1965*). Увеличение концентрации меди во внутреннем пространстве повышало поток её ионов через апикальную мембрану энтероцитов и приводило к аккумуляции меди внутри клеток. В то же время поток через базолатеральную мембрану быстро достигал насыщения, оставаясь после этого постоянным. Эти и другие наблюдения легли в позже сформулированную концепцию, согласно которой всасывание меди в кишечнике регулируется в зависимости от нужд организма (*Lönnerdal, 2008*). Из энтероцитов медь поступает в портальную вену, где в комплексе с альбумином и, возможно, другими белковыми переносчиками переносится к печени. Вблизи гепатоцитов ион Cu связывается с двумя молекулами His, после чего переносится внутрь клеток. Печень играет центральную роль в гомеостазе меди человека. В ней ионы Cu встраиваются в секретируемый белок ЦП, который предположительно переносит их к другим тканям. Избыток ионов Cu из печени экскретируется в желчь, она же в первую очередь страдает от их гипераккумуляции (*Kim et al., 2008; Puchkova et al., 2018*).

Экспериментаторы прошлого века часто использовали в своих работах радиоактивные изотопы, в том числе и меди. Применение этого удобного инструмента в исследованиях её метаболизма затруднено из-за короткого периода полураспада её изотопов. По этой причине всё чаще в качестве метки для изучения метаболических путей меди используют хорошо отслеживаемые абиогенные ионы серебра Ag(I) (*Puchkova et al., 2019*). Ион Ag(I) имеет электронную конфигурацию $[\text{Kr}]4d^{10}$, похожую на структуру Cu(I), $[\text{Ar}]3d^{10}$. Совокупность разных факторов: схожесть электронных оболочек, одинаковый заряд ионов и близкие размеры определяют их сходные физико-химические свойства, включая координационные. По этой причине Ag(I) могут замещать Cu(I) в некоторых белках, связывающих медь (*Veronesi et al., 2015*). Так, было показано, что ионы Ag(I), как и ионы Cu(I), могут вытеснять Zn(II) из ZF, что нарушает их строение и функцию (*Kluska et al.,*

2020), сходным образом можно объяснить и повышение уровня фосфорилированности ERK вышележащей киназой MEK при наличии в среде ионов Ag (*Brady et al., 2014*). Тем не менее, так как Ag(I) имеет свойства мягкой кислоты Льюиса, он, судя по всему, не способен быть координирован остатками His, и поэтому не связывается медными центрами некоторых купроэнзимов (*Ilyechova et al., 2014*). Невозможность же окислительно-восстановительного перехода Ag(I)/Ag(II) (как аналогичного Cu(I)/Cu(II)) обуславливает нарушение ферментативной активности медь-зависимых ферментов при встраивании в них Ag(I), ярким примером чего служит потеря энзиматической активности ЦП (*Hirasawa et al., 1997*).

Из-за высокой токсичности свободных ионов Cu, на молекулярном уровне клеточная система транспорта меди (СТМ) человека представляет собой ансамбль белковых молекул, плотно связывающих Cu и передающих их друг другу в результате прямых контактов. Согласованная работа компонентов этой системы и их высокая аффинность к меди позволяют обеспечить отсутствие её свободных ионов. Так, согласно современным представлениям, несвязанная медь внутри клетки не детектируема, а её концентрацию оценивают ниже 10^{-18} М, что соответствует менее чем одному иону на клетку (*Kaplan & Maryon, 2016*).

В СТМ входят молекулы нескольких типов:

1. Трансмембранные белки-переносчики меди, осуществляющие импорт ионов меди через мембрану клетки (CTR1, DMT1)
2. Внутриклеточные переносчики меди (CCS, ATOX1, CuL, COX17) и секвестрирующие её трипептид глутатион (GSH) и металлотионеины
3. Трансмембранные транспортеры, переносящие ионы Cu в нецитозольное пространство (ATP7A, ATP7B, CTR2, slc25a3)

Упрощенная схема транспортировки меди на клеточном уровне приведена на рисунке 1.1.

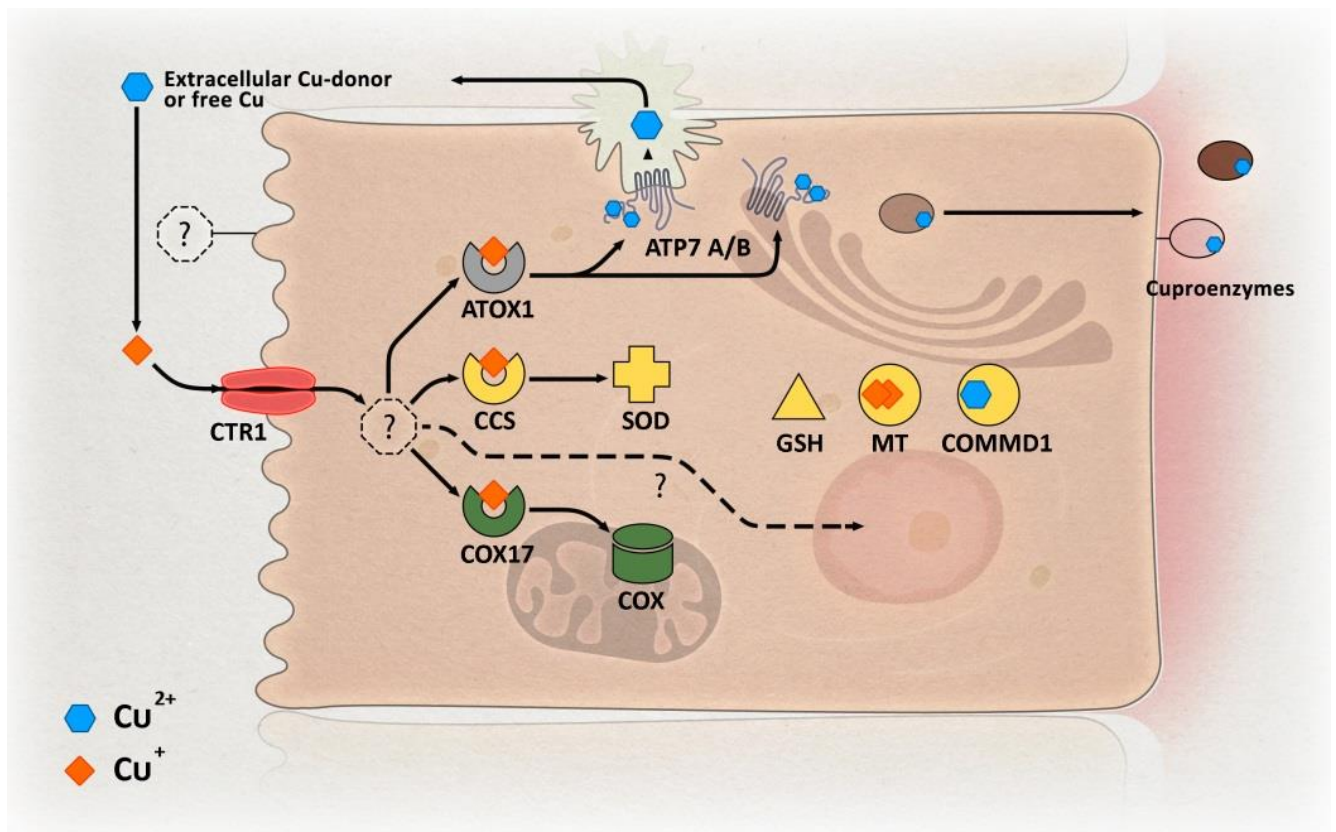


Рисунок 1.1. Упрощенная схема транспорта меди в эукариотической клетке

1.3.1. Шапероны меди и металлотионеины

После переноса меди в клетку она связывается с белками-шаперонами и низкомолекулярными молекулами, которые транспортируют её ионы к местам использования. Существующие данные свидетельствуют о первостепенной потребности в меди митохондрий, что можно объяснить их ролью в жизненно важном медьзависимом процессе клеточного дыхания. В настоящее время митохондрии также рассматриваются как клеточное депо Cu (*Kim et al., 2008*).

COX17 (рис. 1.1) - малый белок массой порядка 8 кДа, содержащий 7 остатков Cys, один из наиболее хорошо изученных потенциальных переносчиков меди в митохондрии (*Maira Glerum et al., 1996*). На основании способности COX17 связывать до 4 ионов Cu и локализации COX17 как в цитоплазме, так и межмембранном пространстве (ММП) митохондрий, изначально предполагалось, что он необходим для доставки меди в эту органеллу. На это указывали и данные, демонстрирующие, что потеря COX17 ответственна за нарушение сборки

комплекса COX (*Amaravadi et al., 1997*). Позднее выяснилось, что COX17 важен для сборки функционального комплекса, но не встраивает в него ионы Cu: это осуществляют другие шапероны (SCO1, SCO2, COX19, COX23) (*Cobine et al., 2021*). На данный момент консенсус о путях поступления Cu в митохондрию не достигнут: рассматривают различные возможные механизмы и переносчики, при том, что ни один из них не опровергает другой. Так, упомянутые **COX19**, **COX23**, как и COX17 - малые белки с множественной локализацией (цитоплазма и ММП) и способностью связывать ионы Cu, также выступают в качестве подходящих кандидатов на роль курьеров ионов Cu в митохондрии, эту функцию приписывают и трипептиду **GSH** (*Zischka & Einer, 2018*). Относительно недавно был открыт малый матанобактин-подобный комплекс (**CuL**), консервативный на широком участке филогенетического древа от дрожжей до млекопитающих и способный связывать ионы Cu. Его структура пока остаётся неизвестной, допуская и небелковую природу, но обнаружение CuL в цитоплазме наряду с ММП и матриксом митохондрий, позволяет предполагать, что он вовлечен во все этапы митохондриального транспорта меди (*Cobine et al., 2006, 2021*)

Хотя в митохондриях локализована собственная формы супероксиддисмутазы, Mn-зависимая, второй известный Cu-зависимый фермент ММП митохондрий - это Cu/Zn-SOD. Кроме ММП и цитоплазмы, основного места её локализации, SOD1 была обнаружена и в ядре (*Tsang et al., 2014*). Вне зависимости от компарментализации SOD1 для формирования её функционального гомодимера необходим шаперон **CCS**, доставляющий и встраивающий в неё ион Cu, который CCS предположительно получает напрямую от клеточного импортера (*Skopp et al., 2019*). CCS имеет массу около 27 кДа и содержит три домена, первый из которых координирует ион Cu мотивом MHCXXC (*Fetherolf et al., 2017*). Доставка в митохондрии CCS сопряжена с доставкой туда и апо-SOD1: они переносятся через внешнюю мембрану в составе гетеродимера. Транспорт осуществляется комплексом MIA40-ERV1 через образование межмолекулярных дисульфидных связей, уже в ММП происходит процесс созревания SOD1, описанный выше (*Baker et al., 2017*). Известно также о CCS-

независимом встраивании Cu в SOD1, этот процесс наряду с CCS-зависимым наблюдается и в клетках человека. Предполагается, что в некоторых случаях функцию CCS выполняет GSH (*Jensen & Culotta, 2005; Fetherolf et al., 2017*). Помимо созревания SOD1, CCS, судя по всему, участвует в активации HIF1, играя роль донора меди, т.к. эти два белка копреципитируют из ядерных экстрактов (*Feng et al., 2009*). В то же время активность самого CCS увеличивается в результате убиквитинилирования со стороны XIAP, не ведущего к протеосомальной деградации шаперона. Лигазная активность XIAP вырастает в ответ на повышение уровня меди в клетке, поэтому описанный механизм может являть собой интересный пример регуляции интенсивности работы клеточной антиоксидантной системы в ответ на появление потенциально токсичного металла (*Brady et al., 2010*).

При поступлении Cu в клетку для того, чтобы избежать её токсического воздействия, избыточные ионы секвестрируются или выводятся. Первая стратегия реализуется главным образом белками **металлотioneинами** (MT). MT - семейство малых (60-70 а.о.) мономерных белков, около 30% аминокислотного состава которых представлено остатками Cys. Мотивы, содержащие Cys организованы одним из следующих образов CC, CXС или CXXC. В эволюционно консервативном белке выделяют два металлсвязывающих домена, демонстрирующих высокую аффинность к широкому спектру тяжелых металлов (Zn, Cu, Cd, Pb, Hg и другим), соединенных гибкой линкерной последовательностью. Первый домен способен координировать до 4 двухвалентных ионов, а второй 3. Экспрессия MT зависит от многих факторов, например, она может быть индуцирована стероидными гормонами, цитокинами, факторами роста, АФК и ионами тяжелых металлов (*Dziegiel et al., 2016*). Последний вариант отражает основную задачу MT - связывание избытка ионов металла и задействует транскрипционный фактор MTF1, индуцирующий экспрессию MT после связывания с промоторной областью их генов. MTF1 принадлежит классу ZFP, эксперименты показывают, что клеточный MTF1 в нормальных условиях представлен как апо-, так и холоформами, а MT в основном связан с ионами Zn (*Orłowski & Piotrowski, 1998*). MT может связывать до 12 Cu(I), которые по сравнению с Zn имеют большую

аффинность к МТ, поэтому способны вытеснять последние (*Calvo et al., 2017*). Они в свою очередь встраиваются в ZF MTF1, активируя его, что приводит к синтезу МТ и уменьшению концентрации свободного металла в клетке (*Dong et al., 2015*). Важность МТ в детоксикации меди при её избытке (*Kelly & Palmiter, 1996; Tapia et al., 2004*) и в роли её активируемого клеточного депо в условиях ограниченного поступления (*Suzuki et al., 2002; Ogra et al., 2006*), однозначно показана рядом экспериментальных работ.

Трипептид **GSH** также может играть заметную роль в секвестрации и мобилизации меди, хотя его аффинность на несколько порядков ниже чем у МТ (*Morgan et al., 2017*). Примечательно, что упомянутый MTF1, активируемый при избытке ионов Cu, стимулирует экспрессию гена тяжёлой цепи γ -глутамилцистеин синтазы, которая главным образом контролирует синтез GSH (*Tapia et al., 2004*). Показано, что снижение уровня GSH в печени крыс, накапливающих в ней медь из-за генетического дефекта, влечёт за собой дальнейшее затруднение её выведения в кровь и желчь, сопровождающееся усилением аккумуляции (*Ogra et al., 2010*).

Для экспорта меди из клетки или встраивания в активный центр секреторных купроэнзимов ионы Cu должны быть доставлены к АТФазам Р-типа АТР7А или АТР7В, локализованным в мембране транс-аппарата Гольджи (АГ), цитоплазматических везикул или клеточной мембране. Эту функцию выполняет шаперон **АТОХ1**. АТОХ1 впервые обнаружили в *S. cerevisiae* как белок с антиоксидантными свойствами. Это небольшой цитозольный белок с высоко консервативной последовательностью, её идентичность среди млекопитающих составляет порядка 85%. Нокаут АТОХ1 у мышей приводит к гибели половины помёта вскоре после рождения. У выживших особей выявляют серьёзные дефекты развития, а клетки, лишённые этого шаперона, накапливают медь вследствие нарушений её выведения (*Hamza et al., 2001*). Белок связывает 1 ион Cu уже упомянутым консенсусным мотивом МХСХХС. Интересно, что убиквитический GSH регулирует состояние окисления АТОХ1, что отражается на его координационных свойствах по отношению к Cu. Сниженная концентрация

восстановленного GSH приводит к окислению Cu-связывающего сайта АТОХ1, сказываясь на его способности координировать металл и доставлять к АТР7А/В (*Hatori et al., 2016*). Одним из механизмов защиты Cys связывающего сайта АТОХ1 от окисления может быть их глутатионилизация при участии глутаредоксина 1 (*Brose et al., 2014*).

АТОХ1 также известен своей антиоксидантной активностью. Оверэкспрессия АТОХ1 восстанавливает скорость клеточного роста при нокауте SOD1 у дрожжей *S. cerevisiae* (*Lin & Culotta, 1995*) и защищает человеческие нейроны от АФК (*Kelner et al., 2000*). Точный механизм наблюдаемых явлений пока не раскрыт, но предложены два наиболее вероятных объяснения, которые могут дополнять друг друга. Так, АТОХ1 в качестве шаперона необходим для созревания внеклеточной Zn/Cu-SOD3. Помимо этого, он сам проявляет SOD-подобную активность (примерно в 500 раз менее активен по сравнению с SOD1), которая не зависит от функции шаперона, но пропадает при потере способности связывать ион Cu (*Portnoy et al., 1999*). В добавок к этому АТОХ1 может выступать в роли транскрипционного фактора, индуцируя экспрессию ряда генов, среди которых и SOD3 (*Itoh et al., 2008*).

1.3.2. Созревание купроэнзимов и экспорт меди из клетки. АТФазы АТР7А и АТР7В

АТОХ1 переносит ионы Cu к мембранным АТР7А/В, которые в свою очередь осуществляют их АТФ-зависимый экспорт во внецитозольное пространство будь то люмен АГ, тогда перенос сопряжён с металлизацией купроэнзимов, эндосомальное пространство или внеклеточная среда. Гены, кодирующие АТР7А/В, открыли в 90-х годах прошлого века во время поиска молекулярных детерминант болезни Менкеса и Коновалова-Вильсона. Выяснилось, что дефекты в АТР7А приводят к БМ, тогда как АТР7В к БВ (*Lutsenko & Petris, 2003*). Интересно, что эксперименты на клеточных линиях с мутациями в каждом из генов выявили накопление меди клетками, из чего следует участие белков в экскреции меди (*Skjørringe et al., 2017; Parisi et al., 2018*). Это шло вразрез

с противоположными фенотипами, наблюдаемыми у больных: при БМ наблюдается явный дефицит меди, тогда как БВ характеризуется её повышенной аккумуляцией и проявлениями, связанными с токсичностью меди (*De Bie et al., 2007*). Кажущееся противоречие разрешилось с определением тканеспецифичности экспрессии этих генов. Так, *ATP7A* экспрессируется в клетках негепатоцитарного ряда, в том числе энтероцитах, тогда как *ATP7B* главным образом в клетках печени и в меньшей степени в мозгу, почках, сердце, плаценте и лёгких. Нарушение транспорта меди из энтероцитов «запирает» её ионы внутри этих клеток, делая недоступными для остальных тканей, а неправильная работа или деактивация *ATP7B* не даёт вывести избыток из главных накапливающих её органов: печени и мозга (*Lutsenko & Petris, 2003*).

Гомологичные *ATP7A/B* принадлежат к P_{1B} -подтипу АТФаз Р-типа. Два белка демонстрируют высокую структурную, идентичность последовательностей около 60%, и функциональную схожесть. В ходе цикла аутофосфорилирования/дефосфорилирования они осуществляют перенос ионов Cu через разные типы мембран. На цитозольном N-конце белка (MBD) находится шесть металлсвязывающих сайтов, каждый из которых содержит консервативный MHCXXC, тот же что у АТОХ1, SOD и CCS. Точный механизм передачи иона Cu от АТОХ1 N-концевому концу *ATP7A/B* пока неизвестен, предполагается, что главную роль в их взаимодействии играют противоположно заряженные сегменты поверхностей белков (*Telianidis et al., 2013; Hatori & Lutsenko, 2016*). В условиях нормальной физиологии клетки *ATP7A/B* локализованы в мембране транс-АГ. *ATP7A* металлирует такие секреторные купроэнзимы как LOX, PAM, DBH, тирозиназа, SOD3. Их недостаточность приводит к тяжёлым нарушениям формирования соединительной ткани и неврологическим дефектам (*De Bie et al., 2007*).

В транс-сети АГ гепатоцитов *ATP7B* играет ключевую роль в созревании ферроксидазы ЦП, встраивая в неё все шесть ионов Cu , необходимых для её функционирования (*Polishchuk, 2019*). Эта способность есть не только у *ATP7B*,

так, АТР7А способен встраивать ионы Cu в ЦП, секретлируемом макрофагами (*White et al., 2009*). ЦП принадлежит классу moonlighting белков, это важный участник метаболизма железа, он способен катализировать окисление аминов, из которых *in vivo* наиболее значимы катехоламины, детоксицировать АФК, конвертировать оксид азота (II) (*Bielli & Calabrese, 2002; Linder, 2016*). ЦП, содержащий 95% всей меди сыворотки крови человека - донор ионов Cu для ряда негепатоцитарных клеток, хотя это для него не первоочередная функция. Так, дефекты функциональности ЦП или его нокаут у мышей не приводили к значимым нарушениям доставки меди другим тканям или её выведения (*Meyer et al., 2001; Linder, 2016*). Кроме ЦП, как белки, транспортирующие медь периферическим тканям, наиболее важны альбумин и $\alpha 2$ -макроглобулин (*Linder, 2016*).

Роль АТР7В в металлизировании каких-либо других белков за исключением ЦП на данный момент изучена плохо. Возможно, АТР7В способен встраивать ионы Cu в гомолог ЦП гестин. Об этом говорит тот факт, что всасывание Fe, в котором гестин играет важную роль, не нарушается при тканеспецифичной инактивации АТР7А в энтероцитах (*Wang et al., 2012*).

Кроме биосинтетической роли обе АТФазы выводят ионы Cu из клетки, судя по наблюдаемым патологиям человека, именно эта их роль первоочередна для физиологии. При повышении концентрации Cu АТР7А/В из транс-АГ переходят в мембраны эндосомальных везикул, которые смещаются в сторону клеточной мембраны и в дальнейшем с ней сливаются. Таким образом, по пути к цитоплазматической мембране эти АТФазы сначала секвестрируют ионы Cu в эндосомах, а затем напрямую выводят из клетки (*La Fontaine & Mercer, 2007*). В процессе внутриклеточного траффика АТР7В непосредственное участие принимает ранее упоминавшийся COMMD1, модулируемый в свою очередь Cu-сенсором ХIАР. Показано, что количество COMMD1 в клетках HepG2, а также состояние доменов, связывающих компоненты клеточной мембраны регулируют локализацию и деградацию АТР7В, в случае АТР7А под контролем COMMD1 находится деградация АТФазы (*Materia et al., 2012; Stewart et al., 2019*).

Экскреторная функция АТР7А наиболее важна в энтероцитах, где она переносит поступившие с пищей ионы Cu через базолатеральную мембрану в кровь, тогда как АТР7В в гепатоцитах, для выведения излишка меди из организма в желчь. Показательно, что в случае АТР7А токсичность меди в энтероцитах частично преодолевается повышенной экспрессией генов МТ (*Kelly & Palmiter, 1996; Gudekar et al., 2020*).

В тканях молочной железы и плаценты, одновременно активны обе АТФазы, осуществляя строгий контроль за поступлением меди к плоду. Судя по имеющимся данным, полученным в экспериментах на клеточных и животных моделях, АТР7А в молочной железе экскретирует медь из неё в кровотоки, тогда как АТР7В переносит её в молоко в составе ЦП (*Llanos et al., 2008; Platonova et al., 2017*). В то же время в плаценте АТР7А снабжает медью ткани плода, а АТР7В выводит в циркуляцию матери (*Wadwa et al., 2014*). Одновременная экспрессия генов, кодирующих АТР7А/В, наблюдается и в почках, которые известны необычным фенотипом накопления Cu в отличие от других тканей как при БВ, так и БМ. Существенное отличие заключается в менее выраженных по сравнению с другими органами симптомами. Известно, что роль основного экспортера играет АТР7А (*Linz et al., 2008*), а особая укороченная изоформа АТР7В, судя по всему, отвечает за биосинтетические процессы в транс-сети АГ (*Barnes et al., 2009*).

В последнее время находится всё больше точек вовлечения АТР7А/В в новые патологии и процессы. Так, уровень и локализация АТР7А в эпителии почечных канальцев менялись в зависимости от стадии онтогенеза, регуляция работы медных АТФаз АТР7А/В была замечена и во время дифференциации нервной ткани (*Linz et al., 2008; Hatori et al., 2016*). Гетерозиготные мутации АТР7В рассматривают как один из факторов развития болезни Альцгеймера (*Squitti et al., 2013*) и болезни Паркинсона, в том числе её раннего дебюта (*Ilyechova et al., 2019*). Появляются сообщения о вовлечении АТР7А и Cu в процесс клеточной миграции (*Ashino et al., 2010, 2018*).

1.3.3. Поступление меди в клетку

Основным транспортером меди в клетку уже более 20 лет считается белок **CTR1**. Первый переносчик семейства CTR1 обнаружили в *S. cerevisiae* как необходимый для метаболизма другого микроэлемента, железа (*Dancis et al., 1994*). Через несколько лет по способности комплементировать делецию *CTR1* дрожжей, описали гомологичный ему транспортер человека. Оверэкспрессия гена *CTR1* приводила к избыточному накоплению меди и проявлению медь-ассоциированной токсичности (*Zhou & Gitschier, 1997*). Витальность функции CTR1 была однозначно показана в экспериментах на трансгенных мышах с нокаутом его гена: генерализованный нокаут приводил к эмбриональной смерти плода (*Lee et al., 2001*), а нокаут в сердечной ткани вызывал тяжелую кардиомиопатию (*Kim et al., 2010*).

На данный момент CTR1 - единственный описанный высоко аффинный и селективный транспортер меди в клетку человека, ответственный за большинство импортируемой в них меди (*Lee, Petris, et al., 2002*). Он осуществляет энергонезависимый перенос ионов Cu(I) через клеточную мембрану с $K_m \sim 3.5$ мкМ (*Eisses & Kaplan, 2002*). Доказательствами работы транспортера с Cu(I) в первую очередь послужили стимуляция транспорта восстановителем аскорбатом, а также сравнимая с Cu(I) эффективность импорта Ag(I), но не двухвалентных ионов таких как Zn(II), Cd(II), Fe(II), Mn(II) (*Bertinato et al., 2010*). Высокие количества (50-кратный избыток) первых трёх металлов вызывали только небольшое снижение скорости переноса (*Lee, Peña, et al., 2002*). Считается, что CTR1 представлен в цитоплазматической мембране гомотримером (рисунок 1.2). Три SE, каждая из которых имеет 190 а.о., образуют в клеточной мембране купрофильную пору конической формы, расширяющуюся к цитоплазме (8-22 Å). Интересно, что, несмотря на каналоподобную организацию, скорость транспорта составляет всего около 10 ионов Cu в секунду одним тримером, тогда как у обычных канальных переносчиков она близка к скорости свободной диффузии (*Maryon, E. et al., 2013; Lutsenko, 2016*). Возможно, низкую процессивность и малую представленность

CTR1 (одна клетка Caco2 или HEK293 содержит менее 1000 тримеров) можно рассматривать как элементы глобальной клеточной стратегии по предотвращению медь-ассоциированной интоксикации путём ограничения её импорта (*Maryon, E. et al., 2013*).

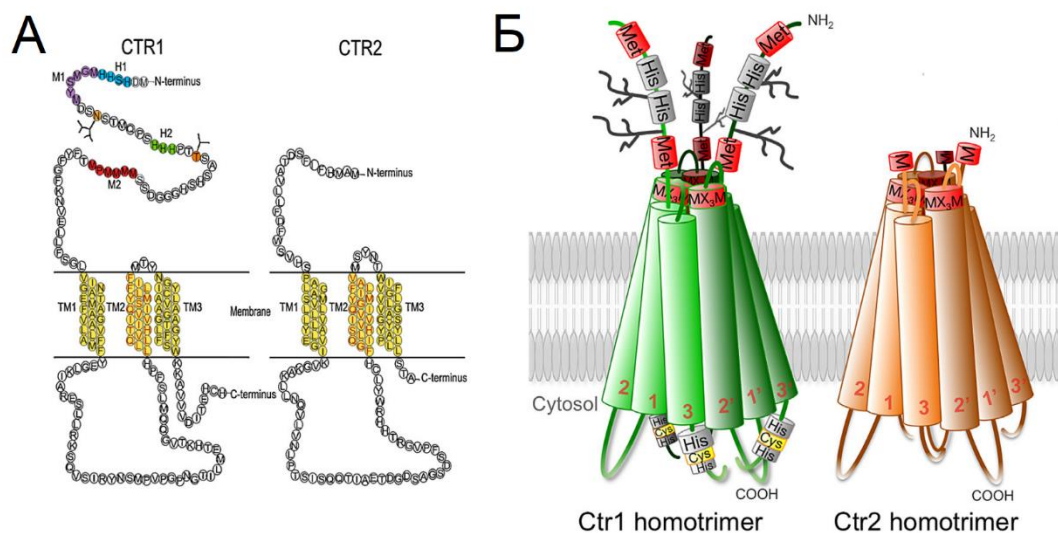


Рисунок 1.2. Структура CE CTR1 и CTR2 (А из (*Wee et al., 2013*)); тримеры CTR1 и CTR2 в мембране клетки (Б из (*Öhrvik & Thiele, 2015*))

Структуру CTR1 с незначительными изменениями последовательности определили методом рентгеновской кристаллографии, а потом уточнили с помощью построения полноатомной модели. В согласии с биохимическими данными в белке можно выделить несколько доменов: N-концевой эктодомен (NdCTR1), три трансмембранных и цитоплазматический C-концевой домены (*Lee, Peña, et al., 2002; De Feo et al., 2009; Tsigelny et al., 2012*). NdCTR1, по крайней мере в апо-состоянии, не имеет устойчивой структуры. Согласно расчетам NdCTR1 в составе гомотримера может быть стабилизирован гидрофобными взаимодействиями между отдельными цепями (*Tsigelny et al., 2012*). Предполагают определенную роль в этом процессе и у двух гликозилирующих модификаций: первая группа связана с остатком Asn15, а вторая Thr27. Гликозилирование остатка Thr защищает белок от внутриклеточного протеолиза (*Maryon et al., 2007*). NdCTR1 содержит три металлсвязывающих мотива, расположенных от N-конца в следующей последовательности: His/Met-богатый (MDHSHNMGM), His-богатый

(ННН) и Met-богатый (ММММРМ). Предположительная функция эктодомена заключается в захвате ионов Cu от внеклеточных доноров и переправке к мембране. Принципиальная способность связывать ионы Cu и Ag(I) была показана как для пептидов, входящих в состав NdCTR1, так и для всего домена (*Du et al., 2013; Pushie et al., 2015*). По мере продвижения к устью канала сайты связывания металла NdCTR1 меняют свою предпочтительность с Cu(II) на Cu(I), общая аффинность к Cu(I) оказалась порядка 10^{-15} М (*Du et al., 2013*). Наличие полноразмерного NdCTR1 не эссенциально для работы белка, но его постепенное укорачивание приводит к планомерному снижению скорости транспорта. Наибольшее значение для функционирования имеют Met43 и Met45 (*Eisses & Kaplan, 2005*).

Склонность к связыванию ионов Cu(I), проявляющаяся в наличии мягких лигандов, прослеживается и других частях белка. Остатки Met150 и Met154, находящиеся во втором трансмембранном домене, образуют два идущих друг за другом кольца в мембранном канале. Предполагается, что эти остатки последовательно координируют ион Cu, передавая его друг другу, так как при замене Met на другие аминокислоты, за исключением Cys и His, функция транспортёра оказывается существенно нарушена (*Eisses & Kaplan, 2005; Tsigelny et al., 2012*). Короткий С-концевой домен CTR1 состоит из 15 а.о. и заканчивается общей для всех млекопитающих последовательностью НСН. Ранее предполагалось, что она имеет наибольшую аффинность к иону Cu, тем самым определяя направление его движения через пору (*Fukai et al., 2018*). Как оказалось, замена этого мотива, его делеция или даже удаление всего С-конца наоборот увеличивают скорость транспорта, поэтому сейчас цитоплазматическому домену CTR1 приписывают регуляторную роль.

Известно два основных механизма регуляции поступления Cu через CTR1: быстрый и медленный. Механизм быстрого реагирования заключается в изменении локализации транспортера. В ответ на повышение концентрации Cu CTR1 в течение короткого времени интернализуется, по клатрин- и динамин-зависимому механизму, при таком же быстром снижении концентрации металла до базовых

значений он возвращается обратно на мембрану за 20-30 минут (Molloy & Kaplan, 2009; Clifford et al., 2016). Имеющиеся данные позволяют приписывать С-концевому домену CTR1 роль Cu-сенсора, который же и взаимодействует с клеточной машинерией для клеточного захвата (Maryon, E. et al., 2013; Kaplan & Maryon, 2016). Относительно деградации, следующей за переходом CTR1 в везикулы, вопрос остаётся открытым (Petris et al., 2003; Molloy & Kaplan, 2009). Механизм, оказывающий воздействие в долгосрочной перспективе, основан на модулировании ионами Cu активности Sp1, который в норме стимулирует экспрессию CTR1. Повышенные концентрации Cu, вытесняя Zn из ZF Sp1, делают невозможным его связывание с промотором *CTR1*, снижая его экспрессию (Yan et al., 2016; Yuan et al., 2017)

Вопрос о непосредственном внутриклеточном акцепторе ионов Cu, переносимых CTR1, тоже остаётся открыт. Изначально существовавшая модель предполагала передачу металла при прямом контакте шаперонов, в первую очередь CCS и ATOX1, с мотивом HCN, координирующим Cu, на С-конце CTR1 (Öhrvik & Thiele, 2014). Тем не менее, нокдаун ATOX1 или CCS не имел последствий для переноса меди в клетку (Maryon, E. B. et al., 2013). Сейчас закрепились две концепции, предусматривающая главенствующую роль GSH в первичном принятии Cu от CTR1. Серия *in vitro* и *in vivo* экспериментов показала, что высокая концентрация трипептида (мМ) обеспечивает преимущественное первичное связывание ионов Cu с ним, несмотря на более низкую аффинность GSH к Cu по сравнению с шаперонами, концентрация которых в клетке на несколько порядков ниже (мкМ). В соответствии с этим снижение внутриклеточного количества GSH приводило к замедлению переноса меди посредством CTR1, а восстановление уровня возвращало его в норму (Banci et al., 2010; Maryon, E. B. et al., 2013). Тем не менее, обе концепции могут дополнять друг друга, что особенно актуально в свете приведенных выше данных о модуляции Cu-связывающей функции ATOX1 GSH (Hatori et al., 2012), а также появившейся информации о формировании *in vitro* тройного комплекса С-концевым доменом CTR1, координирующего ион Cu, CCS

и апо-SOD. Комплекс оказался на удивление прочным и распадался только после активации SOD1 (*Skopp et al., 2019*).

Авторы, обнаружившие CTR1, в той же работе описали другой сходный с ним транспортер - **CTR2** (рисунок 1.2). Белки имеют высокую степень идентичности, но у CTR2 отсутствует эктодомен, содержащий металлсвязывающие мотивы, а также большая часть С-концевого домена, в том числе мотив HCH (*Zhou & Gitschier, 1997*). Эти факты совместно с тримеризацией CTR2 и наблюдениями за клетками с его нокаутом привели к тому, что его изначально рассматривали как низко аффинный переносчик Cu в клетку, хотя результаты экспериментов говорили о преимущественной эндосомальной локализации (*Bertinato et al., 2008*). Затем у CTR2 нашли роль в экспорте меди из эндосом в цитоплазму и макропиноцитозе (*Van Den Berghe et al., 2007; Blair et al., 2011*). Дальнейшие исследования показали, что CTR2 действительно участвует в клеточном импорте Cu, но не напрямую, а через модуляцию активности CTR1, а сами белки тесно взаимодействуют между собой. Так, CTR1 и CTR2 могут образовывать мультимеры, а экспрессия CTR1 предотвращает протеолитическую деградацию второго (*Tsai et al., 2015*). Интересным свойством CTR2 оказалась способность повышать уровень особой формы CTR1, у которой отсутствует N-концевой домен, а значит и замедлен импорт Cu. Эксперименты показали, что такой укороченный CTR1 участвует в мобилизации Cu из эндосомального компартмента, то есть играет роль, которую приписывают CTR2 (*Öhrvik et al., 2013*).

Общепринятая концепция, в которой CTR1 рассматривается как главный переносчик Cu в клетку, не согласуется с рядом экспериментальных наблюдений. В большинстве клеток CTR1 локализован на мембране, обращенной к кровотоку (*Lee, Peña, et al., 2002*). Энтероциты, которые служат входными воротами для Cu, поступающей в организм, захватывают питательные вещества, перенося их через апикальную мембрану, активно экспрессируют CTR1. Его нахождение в них стало предметом споров из-за разнородности поступающих данных. В одних работах

детектировали апикальную и внутриклеточную локализацию транспортера (*Nose et al., 2006, 2010*), тогда как в других преимущественно базолатеральную (*Zimnicka et al., 2007; Pierson et al., 2019*). Наряду с этим нокаут CTR1 в клетках тонкого кишечника, провоцируя дефицит меди в периферических тканях животных, приводил к гипераккумуляции в самом тонком кишечнике, при чём медь накапливалась там в бионедоступной форме (*Nose et al., 2006*). Нокаут CTR1 в печени вызывал сокращение концентрации меди в ней не более чем в 2 раза и симптомы сравнительно лёгкого дефицита Cu (*Kim et al., 2009*). Всё это говорит о существовании дополнительных и/или компенсаторных механизмов поступления Cu в клетку, которые изучены хуже по сравнению с её поступлением через CTR1.

На роль переносчика меди претендует и **DMT1**. DMT1 в первую очередь известен своей ролью в метаболизме железа, где он симпортирует ионы Fe(II) совместно с протоном через апикальную мембрану энтероцитов и выкачивает их из эндосомальных везикул после захвата трансферрина (*Skjørringe et al., 2015*). Тем не менее для DMT1 была показана широкая специфичность к другим двухвалентным катионам, в том числе Cu(II), и даже одновалентному Cu(I) (*Gunshin et al., 1997; Arredondo et al., 2003*). DMT1 мыши состоит из примерно 550 а.о., имеет 12 трансмембранных доменов, два участка N-гликозилирования, N- и C-концы находятся в цитоплазме, в последовательности не обнаружено мотивов, характерных для медьсвязывающих белков, таких как MHCXXC или HCN, описано 4 изоформы белка с тканеспецифичной экспрессией и различными механизмами регуляции, но одинаковой функциональностью (*Skjørringe et al., 2015*). Судя по всему, DMT1 не необходим в процессе внутриутробного развития, но чрезвычайно важен сразу после него, так как ни одна мышь с полным нокаутом DMT1 не дожила до конца первой недели после рождения, хотя при рождении все не демонстрировали патологий (*Gunshin et al., 2005*). Несколько экспериментов на клеточных линиях подтверждают вовлечение DMT1 в импорт меди. Так, его частичный нокаут в эпителиальных клетках кишечника *Caco2* (*Arredondo et al., 2003*) приводил к уменьшению поступления Cu, тогда как оверэкспрессия в HEK293 наоборот увеличивала внутриклеточную концентрацию меди (*Arredondo et al., 2014*). Клетки

HUVES компенсировали снижение представленности CTR1 на мембране увеличением количества DMT1, а siRNA-опосредованный нокаут обоих переносчиков делал клетки невосприимчивыми к изменениям уровня внеклеточной меди (*Lin et al., 2015*). Активность DMT1 удалось связать с поступлением Cu у животных с индуцированным дефицитом Fe, так, в одной работе они аккумулировали большие количества меди (*Jiang et al., 2013*), а в другой показали снижение статуса Cu в случае нарушений работы DMT1 (*Wang, X. et al., 2018*). В то же время другая работа, однозначно показывая необходимость DMT1 в кишечнике (один из главных органов с непонятной ролью CTR1) для поступления Fe, сообщает о ненарушенном всасывании Cu при его нокауте (*Shawki et al., 2015*), а чуть более ранняя статья того же коллектива говорит об отсутствии транспорта через DMT1 как Cu(I), так и Cu(II) по результатам прямых наблюдений (*Illing et al., 2012*). В ещё одной публикации сообщают о повышении концентрации меди во многих отделах головного мозга в связи с мутацией в DMT1, ассоциированной с увеличенной экспрессией CTR1 и ATP7A в гиппокампе (*Han et al., 2016*). Многие эти факты, кажется, поднимают больше вопросов, чем дают ответов, относительно роли, которую DMT1 играет в метаболизме меди. В постоянно меняющейся концепции на данный момент этот транспортер рассматривают как компенсаторно-комплементирующий по отношению к CTR1 (*Lutsenko, 2016*).

К неожиданным выводам привели наблюдения за всасыванием меди монослоем клеток Caco2 при отсутствии белков и пептидов в среде инкубации, что близко к условиям в тонком кишечнике. Поток ионов Cu через апикальную мембрану в такой среде выросал в несколько раз и оказывался Cl-зависимым. Добавление обоих стереоизомеров His, как и ингибитора анионных каналов DIDS, приводило к заметному снижению транспорта (*Zimnicka et al., 2011*). Результаты описанной работы хорошо согласуются с довольно давними исследованиями транспорта меди в эритроциты. Её перенос в них тоже был Cl- или бикарбонат-зависимым, ингибировался DIDS и His, а в качестве переносчика тогда рассматривали AE1 (*Alda & Garay, 1990*). Приведенные данные позволяют

предположить значимую роль **анионных транспортеров** в низко аффинном импорте Cu, в ходе которого она переносится как $[\text{CuCl}_n]^{2-n}$.

К возможным низко аффинным транспортёрам меди относят и **переносчики Zn**. Так, в ходе большого скрининга siRNA на клетках HeLa обнаружили, что нокаут импортера цинка Zip5 приводит к снижению внутриклеточной концентрации не только Zn, но и меди (*Malinowski et al., 2014*). Ранее была показана способность ионов Cu ингибировать транспорт Zn через Zip5 (*Wang et al., 2004*), то же наблюдалось и для Zn в отношении меди и CTR1 (*Lee, Peña, et al., 2002*), более того сайт связывания Zn обнаружили в канале недавно кристаллизованного химерного CTR1 (*Ren et al., 2019*). Всё это говорит о возможном интересном переплетении метаболизма этих двух микроэлементов.

Принимая во внимание все упомянутые факты, становится очевидно, что понимание процессов клеточного импорта меди нельзя назвать полным. Роль и относительный вклад DMT1, предполагаемого анионного транспортера в клеточный импорт Cu не ясны, то же можно сказать даже про наиболее подробно описанный CTR1. Например, известно о большей стабильности Cu(II) в биологической среде, тогда как CTR1 переносит Cu(I), но пока не понятно, на каком этапе происходит восстановление иона. Предполагается участие в этом процессе примембранных протеаз семейства STEAP (*Ohgami et al., 2006; Ramos et al., 2016*). В соответствии с этим было показано, что оверэкспрессия STEAP4 стимулирует аккумуляцию меди в клеточной линии рака прямой кишки (*Liao et al., 2020*). В то же время существуют свидетельства о способности NdCTR1 самостоятельно осуществлять этот процесс в присутствии аскорбата (*Haas et al., 2011; Schwab et al., 2016*). Есть данные, что CTR1 способен импортировать в клетку противоопухолевые препараты платины, главным образом цисплатин, так как повышенная экспрессия его гена и представленность в мембране увеличивали количество накопленной клетками платины (*Holzer & Howell, 2006; Ivy & Kaplan, 2013; Jiang et al., 2016*). Все переносимые CTR1 вещества должны взаимодействовать с NdCTR1, направляющим транспорта, тогда как процесс этого

взаимодействия изучен в основном на уровне пептидов, входящих в его состав и только одна работа рассматривает полноразмерный участок белка (*Haas et al., 2011; Du et al., 2013; Pushie et al., 2015; Stefaniak et al., 2018*).

Как обсуждалось выше, всю медь клетки можно условно разделить на три пула: каталитическая или стабильная, сигнальная или динамическая и токсичная. Второй из них в последнее время привлекает всё большее внимание. CTR1 импортирует Cu(I), который предпочтителен для клеточных шаперонов, а DMT1, видимо, Cu(II), в том числе потому, что ионы Ag(I) не ингибируют перенос других металлов (*Arredondo et al., 2014*). У DMT1 отсутствуют цитозольные мотивы, которые выступают в качестве предполагаемых доноров для шаперонов у CTR1 (*Skjørringe et al., 2015*). Эти факты позволяют предположить, что такие разные по свойствам ионы Cu, импортируемые CTR1 и DMT1, участвуют в различных клеточных процессах. Экспериментальная проверка этого предположения - важная фундаментальная задача, имеющая большое значение для рассматриваемой области знаний.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Биологические объекты

В работе использовали следующие биологические объекты:

- штамм *E. coli* DH5 α (генотип *E. coli* F⁻ *deoR endAI gyrA96 hsdR17 Δ (lac)U169 recAI relA1 supE44 thi-I (ϕ 80 lacZ Δ M15)*) (Casali, 2003)
- штамм *E. coli* BL21 (DE3) (генотип *E. coli* str. B F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)*). Наличие λ лизогена, несущего ген РНК-полимеразы фага Т7, обеспечивает возможность использования промоторов бактериофага Т7 в генетических конструкциях (Casali, 2003).
- культивируемые клетки человека линии H1299, первоначально полученные из образца немелкоклеточной карциномы лёгких. Вследствие частичной гомозиготной делеции гена *TP53* в них отсутствует его белковый продукт p53, что вместе с другими факторами опосредует их способность к неограниченному делению (Lin & Chang, 1996). В работе также получены и использованы производные клетки от этой клеточной линии. В дочерних линиях с помощью технологии CRISPR/cas9 нокаутированы (KO) гены транспортеров CTR1 (CTR1 KO), DMT1 (DMT1 KO) или оба этих гена (DKO). Клетки получены в Институте фармакологии Марио Негри (Милан, Италия), методика описана ниже.

2.2. Материалы и оборудование

Во всех экспериментах использовали реактивы необходимой химической и биологической чистоты. Работа выполнена на приборной базе, включающей в себя современное и работоспособное оборудование, соответствующее поставленным задачам. Производитель реактивов и приборов указан в месте первого упоминания каждого из них.

2.3. Экспериментальные процедуры

Выделение тотальной РНК. Из клеток HepG2 тотальную РНК выделяли, применяя реагент TRIzol в соответствии с инструкцией производителя, а из клеток H1299 экстрагировали набором «Maxwell RSC simply RNA cells kit» (Promega, США). Целостность препаратов проверяли методом электрофореза в 1% агарозном геле. Чистоту (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}) и концентрацию РНК (A_{260}) определяли спектрофотометрически с помощью прибора NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США). Выделенный материал не имел признаков деградации РНК, контаминации ДНК и белками.

Обратная транскрипция. кДНК получали с помощью набора «High capacity cDNA reverse transcription kit» (Life Technologies, США) методом обратной транскрипции (ОТ) со случайными праймерами, в каждой реакции использовали 1 мкг тотальной РНК. На первом этапе праймеры отжигали на матрице при температуре 27 °С в течение 25 минут, далее следовал этап синтеза длительностью 2 часа при температуре 37 °С, затем инактивация (85 °С) в течение 5 минут.

ПЦР в реальном времени. Для оценки уровня экспрессии ряда генов, связанных с метаболизмом меди, применяли методику ПЦР в реальном времени (qPCR). 1 мкг тотальной кДНК, полученной в ходе ОТ, смешивали с раствором «Sybr Green PCR master mix» (Applied Biosystem, США), содержащий всё необходимое для проведения реакции. В смесь добавляли праймеры, подобранные с помощью программы Primer-BLAST v. 4.1.0 (NCBI, США), последовательности приведены в таблице 2.1. qPCR проводили на приборе «7900HT sequence detection system» (Applied Biosystem, США). Для каждой отдельной реакции анализировали кривую диссоциации, чтобы убедиться в специфичности праймеров. Экспрессию изучаемых генов нормализовали на экспрессию гена домашнего хозяйства, в качестве которого выбрали актин. Полученные в КО клетках значения приведены относительно материнской линии H1299, представлены средние величины как минимум трёх независимых экспериментов, в каждом из которых было как минимум три независимых реплики для каждой точки.

Таблица 2.1 Список праймеров, использованных при проведении ПЦР в реальном времени

Название	T _m , °C	Последовательность
CTR1_F	63.7	ggaggagacagcagcatgat
CTR1_R	62.8	tccagccatttctccagctg
DMT1_F	64.2	gtcctcatgctggcctcttt
DMT1_R	63.6	ccccactgccccaaatgtaga
CTR2_F	63.8	gcggtgcttctgtttgattct
CTR2_R	63.2	tgccaaccttgatgcctca
SOD1_F	64	ccagtgcaggtcctcacttt
SOD1_R	62.2	gccacaccatctttgtcagc
CCS_F	64.2	cggtactcaagggcatggg
CCS_R	64.6	tcaggggtcagctgtaggaa
HIF1 α _F	63.9	gctttaactttgctggcccc
HIF1 α _R	62.6	tcctcaagttgctggatca
XIAP_F	63.7	actcagttaacaaggagcagct
XIAP_R	64.6	tagccctcctccacagtga
NF-kB_F	64.5	ctgctggacccaaggacatg
NF-kB_R	64.2	gccccttatacacgcctctg
COMMD1_F	64.7	ggcgctgtgggtgaagag
COMMD1_R	62	ccagctggtgaaatccatgctc

Синтез последовательности, кодирующей NdCTR1. кДНК клеток HepG2 использовали для получения последовательности, кодирующей NdCTR1. Соответствующий участок гена *SLC31A1* человека длиной 198 п.н. (соответствует первым 66 а.о.) амплифицировали методом ПЦР, используя пару праймеров HepG2_NdCTR1_F и HepG2_NdCTR1_R (таблица 2.2).

Полимеразная цепная реакция. Для амплификации коротких фрагментов с матрицы плазмидной ДНК, кДНК или мтДНК проводили ПЦР в объёме 20 мкл.

Реакционная смесь содержала 1 нг матрицы, 200 мкМ каждого из нуклеотидов, полимеразный буфер с 2 мМ Mg^{2+} , 0.5 единиц Taq-полимеразы (ThermoFisher, США) и 0.5 мкМоль каждого из праймеров. В зависимости от использованного амплификатора (ДНК-Технология (Россия) или Bio-Rad (США)) пробу могли покрыть минеральным маслом для предотвращения её испарения. Праймеры подбирали с помощью программы PerlPrimer v1.1.21 и ресурса OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). Типовая программа амплификации включала первичную денатурацию при 94 °С в течение 5 минут, затем 35 циклов - 30 секунд денатурации при 94 °С, 30 секунд отжиг при подобранной для каждой пары праймеров (таблица 2.2) температуре, 90 секунд синтез ДНК при 72 °С, после окончания всех циклов 5 минут при 72 °С для завершения реакции.

Таблица 2.2 Список праймеров и олигонуклеотидов, использованных в работе при проведении стандартной ПЦР или синтеза последовательности, кодирующей В1 домен иммуноглобулин-связывающего белка G стрептококка (GB1).

Название	T_m , °С	Последовательность
HepG2_NdCTR1_F	72.3	cagggatccgatcattcccaccatatggggatg
HepG2_NdCTR1_R	70.1	cagctcgagtccagctgtattgatcacca
NdCTR1-55_GB1_F	67.6	atcggatccatggatcattcccacc
NdCTR1-55_GB1_R	65.3	gtcctcgagattattccacattcttaaacg
GB1_bbF1	77.3	gtcacatatgacctataaaactgatcctgaacggtaaaaccctgaaaggtgaaaccaccaccgaagctg
GB1_bbF2	79.2	ttcaaacagtatgcaaacgacaacgggtgtgacggatgaatggacctatgacgacgcgaccaaaccctt
GB1_bbR1	80.3	ccgtgtcgtttgcatactgtttgaaaacttttcggcggtggcggcgctcaacagcttcgggtggtggtttcac
GB1_bbR2	81.3	tgcaggatccacgcggaaccagactacccccaccttcggtaacgtg

		aaggtttggtcgctgtca
MT_Dloop_F	58.1	aatgaatgtctgcacagc
MT_Dloop_R	58.1	gctaggaccaaacctatttg

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Анализ получившихся в результате ПЦР фрагментов или выделенных нуклеиновых кислот проводили методом электрофоретического разделения в агарозном геле под действием напряжения 150 В. Плотность геля зависела от конкретного эксперимента, для его заливки и в ходе процесса разделения использовали буферную систему TBE. Гель окрашивали бромистым этидием.

Конструирование плазмиды pNdCTR1. Плазмиду pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Великобритания) и полученную ранее кДНК NdCTR1 обработали рестриктазами BamHI и XhoI (ThermoScientific, США) в буфере FastDigest согласно протоколу производителя. После проведенного электрофоретического разделения линейризованную плазмидную ДНК экстрагировали из агарозного геля с помощью набора «GeneJET Gel Extraction Kit» (ThermoScientific, США), который для этой цели использовали и в дальнейшем. Рестрицированную кДНК NdCTR1 очистили путём преципитации этанолом. Рестрицированные плазмиду и кДНК NdCTR1 лигировали лигазой фага T4 в течение ночи при комнатной температуре. Полученную лигазную смесь деактивировали при 67 °С и затем трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Правильность вставки в выросших на чашках трансформантах устанавливали, секвенируя по Сэнгеру соответствующие фрагменты ДНК, амплифицированные методом ПЦР.

Синтез последовательности, кодирующей GB1, из олигонуклеотидов методом ПЦР. Чтобы синтезировать последовательность, кодирующую GB1 (Bao *et al.*, 2006), использовали перекрывающиеся олигонуклеотиды и методику ПЦР (Xiong *et al.*, 2004). Аминокислотную последовательность GB1 (Uniprot P06654, остатки 228-282) перевели в оптимизированную нуклеотидную для экспрессии в *E. coli* (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) и определили оптимальную первичную

структуру перекрывающихся олигонуклеотидов (<http://54.235.254.95/cgi-bin/gd/gdOlapDes.cgi>). Олигонуклеотиды (таблица 2.2, Синтол, Россия) GB1_bbF1, GB1_bbF2, GB1_bbR1, GB1_bbR2 добавили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей по 200 мкМ четырех дезоксирибонуклеотидов, 0.5 единиц Pfu-полимеразы (ThermoFisher, США) и буфер для неё. Фланкирующие синтезируемую последовательность GB1_bbF1 и GB1_bbR2 взяли в 10-кратном избытке (по 1 мкМ) по отношению к внутренним GB1_bbF2 и GB1_bbR1 (по 0.1 мкМ). Реакцию проводили по следующей схеме: 2 минуты 94 °С, потом 40 циклов: 30 секунд 94 °С, 30 секунд 60 °С, 30 секунд 72 °С, после окончания циклов процедуру завершали финальной элонгацией при 72 °С в течение 2 минут. Получившуюся смесь электрофоретически разделили в 1.2% агарозном геле и синтезированную последовательность длиной 209 п.н., кодирующую GB1, выделили с помощью набора реактивов.

Конструирование плазмид pGB1 и pGB1-NdCTR1. Кодированную GB1 последовательность и плазмиду pET22b обработали рестриктазами NdeI и BamHI (ThermoScientific, США). Линеаризованную плазмиду выделили из агарозного геля, а вставку очистили преципитацией в этаноле, после этого их лигировали, как описано ранее и лигазной смесью трансформировали *E. coli* DH5α. Сконструированную плазмиду назвали pGB1.

Нуклеотидную последовательность, соответствующую NdCTR1, амплифицировали методом PCR с плазмиды pNdCTR1, используя праймеры NdCTR1-55_GB1_F и NdCTR1-55_GB1_R (таблица 2.2). Амплифицированный фрагмент очистили преципитацией в этаноле, наравне с pGB1 их обработали рестриктазами BamHI и XhoI, очистили и лигировали в течение ночи. Полученную плазмиду назвали pGB1-NdCTR1.

Очистка плазмидной ДНК и преципитация этанолом. Очистку плазмидной ДНК осуществляли модифицированным щелочным методом (Birnboim, 1983). *E. coli* DH5α, трансформированные необходимой плазмидной конструкцией, после полутора суток роста в жидкой LB среде осаждали

центрифугированием и ресуспендировали осадок в холодном буфере РЕВ1 (50 мМ глюкоза, 25 мМ Tris-HCl pH 8.0, 10 мМ EDTA, 1 мг/мл лизоцим, 50 мкг/мл РНКаза А), инкубировали во льду на протяжении 30 минут. Затем в пробирку добавляли один объём РЕВ2 (0.2М NaOH, 1% SDS), перемешивали и инкубировали 5 минут. К получившемуся лизату добавляли два объёма насыщенного раствора ацетата аммония и два объёма хлороформа. Получившуюся смесь центрифугировали 15 минут при 6000g. Из супернатанта плазмидную ДНК очищали преципитацией 70% водным раствором этанола, охлажденным до -20 °С, в течение 30 минут. Затем центрифугировали 15 минут при 6000g, отбирали супернатант и промывали осадок 70% водным раствором этанола. Затем преципитат снова подвергался уже описанной процедуре для достижения большей степени очистки. Получившийся после этого осадок высушивали и растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Tris-HCl pH 8.0, 1 мМ EDTA).

Приготовление компетентных клеток и трансформация. Компетентные клетки *E. coli* получали кальциевым методом (*Bergmans et al., 1981*). Бактериальную культуру в логарифмической фазе роста (OD_{600} 0.6-0.9) осаждали центрифугированием и ресуспендировали в холодном 50 мМ растворе CaCl₂, инкубировали во льду 15 минут. Затем клетки осаждали и ресуспендировали в 1/10 начального объёма холодного хлорида кальция и инкубировали во льду не менее 12 часов. Эти клетки использовали для трансформации в соответствии с процедурой, описанной ниже. К компетентным бактериям добавляли раствор ДНК для трансформации (не более 10% от объёма суспензии) и проводили сорбцию на льду в течение 30 минут, затем подвергали тепловому шоку, помещая суспензию на 3 минуты в водяную баню с температурой 42 °С, а затем снова в лёд на 3 минуты. После финальной инкубации во льду для повышения эффективности трансформации к клеткам добавляли 3 объёма среды LB и инкубировали в течение 1.5 часов при 37 °С. Затем *E. coli* высевали на селективную среду и помещали на ночь в термостат, поддерживающий температуру 37 °С.

Культивирование *E. coli*. Бактерии *E. coli* вне зависимости от штамма культивировали на поверхности агаризованной среды (LB или среда на основе гидролизата бычьей сыворотки (Самсон-Мед, Россия)) в чашках Петри (*Bertani, 1951*). После переноса на чашку бактерии росли в термостате при 37 °С в течение ночи, после этого чашки хранили в холодильнике при 4 °С. Пересев осуществляли раз в несколько недель.

Для наращивания бактериальной массы с целью последующего выделения плазмидной ДНК или белка использовали жидкую среду LB или 2xYT, соответственно (*Kram & Finkel, 2015*). Бактерии росли при постоянном покачивании со скоростью 150 об/мин и температуре 37 °С. При культивировании трансформированных плазмидами штаммов в среду добавляли селективный маркер ампициллин (Красфарма, Россия), финальная концентрация составляла 100 мкг/мл.

Для индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок, к бактериальной суспензии в логарифмической фазе роста (OD_{600} 0.6-0.9 для 2xYT) добавляли IPTG (негидролизуемый аналог аллолактозы - индуктор *lac*-оперона, изопропил- β -D-галактопиранозид) до финальной концентрации 0.3 мМ. Пред этим суспензии давали остыть до 24 °С, при этой же температуре и постоянной покачивании её оставляли на ночь для синтеза белка.

Лизирование *E. coli* и выделение растворимой белковой фракции. Бактерии осаждали центрифугированием при 4000g и ресуспендировали в холодном буфере для металл-аффинной хроматографии (IMAC) или буфере для лизирования (20 мМ Tris-HCl pH 7.4, 150 мМ NaCl), добавляли смесь ингибиторов протеаз (Sigma, США) и выдерживали 10 минут во льду. Бактерии лизировали обработкой ультразвуком 44 ГГц (НПП Академприбор, Россия) короткими сериями по 10 секунд, 1 минуту охлаждая во льду между повторами. Лизат центрифугировали 30 минут при 18000g при температуре 4 °С. Супернатант использовали для дальнейшего выделения белка и электрофоретического анализа.

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Белки разделяли в полиакриламидном геле (ПААГ) по протоколу Лэммли (*Laemmli, 1970*) или в трис-трициновой системе (*Schägger, 2006*) в зависимости от молекулярной массы белков интереса, используя широкий диапазон показателей сшивки концентрирующего и разделяющего гелей. Грубые белковые экстракты, клеточные лизаты (в случае клеточных линий человека для лизирования применяли раствор RIPA (ThermoFisher, США), хроматографические фракции, среду культивирования, или растворы очищенных белков смешивали с загрузочным буфером, содержащим SDS и β -меркаптоэтанол, в соотношении 1:1 и инкубировали при 95 °C в течение 10 минут, после чего наносили в лунки, образованные в ПААГ. На этапе концентрирования образца поддерживали постоянное напряжение, равное 70 В. После входа большей части белков в разделяющий гель напряжение повышали до 140 В. Движение белков визуально контролировали по положению полос предокрашенного белкового маркера Precision Plus Protein Dual Xtra Standarts (Bio-Rad, США). Процесс завершали по достижению лидирующим красителем (бромфеноловый синий или Кумасси G-250) конца геля. Белки фиксировали в геле смесью этилового спирта и уксусной кислоты, после чего окрашивали 0.05% раствором Кумасси G-250. Неспецифическое окрашивание фона отмывали фиксирующим раствором. Для определения энзиматической активности ЦП, секретированного клетками, среду культивирования электрофоретически разделяли в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях, после чего гели окрашивали *o*-дианизидином (*Babich et al., 2013*).

Металл-аффинная хроматография. В качестве неподвижной среды для проведения ИМАС использовали ИМАС Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, США), заряженную ионами Cu^{2+} или Ni^{2+} . Колонку готовили к работе, следуя инструкции производителя. Работали с колонкой 10 мм в диаметре, поддерживая скорость тока 1 мл/мин на всех этапах. Подвижной фазой служил буфер на основе HEPES (10 мМ HEPES pH 8.3, 500 мМ NaCl). К образцу добавляли имидазол (Iz) до финальной концентрации 35 мМ, наносили его на колонку и промывали указанным выше буферным раствором. Слабосвязанные белки смывали тем же

буферным раствором, но с 50 мМ Iz, а раствор с 200 мМ Iz использовали для получения фракции, содержащей целевой белок. Элюцию белков регистрировали по показателю поглощения элюата на длине волны 280 нм, встроенной в хроматограф (Bio-Rad, США) проточной ячейкой.

Диализ. Замену буферного раствора проводили путём диализа, во всех экспериментах использовали мембрану из модифицированной целлюлозы Visking (Serva, Германия) с размером пор, пропускающим белки ниже 12000 Да. Процедура протекала с постоянным перемешиванием при комнатной температуре в течение 3 часов или в холодильнике на протяжении ночи. Буферный раствор добавляли с 10-кратным избытком и меняли не меньше двух раз.

Гель фильтрация. Гель фильтрацию осуществляли на носителе Sephacryl S200 (GE Healthcare, США) на колонке 1.6x40 см с постоянной скоростью потока 0.7 мл/мин. В качестве подвижной фазы выступал PBS или буферный раствор на основе HEPES (10 мМ HEPES pH 8.3, 150 мМ NaCl). Колонку предварительно калибровали с помощью голубого декстрана (свободный объём), ЦП человека (132 кДа), бычьего сывороточного альбумина (70 кДа) и цитохрома *c* лошади (12 кДа).

Измерение активности глутатион-S-трансферазы. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) в хроматографических фракциях определяли спектрофотометрическим методом. В PBS, содержащий 1 мМ EDTA, 1 мМ 2,4-динитрохлорбензола и 2.5 мМ GSH добавляли образец. Активность GST измеряли при комнатной температуре по изменению показателя OD₃₄₀ в течение 1 минуты протекания реакции.

Протеолитическое расщепление GB1-NdCTR1. Слитый белок GB1-NdCTR1 специфически гидролизovali фактором FIIa (тромбин), полученным в отделе молекулярной генетики Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия) Соколовым А.В. из плазмы крови человека. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение трёх часов в буферном растворе, приготовленном на HEPES (10 мМ HEPES pH 8.3, 150 мМ NaCl). Концентрация FIIa в гидролитической смеси составляла 1 ед. FIIa на 100 ед. GB1-NdCTR1.

Инкубация E. coli с Cu, Ag и AgNPs, оценка выживаемости бактерий.

Ночную культуру *E. coli* промывали, осаждали центрифугированием, затем разводили в 20 раз и добавляли раствор Cu, Ag или AgNPs. Среда, использованная для проведения эксперимента, зависела от металла: в случае Cu применяли 0.9% раствор NaCl в воде, в остальных случаях дистиллированную воду чтобы избежать образования плохо растворимого AgCl. Бактерии, в том числе и контрольного эксперимента без металлов, инкубировали при 37 °C на ротационном шейкере (Биосан, Латвия) и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты суспензии. Выживаемость бактерий определяли по числу колониеобразующих единиц (CFU). Для определения CFU полученные аликвоты последовательно разводили в 10 раз и высевали на чашки Петри с LB агаром. После инкубации в термостате в течение ночи, подсчитывали количество колоний, образовавшихся при максимальном разведении, умножая на коэффициент которого получали значение CFU. На графиках отображены значения десятичного логарифма рассчитанных значений.

Культивирование клеточных линий. Клетки линии H1299 культивировали в среде RPMI (ThermoFisher, Италия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). Клеточные линии содержали в инкубаторе, поддерживающем температуру 37 °C и 5% концентрацию CO₂. Для пересевания клеток, которое проводили по достижению ими 90% конфлюэнтности, их сначала промывали PBS, после трипсинизировали 0.25% раствором трипсина с 0.9 mM EDTA (ThermoFisher, США), смывали обычной средой культивирования и ресуспендировали в ней. Количество клеток подсчитывали с помощью проточного счетчика (Beckman Coulter, США), после чего необходимое число переносили в новый стерильный флакон.

Для приготовления среды культивирования, насыщенной ионами Ag, в RPMI добавляли AgCl и перемешивали на автоматической мешалке до тех пор, пока

растворение не прекращалось. После этого среду центрифугировали час при 10000g и супернатант использовали для культивирования клеточных линий.

Нокаут генов транспортеров *CTR1* и *DMT1*. Для получения клеток H1299 с нокаутированными генами *CTR1* и *DMT1* применили технологию CRISPR/cas9 (Adli, 2018). Клетки в состоянии 90% конфлюэнтности, находящиеся в 6-луночном планшете, трансфецировали тремя плазмидами, кодирующими белок cas9 и одну из трёх специфичных к *CTR1* или *DMT1* 20-нуклеотидных направляющих РНК (gRNA) к первому экзону соответствующего гена длиной 20 нуклеотидов. Наряду с этим клетки котрансфецировали специфичной для каждого гена плазмидой (Santa Cruz Biotechnology, США), опосредующей возможность гомологичной рекомбинации, в ходе которой в место двунитевого разрыва может встроиться ген устойчивости к пурамицину и красного флюоресцентного белка (RFP). Для трансфекции использовали реагент Fugene (Promega, США). Через сутки клетки смыли и пересадили по 500 штук в 10-сантиметровые чашки Петри. Через 48 часов для осуществления селекции в среду роста добавили пурамицин (2 мкг/мл). Выжившие клоны пересадили в отдельные лунки 96-луночных планшетов. Клонов, растущих в среде с пурамицином и экспрессирующих RFP, о чём судили по наличию красной флуоресценции, проверяли методом ПЦР. Для создания клеток с двойным нокаутом (DKO), встроенные в ген *CTR1* гены устойчивости к пурамицину и RFP, удаляли, используя Cre рекомбиназу. После удаления селективных маркеров повторяли процедуру, описанную выше для плазмид, специфичных к *DMT1*.

Определение скорости роста и выживаемости культивируемых клеток.

Скорость роста клеток определяли по люминесценции с помощью планшетного спектрофотометра «GloMax» (Promega, США) и набора «RealTime-Glo MT Cell Viability Assay» (Promega, США). Время удвоения рассчитывали, анализируя линейный участок кривой роста. Для каждой клеточной линии проведено минимум 6 независимых экспериментов, представлено среднее значение. Для оценки выживаемости клеток при добавлении различных агентов применяли MTS-тест

(O'Toole et al., 2003). Клетки высевали в 96-луночные планшеты и через 24 часа начинали обработку интересующими соединениями в течение последующих 72 часов. Концентрацию формазана, восстановленного клеточными редуктазами, пропорциональную метаболической активности клетки, которая косвенно свидетельствует о её состоянии, оценивали на длине волны 492 нм в названном выше планшетном спектрофотометре. Результаты выражены в процентах от показателей контрольных условий. Каждая временная точка представлена минимум шестью репликами, приведенное значение - среднее как минимум трёх независимых экспериментов.

Измерение концентрации металлов. Концентрацию металлов измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре ZEE nit 650P (Analytik Jena, Германия) с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией неселективного поглощения. Пробы перед измерением растворяли в высокочистой концентрированной азотной кислоте (Вектон, Россия), в случае жидких образцов доля кислоты составляла не менее 50% от конечного объёма. Для определения концентрации металлов в экспериментальных образцах предварительно строили калибровочные кривые, используя стандартные растворы соответствующего элемента (Экросхим, Россия).

Иммунопреципитация GST-NdCTR1. 600 мкл кроличьей антисыворотки (получена в отделе молекулярной генетики ИЭМ) ко второму медьсвязывающему домену NdCTR1 (17TMQPSHHNPTTSASH31) добавили к равному объёму бактериального лизата. Эту смесь инкубировали в течение ночи при 4 °C на ротационном шейкере. На следующее утро внесли 30 мкл IgG козла к иммуноглобулинам кролика и инкубировали при постоянном перемешивании на протяжении 4 часов при комнатной температуре. Преципитат осадили центрифугированием при 18000g в течение 30 мин. Результат представлен как отношение количества Ag в преципитате ко всему серебру, содержащемуся в лизате (100%).

Иммуноблоттинг. После электрофоретического разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом сухого переноса на аппарате Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США), прикладывая напряжение 25 В (ограничение 1 А) в течение 25 минут. Качество переноса белков контролировали окраской мембраны красителем Понсо С, который отмывали раствором PBST (PBS, 0.1% Tween-20). Все приведенные процедуры инкубации и отмывки проводились при постоянном покачивании. Свободные сайты связывания белка на мембране «забивали» 5% раствором обезжиренного молока в PBST (блокирующий буфер) на протяжении ночи при 4 °С. После мембрану помещали в раствор используемых первичных антител в блокирующем буфере (таблица 2.3) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Слабосвязанные антитела отмывали PBST по схеме: 15 минут, а затем 3 раза по 5 минут, после каждого этапа используя свежий раствор. Процедуру окраски и отмывки повторяли для вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Для визуализации иммунных комплексов применяли набор ECL (GE Healthcare, США).

Таблица 2.3 Используемые антитела

Целевой белок	Источник	Разведение
NdCTR1	Получены в Отделе молекулярной генетики ИЭМ	1:300
ЦП	Получены в Отделе молекулярной генетики ИЭМ	1:500
NdCTR1	Abcam ab129067, Великобритания	1:1000
SOD1	Abcam, ab16831, Великобритания	1:500
COX4	Abcam, ab16056, Великобритания	1:500

NF-kB	Cell Signaling Technology, 8242, США	1:500
HIF1	Abcam, ab216842, Великобритания	1:500
COMMD1	Santa Cruz Biotechnology, sc- 107497, США	1:500
Антитела козла на иммуноглобулины кролика	Abcam, ab6721, Великобритания	1:2000
Антитела козла на иммуноглобулины кролика	Santa Cruz Biotechnology, sc- 2020, США	1:2000

Выделение субклеточных фракций. Субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования. Все операции проводили при температуре 4 °С. Клетки гомогенизировали в буфере, содержащем сахарозу (250 мМ сахара, 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl pH 7.4, 5 мМ DTT, 0.5 мкл/мл коктейля ингибиторов протеаз), используя гомогенизатор T10 (IKA, Германия) на максимальной мощности 3 раза по 20 секунд. Гомогенат центрифугировали 10 минут при 800g. Из пост-ядерного супернатанта центрифугированием в течение 20 минут при 12000g осадил митохондрии, а из полученной на этом этапе надосадочной жидкости фракцию внутриклеточных мембран (ВКМ, в том числе АГ и эндоплазматический ретикулум) центрифугированием на протяжении часа при 23000g. Итоговый супернатант считали цитозольной фракцией. Осадок после первого этапа, содержащий главным образом ядра и фрагменты клеточной мембраны, фракционировали методом изопикнического центрифугирования в градиенте сахарозы (46%-42%-29%) при 4000g в течение 4 часов. После процедуры отобрали три фракции: ядерную, осевшую на дно пробирки, фракцию на границе 42%/46% и фракцию

на границе 29%/42%. В них концентрацию сахарозы довели до 250 мМ буфером гомогенизации и осадили органеллы при 12000g в течение 20 минут.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия. Суспензию *E. coli* после инкубации с ионами Ag наносили на углеродную пленку, поддерживаемую медной решеткой, и высушивали при комнатной температуре. Все исследования проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100F (Jeol, Япония) с ускоряющим напряжением 200 кВ и разрешением 0.19 нм со встроенным модулем для энерго-дисперсионным рентгеновской спектроскопии INCA (Oxford Instruments, Великобритания).

Времяпролётная масс-спектрометрия. После электрофоретического разделения белков и окрашивания, интересующие зоны вырезали из геля с помощью одноразовых носиков для дозаторов. Кумасси G-250 отмывали 40% раствором ацетонитрила в 30 мМ гидрокарбонате аммония. Затем гель дегидратировали 100% ацетонитрилом, высушивали и переносили в буферный раствор для протеолиза (50 мМ гидрокарбоната аммония pH 8.0), содержащий 0.02 мг/мл трипсина или химотрипсина, оставляли на ночь при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением буфера с трифторуксусной кислотой (0.5% трифторуксусная кислота, 10% ацетонитрил). После этого пробы инкубировали при - 80 °C в течение 15 минут, а затем наносили на мишень (Bruker Daltonics, Германия), покрывая равным объёмом матричного раствора HCCA или DHB (Bruker Daltonics, Германия). Эксперименты проводили на MALDI-TOF спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия). Для каждого образца записали не менее 5 спектров, каждый из которых был получен в результате сложения спектров, получившихся после 5000 лазерных импульсов. Белки идентифицировали, используя Mascot (<http://www.matrixscience.com>) и базу данных Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org>) с внесёнными в неё последовательностями GB1, NdCTR1 и GB1-NdCTR1.

Проточная цитометрия

Проточную цитометрию проводили на проточном цитометре BD Accuri C6 (Accuri Cytometers, США). Клетки *E. coli* один раз промывали холодным PBS, осаждали центрифугированием при 4000g в течение 3 минут и ресуспендировали в буферном растворе для связывания Аннексина V (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). В нём бактерии инкубировали с FITC-конъюгированным Аннексином V и пропидий йодидом (BD Pharmingen, США) в течение 15 минут при комнатной температуре без доступа света. После этого в пробу разбавляли в 5 раз буферным раствором для связывания Аннексина V и помещали в лёд, в течение 15 последующих минут её анализировали на проточном цитометре.

Изотермическая титрационная калориметрия

Связывание лигандов с исследуемым белком изучали методом изотермической титрационной калориметрии на приборе Nano ITC 2G (TA Instruments, США) при температуре 25 °C. В экспериментах применяли белок после двухступенчатой очистки путём ИМАС и гель-фильтрации. После второго этапа его в несколько стадий диализовали против буферного раствора, содержащего 10 mM HEPES pH 8.3 и 150 mM NaCl, последнюю из которых проводили в течение ночи. Добавляемые в ходе эксперимента лиганды растворяли в диализном буферном растворе, полученном после последней процедуры.

Другие методы. Концентрации очищенных GB1, NdCTR1 и GB1-NdCTR1 определены с использованием теоретически рассчитанного коэффициента молярной экстинкции на длине волны 280 нм: 9530, 2560 и 12090 л/(мол*см), соответственно. Спектры записаны на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Швеция). Профиль гидрофобности GB1-NdCTR1 построен по методике Kyte и Doolittle (*Kyte & Doolittle, 1982*) в программе BioEdit v. 7.2.6. Для просмотра секвенограмм и построения плазмидных карт применяли SnapGene Viewer v. 5.0.7 (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>). Статистический анализ проводили в программе Prism v. 6.0.7 (GraphPad, США), применяя подходящий статистический тест. Значимыми считали отличия, для которых р-уровень значимости был ниже

значения 0.05 ($p < 0.05$), на рисунках это обозначено соответствующим знаком «*». Если не указано обратное, то сравнение проводили с контрольным экспериментом.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Роль транспортеров *CTR1* и *DMT1* в клетках H1299

Для исследования роли белков в клеточных процессах используют два подхода: увеличение их количества в клетке (оверэкспрессия гена) или элиминирование полипептида (нокдаун или нокаут гена). В контексте участия в метаболизме меди гены *CTR1* и *DMT1* (Lee, Peña, et al., 2002; Jiang et al., 2013) как нокаутировали (Tsai et al., 2015; Bompiani et al., 2016; Yu et al., 2019), так и оверэкспрессировали в разных клеточных системах, даже предпринимали попытки рассмотреть их работу в зависимости от взаимной активности (Zheng et al., 2012; Lin et al., 2015). При одновременном изучении *CTR1* и *DMT1* для снижения экспрессии целевого гена использовали технологию коротких интерферирующих РНК (siRNA), которая несмотря на свои достоинства, не позволяет добиться полного отсутствия белкового продукта, а также не может поддерживать низкий уровень экспрессии постоянно.

В настоящей работе для нокаута *CTR1* и *DMT1* мы применили систему CRISPR-cas9, с помощью которой из клеток H1299 получили несколько клеточных линий с «выключенными» генами, кодирующими *CTR1* (*CTR1* KO), *DMT1* (*DMT1* KO) или оба гена одновременно (DKO). Нарушение геномной последовательности *DMT1* и *CTR1* подтвердили прямым секвенированием (в амплифицированном продукте обнаружен ген устойчивости к пурамицину) и наблюдением флуоресценции RFP. Линию DKO получили обработкой клеток *CTR1* KO Cre-рекомбиназой с повторением процедуры нокаута для гена *DMT1*. Уровни экспрессии соответствующих генов по результатам qPCR приведены на рисунке 3.1.

Как следует из рисунка 3.1 во всех клеточных линиях, с нокаутом соответствующих генов, экспрессия *CTR1* и *DMT1* близка нулю. При этом потеря гена *CTR1* приводит к значимому увеличению экспрессии *DMT1*, по сравнению с родительской линией, и наоборот. Активность гена *CTR2* снижалась исключительно при нокауте гомологичного ему *CTR1*, что еще раз говорит о

тесном переплетении функций этих транспортеров меди (*Öhrvik et al., 2013; Tsai et al., 2015*).

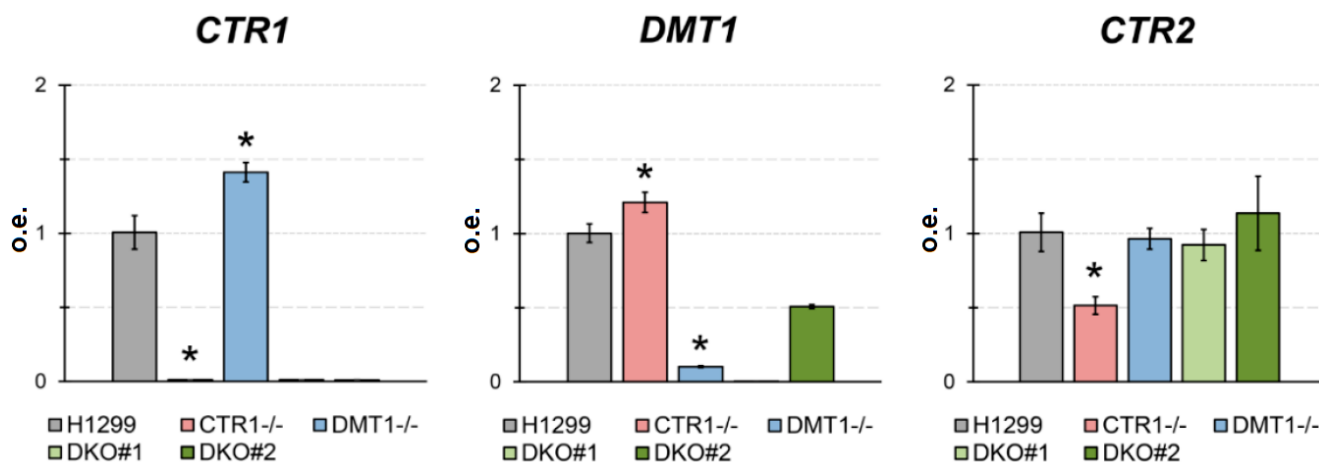


Рисунок 3.1. Экспрессия генов *CTR1*, *DMT1* и *CTR2* относительно материнской линии H1299. Ось ординат – относительные единицы.

Все клеточные линии были жизнеспособны и делились со скоростью близкой к скорости удвоения клеток родительской линии (таблица 3.1).

Таблица 3.1 Время удвоения исследованных клеточных линий

Линия	Время удвоения, часы \pm СКО
H1299	18.77 \pm 1.49
CTR1 KO	15.03 \pm 4.09
DMT1 KO	13.45 \pm 2.31
DKO	14.51 \pm 3.30

Литературные данные о влиянии нокаута *CTR1* на жизнеспособность клеточных линий ограничены. Единственное найденное сообщение о последствиях устойчивого CRISPR-опосредованного нокаута *CTR1* для роста клеток описывает небольшое снижение его скорости у линии НЕК-293Т (*Bompiani et al., 2016*). Имеющееся расхождение представленных и ранее опубликованных результатов укладывается в концепцию, предполагающую существенно отличные типы

метаболизма меди в клетках разного происхождения и соответственно функции. Аналогичные данные для DMT1 отсутствуют.

Из клеточных гомогенатов изолировали субклеточные фракции и изучили распределение меди в них, результаты приводятся на рисунке 3.2.

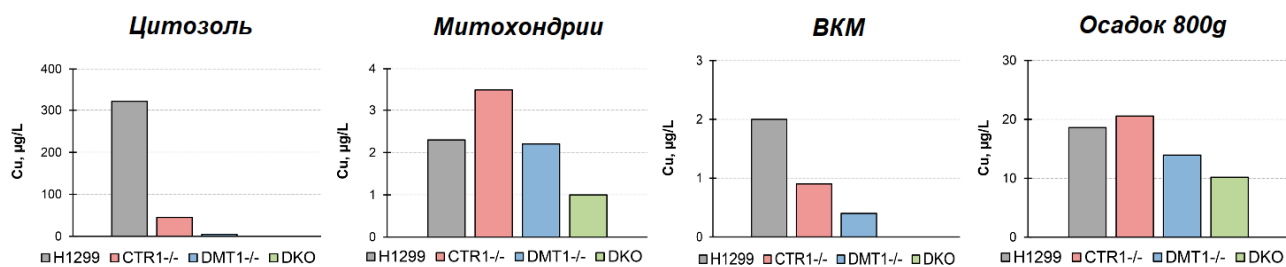


Рисунок 3.2. Концентрация Cu в субклеточных фракциях. ВКМ - фракция внутриклеточных мембран, осадок 800g - клеточный дебрис, ядра и крупные фрагменты плазматической мембраны. Ось абсцисс - концентрация Cu, мкг/л.

Потеря функции любого из переносчиков приводила к драматическому снижению присутствия меди в цитозольной фракции и фракции ВКМ. Во всех рассмотренных фракциях одновременный нокаут двух транспортеров влѣк за собой еще большее понижение концентрации Cu по сравнению с единичными нокаутами. Ранее было обнаружено, что ЦП синтезируется в том числе клетками лёгких (предшественники линии H1299) и соответствующей аденокарциномы, его физиологическая функция остаѣтся неясна (*Matsuoka et al., 2018*). В работе показано, что снижение поступления Cu в АГ (входит в фракцию ВКМ), в котором АТФазы металлируют ЦП, приводит к понижению уровня секретируемого иммунореактивного ЦП (рисунок 3.3) всеми полученными клеточными линиями, что говорит о снижении биодоступности ионов Cu. В то время как потеря функции CTR1 уменьшала количество меди в ВКМ в 2 раза по сравнению с контролем, а DMT1 в 4 раза, эту зависимость не наблюдали для иммунореактивного ЦП, что может свидетельствовать о важности обоих переносчиков для процесса его металлирования. Также возможно, что встраивание ионов Cu в ЦП происходит по

остаточному принципу, поэтому при нокауте любого из транспортеров вся медь расходуется на клеточные процессы с большим приоритетом.



Рисунок 3.3. Синтез ЦП исследованными клетками. А - оксидазная активность ЦП сыворотки крови человека, 25 мкл сыворотки, гель окрашен *o*-дианизидином. В - иммуноблоттинг с антителами к ЦП: 1 - сыворотка человека (0.01 мкл); 2-8 среда инкубации (25 мкл) клеток: 2 - H1299, 3 - CTR1 KO1, 4 - CTR1 KO2, 5 - DMT1 KO1, 6 - DMT1 KO2, 7 - DKO1, 8 - DKO2.

Наименее всего уровень Cu был подвержен изменениям в митохондриях и осадке, полученном после центрифугирования гомогената при низкой скорости седиментации. В линии DMT1 KO концентрация Cu в митохондриальной фракции не отличалась от этого показателя в контрольной группе, в то же время при нокауте *CTR1* наблюдали её рост более чем в полтора раза. Этот факт в совокупности с пониженным содержанием Cu у DKO клеток и описанной ранее повышенной экспрессией *DMT1* в линии CTR1 KO, указывает на потенциальную вовлеченность этого транспортера в снабжение энергетических органелл клетки ионами Cu. В пользу этой гипотезы говорит и ранее описанное обнаружение DMT1 во внешней мембране митохондрий (*Wolff et al., 2014*), где он мог бы переносить ионы Cu в межмембранное пространство для их дальнейшего транспорта в матрикс посредством *slc25a3* (*Cobine et al., 2021*). Судя по нашим результатам, эта функция не выполняется только DMT1. Так, она может быть полностью компенсирована CTR1 или другим возможным переносчиком ионов Cu.

Наименьшую зависимость содержания Cu от нокаута транспортеров, а также наивысшую её концентрацию после цитозоля, наблюдали во фракции, полученной центрифугированием при 800g. Главным образом в ней содержатся ядра и крупные фрагменты клеточной мембраны. Деактивация генов обоих переносчиков

вызывала двухкратное падение уровня меди в этой фракции, в то время как нокаут *CTR1* почти не влиял на него, а *DMT1* незначительно понижал. Наблюдаемые результаты служат еще одним свидетельством существования у клеточного ядра роли хранилища меди, что ранее было показано как у здоровых животных, так и мышцах с гомозиготным нокаутом гена *ATP7B* (Bunton et al., 1987; Huster et al., 2006; Zatulovskaia et al., 2015).

Наблюдаемое падение концентраций *Cu* ниже детектируемых в цитозоле и фракции ВКМ клеток ДКО и только двухкратное уменьшение количества этого металла в их ядрах и митохондриях говорит об исключительной потребности этих органелл в *Cu*, а также существовании альтернативных переносчиков меди в клетку и внутри неё (Zimnicka et al., 2011). Об этом говорит и тот факт, что уровень кодируемого ядром *COX4*, несмотря на нокаут обоих транспортеров оставался неизменным (рисунок 3.4).

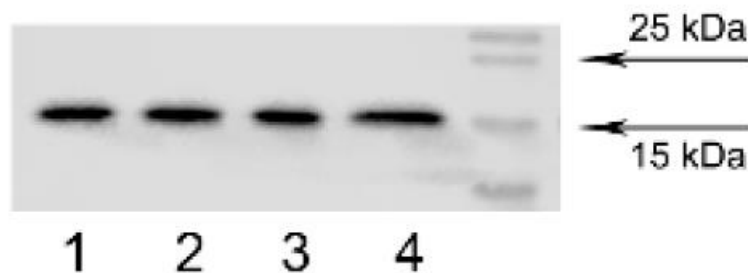


Рисунок 3.4. Уровень *COX4* в исследованных клетках. 1 - H1299; 2 - *CTR1* KO; 3 - *DMT1* KO; 4 - ДКО. В каждую лунку нанесено 30 мкг белка.

Для исследования путей распределения *Cu(I)* в изучаемых клеточных системах в качестве абиогенной метки применили изоэлектронные им ионы *Ag(I)* (Puchkova et al., 2019). Результаты эксперимента, в ходе которого клетки трое суток росли в среде, содержащей хлорид серебра, приведены на рисунке 3.5. Видно, что ингибирующая концентрация ионов *Ag* (определенная как количество металла, приводящее к гибели половины клеточной культуры) растёт в ряду H1299, *DMT1* KO, *CTR1* KO, ДКО, при том что наибольшее увеличение этого показателя ассоциировано с потерей *CTR1*. Неожиданный результат, заключающийся в сохранении метаболической активности клеток с неработающим геном *DMT1* при

30 мкМ Ag(I), можно рассматривать в совокупности с уменьшенным временем деления при нокауте DMT1 (таблица 3.1) и данными работы, описывающей повышение пролиферативной активности кератиноцитов при воздействии субтоксичных доз ионов Ag(I) (Duan et al., 2018). Возможно, наблюдаемое явление связано с неизвестными активностями этого транспортера.

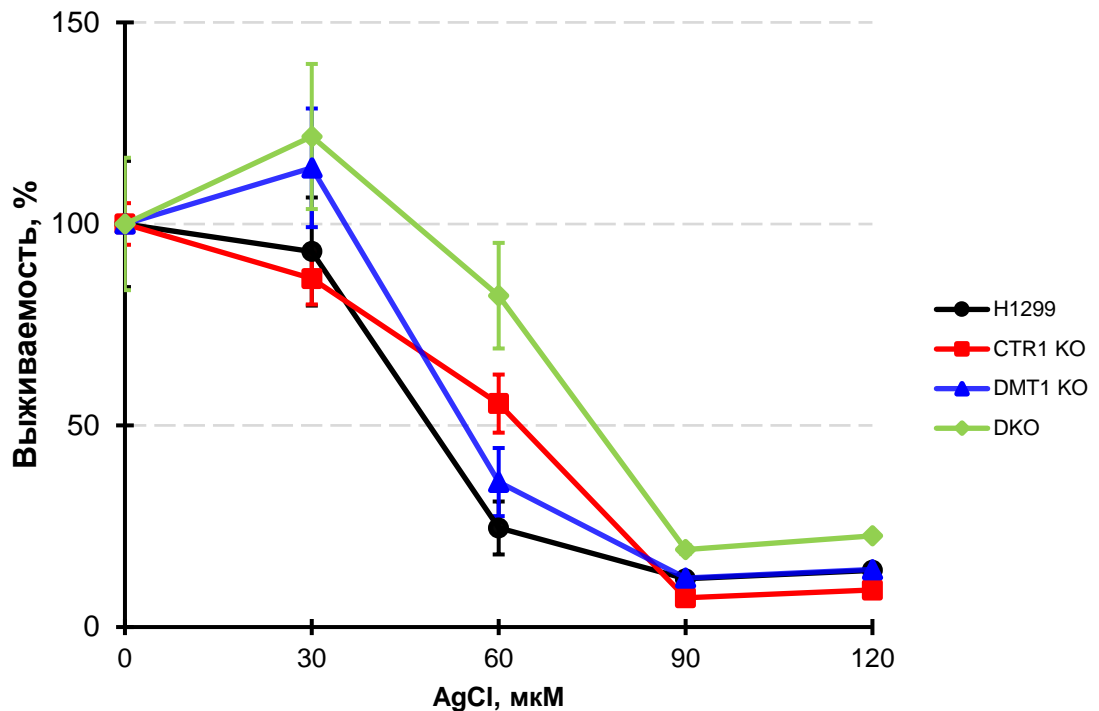


Рисунок 3.5. Выживаемость клеток после 3 суток роста в среде с AgCl.

По причине отсутствия или незначительного эффекта 30 мкМ концентрации AgCl на жизнеспособность клеток её выбрали для изучения распределения внутриклеточного серебра. Субклеточные фракции, как и раньше, получили дифференциальным центрифугированием, а осадок, седиментировавший при 800g, дополнительно разделили равновесным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Результаты представлены на рисунке 3.6.

Наиболее активно серебро накапливали митохондрии, ядра и цитозоль клетки. Все рассмотренные в работе линии аккумулировали меньшие количества Ag по сравнению с родительской, но больший вклад в этот процесс, судя по данным, вносит CTR1. Так, удаление DMT1 только немного снижало содержание Ag в митохондриях и фракции цитозоля и менее чем на 50% в ВКМ. В то же время

деактивация гена *CTR1* приводила к падению концентрации Ag в названных фракциях примерно в 3 раза, что почти не отличалось от случая нокаута обоих переносчиков.

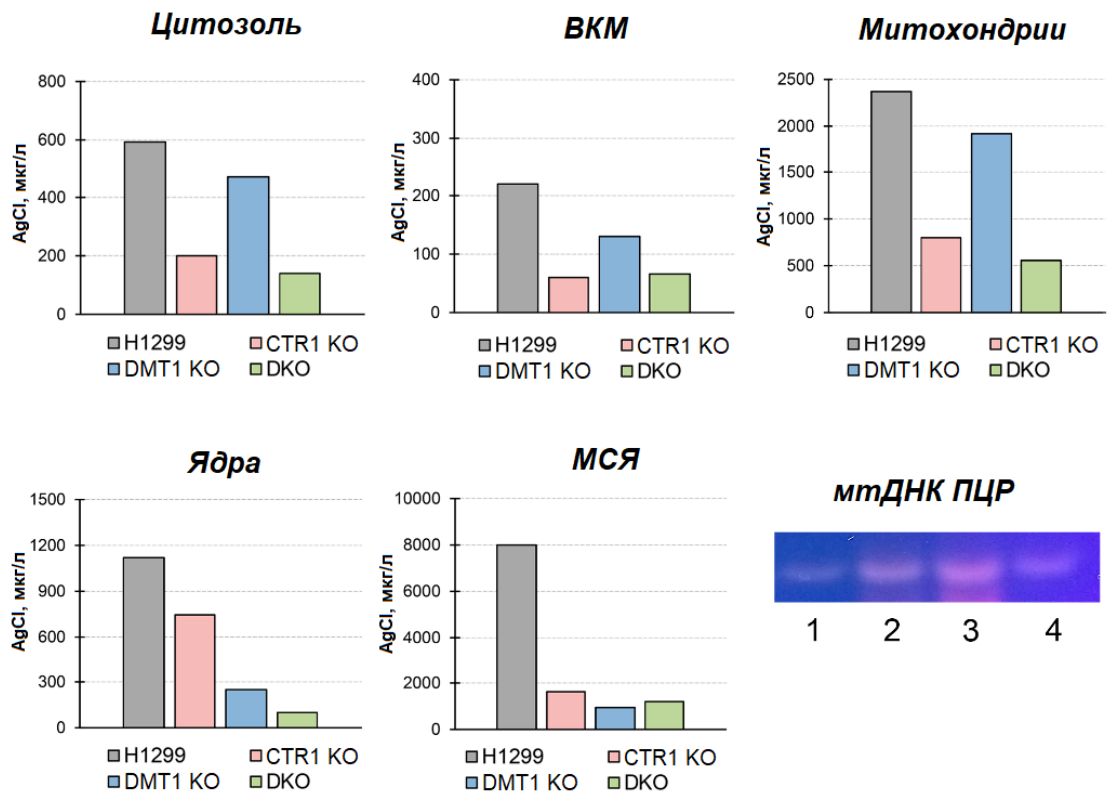


Рисунок 3.6. Содержание Ag в субклеточных фракциях изученных клеток после инкубации в среде с 30 мкМ AgCl и результаты ПЦР с праймерами к D-петле мтДНК человека (нижняя строка, справа). 1 - ядра; 2 - МСЯ; 3 - митохондрии; 4 - ВКМ. ВКМ - внутриклеточные мембраны, МСЯ - митохондрии, седиментировавшие с ядром. Ось ординат - концентрация Ag во фракции, мкг/л.

Большую часть Ag обнаружили в осадке, седиментировавшем при 800g, поэтому его дополнительно разделили, получив три фракции. Первая из них по плотности (1.1175 г/л) соответствовала фрагментам клеточной мембраны, в ней концентрация Ag была на уровне фона (не представлено на рисунках). Около 10% металла первоначального осадка обнаружили во фракции, прошедшей через 46% сахарозу (плотность выше 1.2079 г/л), то есть в ядрах. Остальная часть Ag находилась в сконцентрированной на границе 42 и 46% сахарозы фракции, по плотности напоминавшей митохондрии, поэтому её обозначили как митохондрии,

седиментировавшие с ядром. Во всех полученных субклеточных фракциях, но не в цитозоле, определили присутствие мтДНК с помощью ПЦР с праймерами к D-петле мтДНК. Результаты представлены на рисунке 3.6 (врезка). Видно, что мтДНК обнаруживается во всех исследованных фракциях, тем не менее прослеживались четкие различия в её количествах. Так, оно было максимально в митохондриальной фракции, полученной дифференциальным центрифугированием и минимально в ядерной. Высокое содержание амплифицированного продукта в МСЯ подтвердило предположение о присутствии митохондрий в этой фракции, возможно в виде митофагосом. Это хорошо согласуется с ранее показанной на культивируемых клетках животных ролью лизосом в процессе детоксикации тяжелых металлов, в частности Cu, (*Polishchuk & Polishchuk, 2016*) и тесном переплетении функций вакуолей и митохондрий в контексте метаболизма тяжелых металлов у *S. cerevisiae* (*Li & Kaplan, 2004*).

Судя по результатам, как CTR1, так и DMT1 связаны с переносом ионов Ag в ядро, хотя и в разной степени. Нокаут CTR1 снижал содержание меди во фракции этих органелл на треть по сравнению со значением в контрольной группе, тогда как DMT1 в 4 раза, эффект был еще более выраженным в случае деактивации обоих генов. В литературе описаны как минимум два пути переноса Cu в ядро, можно рассматривать возможность использования тех же путей и ионами Ag(I). Нахождение в ядре показано для шаперона ATOX1 (*Beaino et al., 2014*), который по имеющимся данным не взаимодействует с ДНК напрямую, а действует через белковые комплексы. Та же локализация описана и для шаперона CCS: его транслокация зависит от наличия меди, тогда как обратное утверждение неверно (*Wang et al., 2016*). Оба этих белка потенциально могут связывать Ag(I), так как содержат консервативный MHCXXC мотив, получая его непосредственно от упоминаемых транспортеров или других промежуточных молекул.

Как обсуждается в обзоре литературы, в то время как CTR1 селективно переносит Cu(I), на счёт специфичности DMT1 в отношении меди, консенсус пока не достигнут. Первоначальные теории рассматривали его как импортер Cu(II) в

первую очередь из-за его сродства к другим двухвалентным катионам и отсутствия характерных тиоэфирных остатков (*Gunshin et al., 1997*). Впоследствии появились, хоть и немногочисленные, косвенные свидетельства способности DMT1 транспортировать Cu(I), основанные на стимуляции импорта меди аскорбатом (*Arredondo et al., 2003*). В представленной работе результаты по отслеживанию маршрутов перемещения ионов Ag(I) в полученных клетках позволяют предположить, что оба переносчика способны транспортировать эти ионы. Однако, по всей видимости, CTR1 имеет к ним большее сродство, так как его нокаут больше влиял на выживаемость клеток, обработанных нитратом серебра, и накопление Ag(I) в субклеточных фракциях. Единственным исключением служили ядра, для которых, вероятно, существует особый механизм доставки металлов.

На следующем шаге мы изучили экспрессию нескольких генов, для которых известна связь с метаболизмом меди или медь-зависимым сигналингом. В первую очередь рассмотрели один из маршрутов «каталитической» меди, которая с помощью шаперона CCS встраивается в антиоксидантный фермент SOD1 (рисунок 3.7). В клетках CTR1 KO экспрессия CCS не отличалась от контрольного штамма, тогда как нокаут DMT1 увеличивал её на четверть, а обоих транспортеров на 75%. В случае SOD1 только потеря CTR1 приводила к значимому уменьшению, почти в два раза, экспрессии этого гена, что отражалось и на уровне белкового продукта, который почти исчезал из клеток.

Связь экспрессии генов CCS и SOD1, продукты которых работают в связке, с уровнем клеточной меди описана в литературе. Известно об обратной зависимости активности CCS от количества Cu (*Caruano-Yzermans et al., 2006*), тогда как для SOD1 наблюдается обратное, что связывают с участием ионов Cu в производстве АФК и повышенной необходимостью в антиоксидантных ферментах при избытке токсичного металла (*Gralla et al., 1991; Spinazzi et al., 2014*). В нашей работе исчезновение CTR1 снижало экспрессию SOD1 и уровень соответствующего белка, но значимо не изменяло активность гена CCS, что не согласуется с опубликованными ранее данными. Можно предположить, что падение

концентрации меди в цитозоле достаточно для угнетения *SOD1*, но недостаточно для индукции *CCS*. Возможна и роль компенсаторной функции *DMT1*, нокаут гена которого эффективнее снижал цитоплазматический уровень *Cu* по сравнению с нокаутом *CTR1* и в то же время усиливал экспрессию *CCS*. Это предположение наталкивается на следующий еще более трудно объяснимый факт неизменной активности гена *SOD1* (количество белкового продукта тоже неизменно) как в случае потери только *DMT1*, так и обоих транспортеров одновременно. В контексте этих данных можно сделать предположение о замещающей функции одного из неизвестных альтернативных переносчиков, который способен нормализовать уровень *SOD1* в клетке (Jensen & Culotta, 2005).

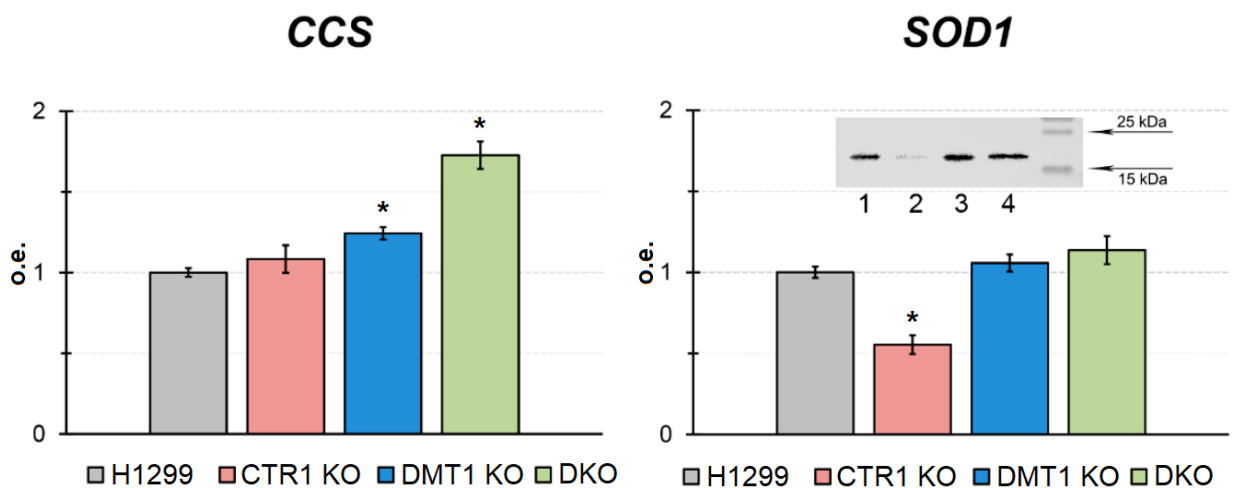


Рисунок 3.7. Экспрессия генов *CCS* и *SOD1* в исследуемых клеточных линиях. Приведены значения относительно материнской линии. Ось ординат - относительные единицы. Врезка - иммуноблоттинг клеточных экстрактов с антителами к *SOD1*: 1 - H1299, 2 - CTR1 KO, 3 - DMT1 KO, 4 - DKO. В каждую лунку нанесено 30 мкг белка.

С целью проверить гипотезу об участии *CTR1* и *DMT1* в переносе ионов *Cu* для участия в разных сигнальных процессах исследовали экспрессию и количество соответствующих белков, а именно *COMMD1*, *XIAP*, *HIF1 α* и *NF-kB (p65)*, результаты представлены на рисунке 3.8. Мы не обнаружили драматического изменения показателей ни в одном из случаев, но тем не менее наблюдаемые изменения были статистически значимыми. Так, экспрессия *XIAP* была немного

повышена в DMT1 KO и еще чуть больше у клеток линии DKO, тогда как нокаут только CTR1 не влиял на неё. Единичная деактивация каждого из транспортеров увеличивала активность гена HIF1 α , тот же эффект наблюдали и при одновременном их выключении, но уже в меньшем масштабе. Отсутствие CTR1 примерно на четверть снижало уровень экспрессии NF- κ B, эффект был более выраженным в линии DKO, где он опускался до половины от контрольного уровня.

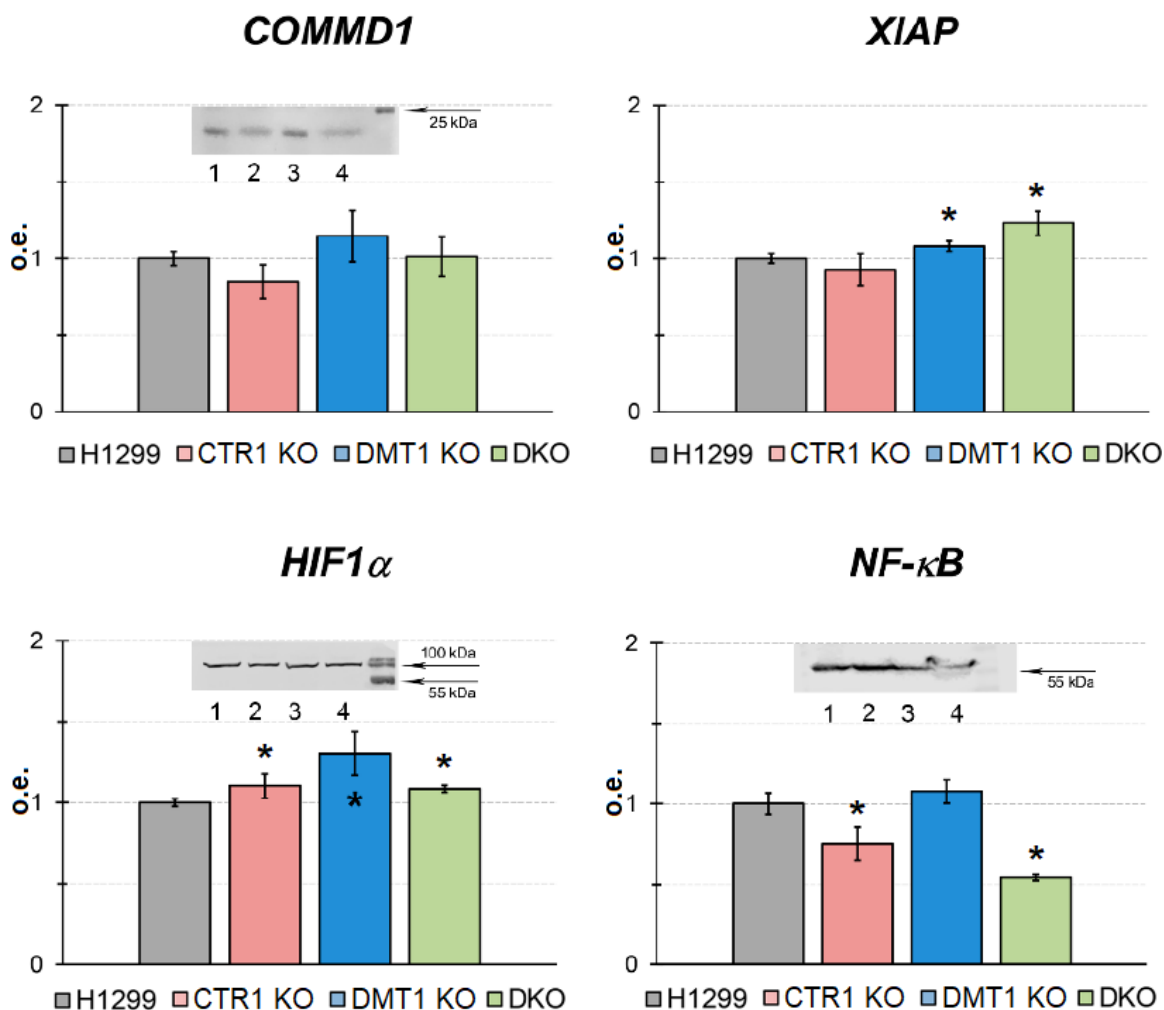


Рисунок 3.8. Экспрессия генов *COMMD1*, *XIAP*, *HIF1 α* и *NF- κ B* в исследуемых клеточных линиях. Приведены значения относительно линии H1299.

Ось ординат - относительные единицы. Врезка - иммуноблоттинг клеточных экстрактов с антителами к соответствующим белкам: 1 - H1299, 2 - CTR1 KO, 3 - DMT1 KO, 4 - DKO. В каждую лунку нанесено 30 мкг белка.

Оба регуляторных белка, повышение экспрессии которых влечет за собой нокаут DMT1, а именно HIF1 α и XIAP, взаимодействуют с CCS. При этом, CCS

необходим для активации HIF1 α (Feng et al., 2009) и сам активируется вторым (Brady et al., 2010). Более того, XIAP служит также регулятором COMMD1 на уровне стабильности этого белка, что вытекает в «запирание» Cu в клетке, необходимое при её дефиците (Mufti et al., 2007). Развивая приведенное выше, получается, что отсутствие DMT1 и сопутствующий недостаток ионов Cu приводит к повышению экспрессии XIAP и CCS, а также активности второго. CCS через HIF1 α инициирует клеточную стресс-программу, а XIAP не позволяет оставшимся ионам Cu покинуть клетку, воздействуя на COMMD1. Таким образом, для случая потери функции DMT1 складывается цельная картина клеточной стратегии сохранения меди, затрагивающая как экспрессию генов, так и активность их продуктов.

Отличие результатов, полученных в случае нокаута *CTR1* и *DMT1*, говорит о разделении ролей между рассматриваемыми переносчиками. В качестве белков для исследования последствий ограничения поступления меди через *CTR1* и *DMT1* выбрали регуляторные молекулы с большим количеством мишеней. Это значит, что даже небольшие изменения в активности их генов или самих белков, подобные описанным, могут иметь последствия для всей клетки.

CTR1 привлекает к себе внимание и в медицинской практике. Ряд исследований и обобщивший их метаанализ, выявили положительную корреляцию между уровнем экспрессии его гена и выживаемостью пациентов при терапии ряда злокачественных опухолей противоопухолевыми препаратами платины, среди которых самыми распространенными остаются цислатин и карбоплатин (Sun et al., 2017; Kuo et al., 2021). Это наблюдение хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о том, что *CTR1*, оставаясь не единственным маршрутом поступления этих препаратов в клетку, ответственен за 60-70% импортированного цисплатина и 50% карбоплатина (Holzer et al., 2006).

В нашей работе мы проверили будут ли полученные клеточные линии устойчивы к упомянутым цитотоксичным агентам, результаты представлены на рисунке 3.9. Видно, что ингибирующая концентрация цисплатина гораздо выше,

чем у карбоплатина, но для обоих агентов она зависит от типа клеток. Потеря CTR1 приводила к самому выраженному эффекту: в случае цисплатина даже при 100 мкМ концентрации препарата выживало больше половины клеток, для карбоплатина же наблюдали полное ингибирование клеточного роста уже при 2 мкМ вне зависимости от клеточной линии, но на участке концентраций до 1 мкМ нокаут CTR1 несколько повышал устойчивость к нему.

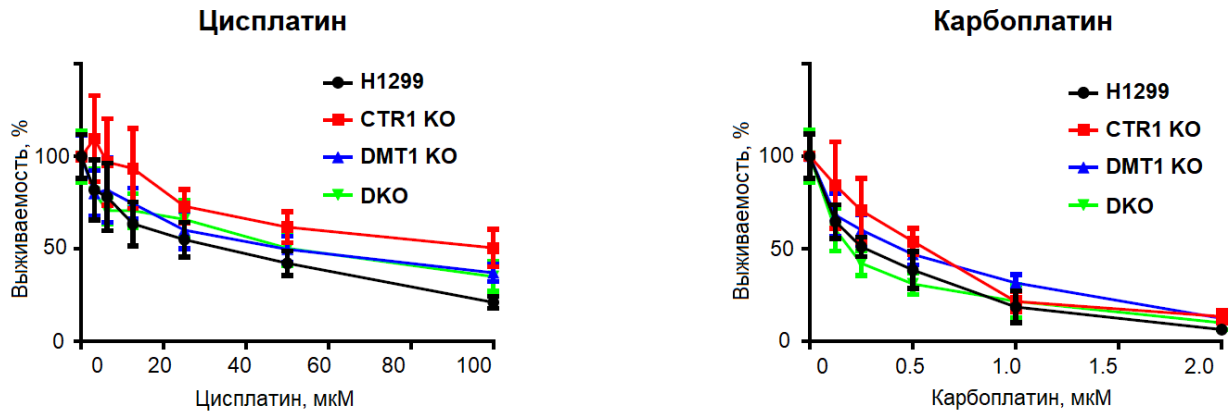


Рисунок 3.9. Выживаемость клеток после 3 суток инкубации в среде, содержащей цисплатин или карбоплатин. Ось абсцисс - концентрация вещества, ось ординат - выживаемость относительно контрольных условий (рост в обычной среде).

Для линий DMT1 KO и DKO наблюдаемая картина отличалась в зависимости от цитотоксичного агента. Обе линии демонстрировали умеренную устойчивость к цисплатину, находящуюся посередине между такой у материнских клеток и CTR1 KO. Подобный результат для DMT1 KO можно было бы легко объяснить минимальным участием в переносе цисплатина и DMT1, эффект отсутствия которого был бы сглажен повышением экспрессии CTR1 в этих клетках, но данные полученные для DKO разрушают построенную логическую модель. Выживаемость DKO в случае карбоплатина не отличается от контроля, а DMT1 KO, как и раньше, показывает среднюю устойчивость между контролем и CTR1 KO. Таким образом, судя по полученным результатам, CTR1 связан с импортом цисплатина и в меньшей степени карбоплатина в клетку, что согласуется с литературными данными (*Holzer et al., 2006*). Нокаут DMT1 тоже повышал клеточную устойчивость к обоим

препаратам, хотя и в меньшей степени, что, пусть и осторожно, позволяет предположить его вовлеченность в транспорт противоопухолевых препаратов платины.

По причине релевантности CTR1 с точки зрения терапии злокачественных новообразований решили проверить устойчивость полученных клеточных линий к другим часто применяемым препаратам при терапии опухолей. В их число вошли ингибитор киназы ATR, участвующей в процессе репарации ДНК, VE-822 (*Fokas et al., 2012*), ингибитор пролиферативной киназы mTOR - Torin-1 (*Francipane & Lagasse, 2013*), метформин, широко применяемый также при сахарном диабете 2-ого типа (*Schulten, 2018*), и ингибитор импортера глюкозы в клетку GLUT1 - STF-31 (*Chan et al., 2011*). Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.10.

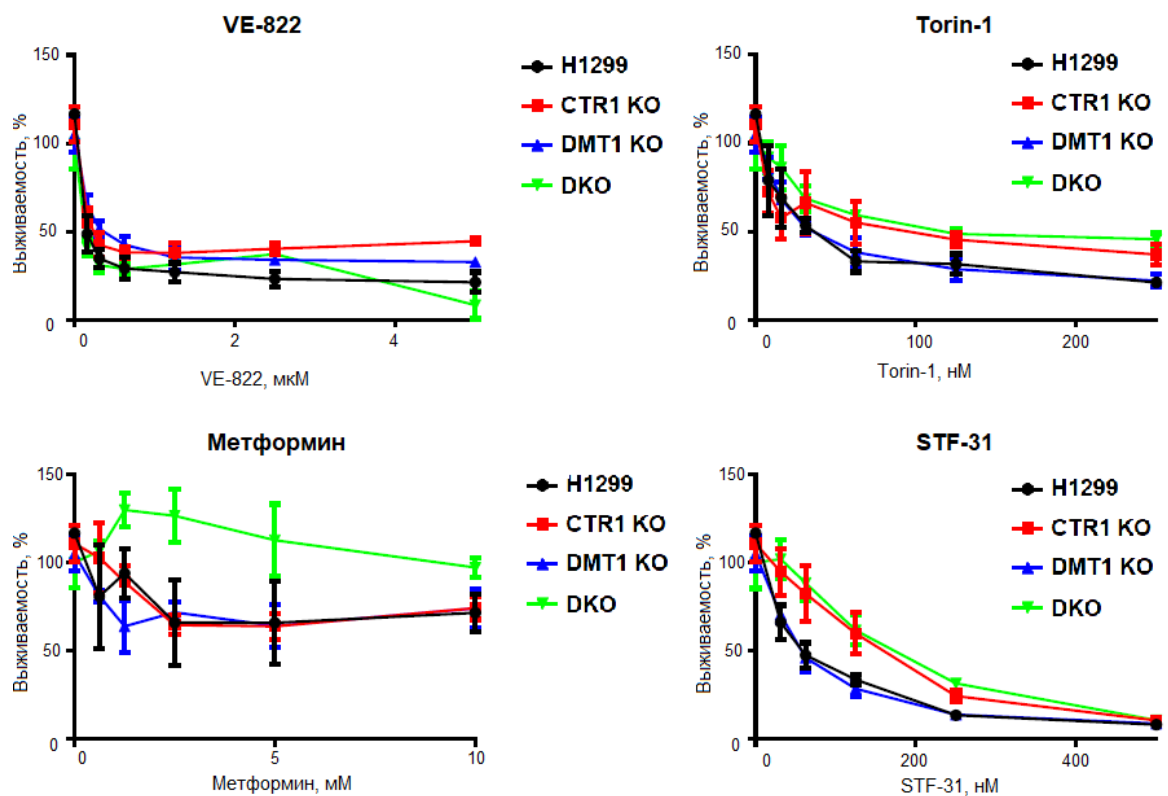


Рисунок 3.10. Выживаемость клеток после 3 суток инкубации в среде, содержащей одно из следующих веществ: VE-822, Torin-1, метформин или STF-31. Ось абсцисс - концентрация вещества, ось ординат - выживаемость относительно контрольных условий (рост в обычной среде).

Устойчивость всех клеточных линий к умеренным концентрация VE-822 была на сходном уровне. Различия при высоких концентрациях скорее всего имеют природу артефактов, хотя можно допустить существование и клинически релевантных причин. В случае Torin-1 и STF-31 наблюдали сходную картину существенно повышенной резистентности линий CTR1 КО и ДКО к ним (особенно заметно для STF-31). В то же время клетки с нокаутом только DMT1 демонстрировали ту же чувствительность, что и родительские H1299. Неожиданный результат получили для метформина, который обычно рассматривают как регулятор метаболизма глюкозы, чем и обусловлено его применение при ожирении и диабете. Клетки с потерей обоих транспортеров не просто демонстрировали повышенную устойчивость к метформину, но и имели более высокую метаболическую активность в его присутствии. Метформин считается плеiotропным агентом, он способен ингибировать НАДН-дегидрогеназный комплекс, активировать АМФ-зависимую киназу АМПК, снижать экспрессию упомянутого выше GLUT1, предотвращать накопление HIF1 α , приведен далеко не полный список (*Schulten, 2018*). Наряду со всем перечисленным метформин связывает ионы Cu. Некоторые работы утверждают, что это свойство вкупе со способностью накапливаться в митохондриальном матриксе влечет за собой митохондриальную дисфункцию, опосредуя его противораковый эффект (*Müller et al., 2018*). В других же предполагается необходимость ионов Cu для проявления многих его эффектов, то есть имеется в виду функциональность метформина в комплексе с ионами Cu, тем более, что, связывая и другие металлы (например, Zn), аффинность к Cu у него наивысшая (*Logie et al., 2012*). Возможно, наблюдаемое повышение пролиферативной активности клеток ДКО вызвано выполнением метформином роли доставщика Cu в клетку, своеобразного метанобактин-подобного переносчика. Так как эти клетки имеют наименьшую концентрацию Cu, в том числе и в митохондриях, аккумулярованный там метформин в комплексе с ними мог бы выступить в качестве дополнительного источника ионов Cu, необходимых для функционирования энергетического метаболизма клетки.

Суммируя данные, полученные в этой части работы, можно сделать несколько выводов. Очевидно, что оба переносчика способны транспортировать ионы Cu и хотя бы частично компенсируют потерю одного из них повышенной активностью оставшегося. В отношении специфичности DMT1 к определенной степени окисления Cu заключение сделать сложно, но на основании экспериментов с Ag(I) можно предположить его способность к переносу и Cu(I), хотя CTR1, бесспорно, служит основным маршрутом их поступления в клетку. Нокаут DMT1, CTR1 или их обоих одновременно вызывал резкое падение концентрации меди в цитоплазме и фракции ВКМ, тогда как этот показатель в митохондриальной и ядерной фракциях изменялся намного менее драматично. Это свидетельствует о существовании механизмов, обеспечивающих имеющих наивысшую важность ядра и митохондрии, ионами Cu, в то время как секреторный путь клетки оказывается в них сильно ограничен, что видно по количеству синтезированного ЦП. Ядро и митохондрии могут выступать и в роли наиболее важного депо ионов Cu в условиях её дефицита.

Нам удалось частично ответить на главный вопрос этой работы: переносят ли CTR1 и DMT1 ионы Cu для участия в разных клеточных процессах или они равноправны? Наблюдаемая дифференциальная экспрессия ряда медь-зависимых генов, таких как *SOD1*, *HIF1 α* , *XIAP* и *NF- κ B* наряду с изменением уровня соответствующих белков, при нокауте CTR1 и DMT1, свидетельствуют о различных маршрутах передвижения ионов Cu после поступления в клетку через каждый из переносчиков. В случае потери DMT1 возможна реализация клеточной программы, направленной на сохранение внутриклеточной меди, реализуемой через взаимодействие *XIAP*, *CCS*, *HIF1 α* и *COMMD1*.

Важным результатом можно считать полученные свидетельства существования и других путей поступления меди как через плазматическую мембрану, так и через внешнюю мембрану митохондрий. Так, даже одновременный нокаут CTR1 и DMT1 не приводил к потере клетками жизнеспособности или исчезновению из них Cu. Мы еще раз подтвердили способность CTR1 переносить

противоопухолевые препараты платины, тогда как роль DMТ1 в этом процессе остаётся невыясненной. Данные об устойчивости клеток с утраченным CTR1 к ряду широко применяемых противоопухолевых препаратов могут иметь важное значение для клинической практики, позволяя выстраивать более эффективную терапевтическую стратегию при наличии информации о его активности.

3.2. Изучение свойств рекомбинантного NdCTR1 в *E. coli*

Для изучения свойств NdCTR1 его клонировали в *E. coli*. С этой целью выбрали соответствующий участок гена человека, кодирующий первые 67 а.о. CTR1. Мы конъюгировали NdCTR1 на N-конце с GST (детали в разделе методы), получив ожидаемый белковый продукт. Для производства белка GST-NdCTR1 использовали плазмиду pNdCTR1, её карта приведена на рисунке 3.11.

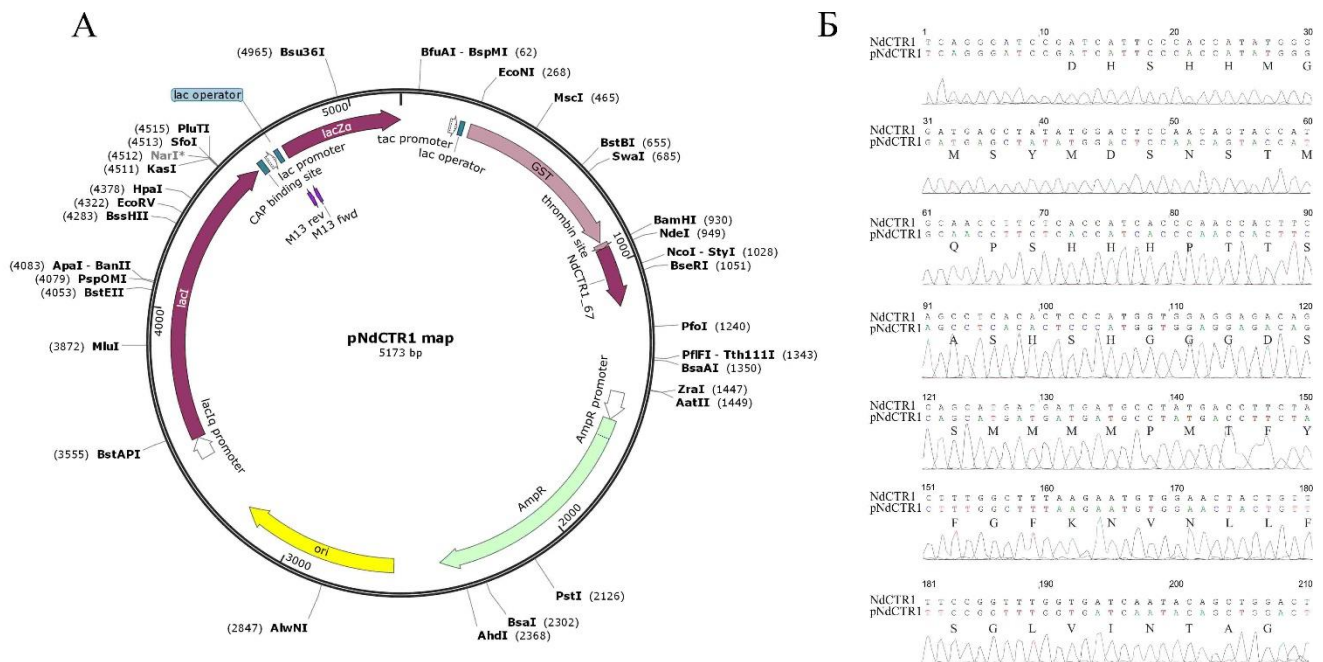


Рисунок 3.11. Карта плазмиды pNdCTR1 (А) и результаты секвенирования вставки, соответствующей NdCTR1 в ней (Б).

Правильность вставки проверили секвенированием по Сэнгеру, результаты на рисунке 3.11. Трансформация *E. coli* pNdCTR1 не влияла на их выживаемость (рисунок 3.12-А).

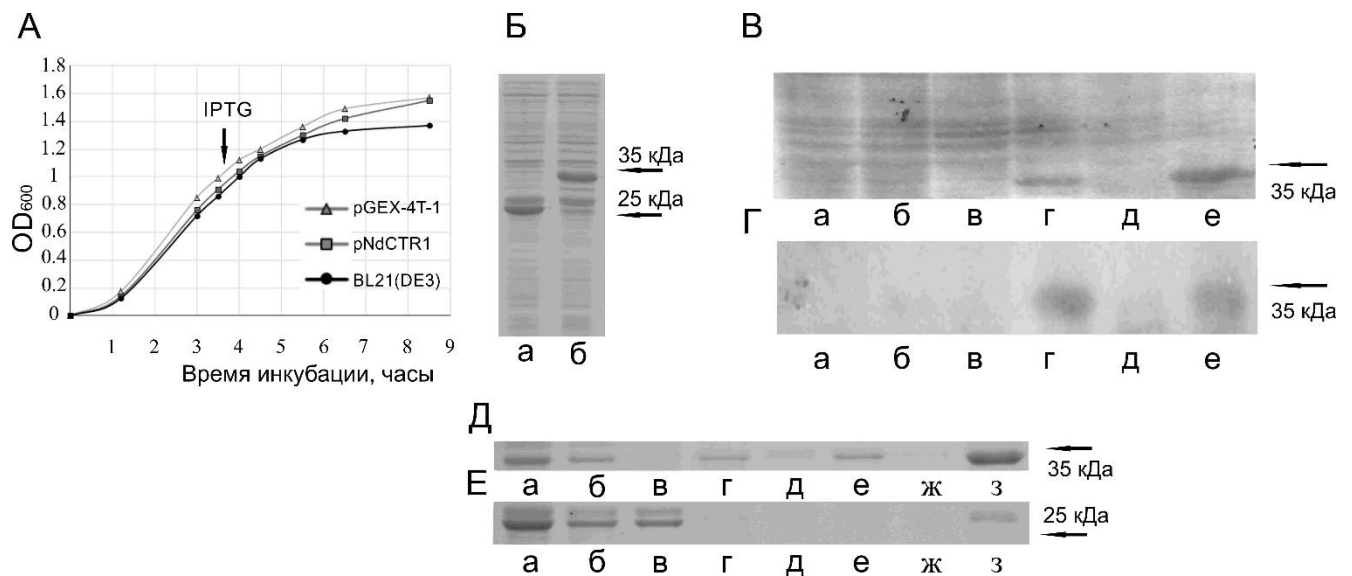


Рисунок 3.12. Скорость роста *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1 (А). (Б) Наличие белкового продукта в штамме, трансформированном pGEX-4T-1 (а) или pNdCTR1 (б) после индукции экспрессии добавлением IPTG. (В) Влияние IPTG на изменение белкового состава клеточного экстракта через 0, 1.5 и 3 часа после добавления: а, б, в - культура без IPTG, г, д, е - штамм трансформированный pNdCTR1. (Г) Иммуноблоттинг ПААГ с (В) с антителами ко второму медьсвязывающему домену NdCTR1. (Д) Белковый состав следующих фракций штамма pNdCTR1: грубый клеточный экстракт (а), лизат после обработки ультразвуком (б), растворимая фракция лизата, полученная центрифугированием при 16000g (в), осадки (г, е, з) и растворимые фракции, полученные центрифугированием (д, ж), после трёх последовательных растворов полученного осадка денатурирующим раствором (1% Тритон X-100, 5 mM ДТТ, 2 М мочевины). (Е) То же, что и (Д), но применительно к штамму, трансформированному pGEX-4T-1.

После индукции экспрессии рекомбинантного гена добавлением IPTG в среду культивирования в клеточном экстракте наблюдали появление белковой зоны, по массе соответствующей слитому полипептиду GST-NdCTR1 (рисунок 3.12-Б). Белок окрашивался антителами ко второму медьсвязывающему домену NdCTR1 (рисунок 3.12-Г). Большая часть белка GST-NdCTR1 находилась в составе телец включения, которые не удавалось растворить относительно низкими

концентрациями хаотропных агентов, таких как мочевины. Этого удалось достичь обработкой 8 М мочевиной или 6М гуанидин хлоридом, но при проведении диализа с целью осуществить рефолдинг белка, он неизменно снова выпадал в нерастворимый осадок (данные не представлены).

Для проверки способности NdCTR1 связывать ионы Cu в *E. coli* трансформированные бактерии инкубировали с различными концентрациям сульфата меди, результаты находятся на рисунке 3.13.

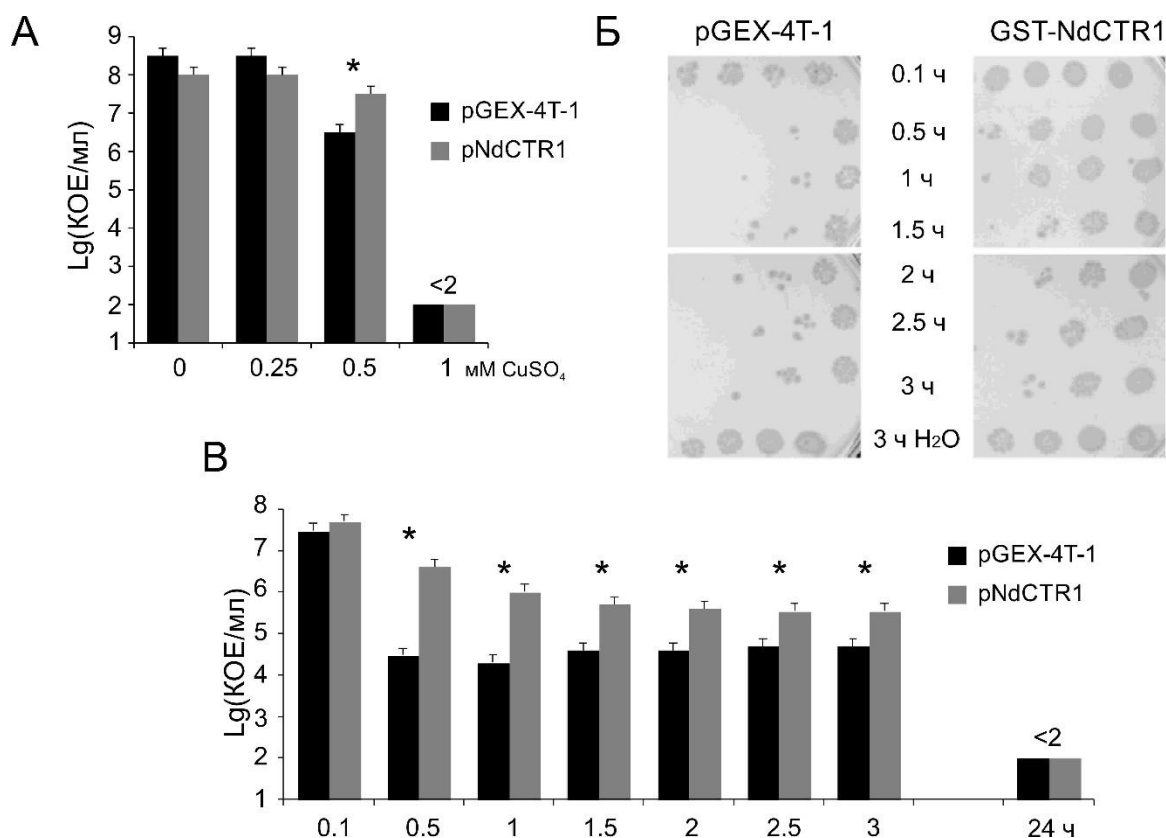


Рисунок 3.13. (А) Жизнеспособность *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1 при инкубации в среде с различными концентрациями CuSO₄ в течение 24 часов. (Б) Титр *E. coli*, определённый путём высевания на чашки Петри, после инкубации в среде с 1 mM CuSO₄. Ось ординат - десятичный логарифм CFU. (В) Эксперименты аналогичные, приведенному на (Б), повторены три раза.

Видно, что наличие GST-NdCTR1, но не одного GST, в клетках снижало их чувствительность к ионам Cu, тем не менее через 24 часа инкубации в 1 mM растворе бактериальный титр падал ниже предела обнаружения.

Эксперименты аналогичные, описанным выше с сульфатом меди, провели и с ионами Ag(I) , которые мимикрируют под ионы Cu(I) . Результаты приведены на рисунке 3.14.

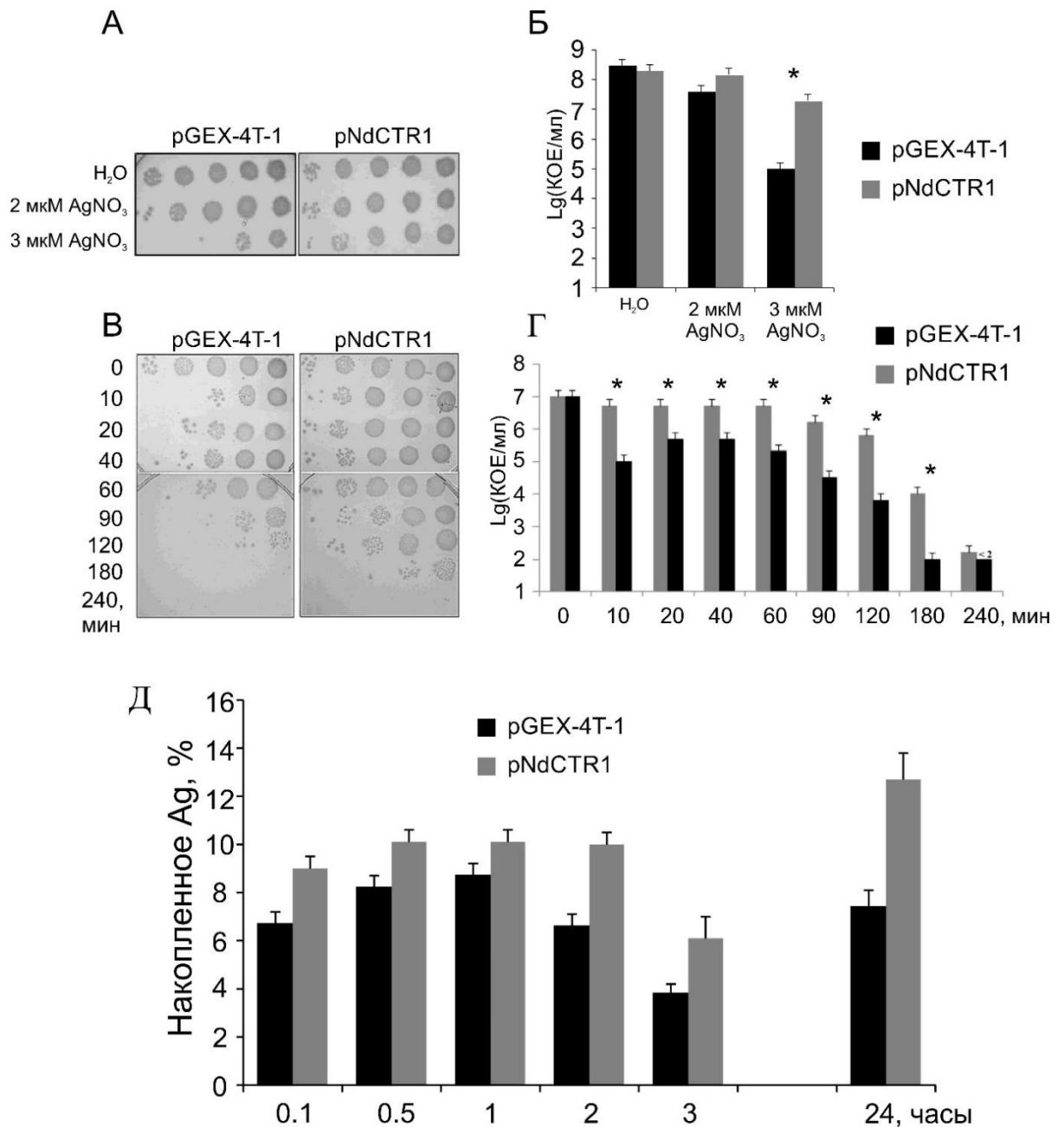


Рисунок 3.14. (А) Титр *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1, при инкубации в среде с различными концентрациями AgNO_3 в течение 24 часов, определенный на чашках Петри. (Б) Усредненные результаты трёх экспериментов, аналогичных приведённому на (А). (В) Титры *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1, при инкубации в среде с 3.5 μM AgNO_3 , через различные промежутки времени, определенные на чашках Петри.

(Г) Усредненные результаты трёх экспериментов, аналогичных приведённому на (В). Ось ординат на (Б) и (Г) - десятичный логарифм CFU. (Д) Накопление Ag *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1, в ходе инкубации в 3.5 мкМ растворе AgNO₃. Ось ординат на (Д) - отношение аккумулированного металла к полному количеству первоначально добавленного.

Результаты экспериментов с нитратом серебра, как и предыдущие, показывают способность NdCTR1 повышать устойчивость бактерий к этому металлу. Так, штамм, трансформированный pNdCTR1, после инкубации в течение суток при 3 мкМ концентрации ионов Ag(I) имел титр почти на три порядка выше, чем у контрольного (рисунок 3.14-Б). Это происходило несмотря на тот факт, что он же через сутки накапливал примерно в два раза больше Ag при инкубации в 3.5 мкМ растворе AgNO₃ (рисунок 3.14-Д). Повышенная аккумуляция металла наряду с более высокой устойчивостью позволяют предположить, что наблюдаемый эффект связан с секвестрацией токсичных ионов полипептидом NdCTR1 в *E. coli*.

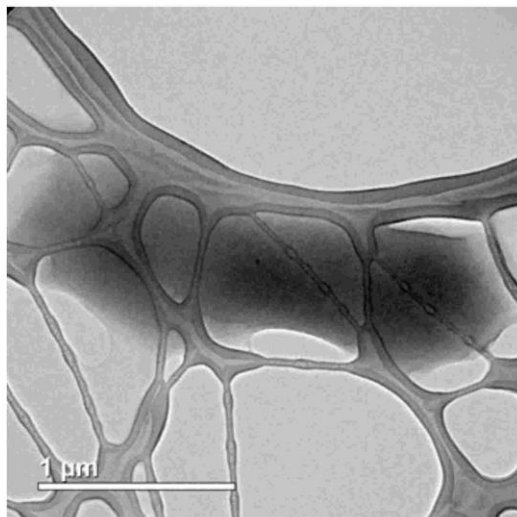
Помимо роли NdCTR1 результаты проведенных экспериментов позволили отметить интересный характер ответа бактерий на ионы Ag(I) в среде. Вне зависимости от штамма, после первоначального падения колониеобразующей активности мы наблюдали её частичное восстановление, которое по времени проявления совпадало с максимальным количеством накопленного Ag(I). Максимум эффекта был замечен примерно через 1 час после добавления Ag(I), после чего способность *E. coli* размножаться снова снижалась, опускаясь ниже уровня детекции или приближаясь к нему вплотную (рисунок 3.14-Г).

Бактерии, как и эукариотические организмы, используют ионы Cu, пусть и зачастую в меньшем масштабе. Даже анаэробные представители простейших, не имея надобности в Cu для катализа своих биохимических реакций, содержат гены, кодирующие системы детоксикации её ионов, попавших в клетку (*Festa & Thiele, 2011*). В *E. coli* тоже обнаружена метаболическая система меди, которая определяет пути её поступления в клетку, встраивания в купроэнзимы и экскреции. Большинство компонентов этой системы находятся в периплазматическом

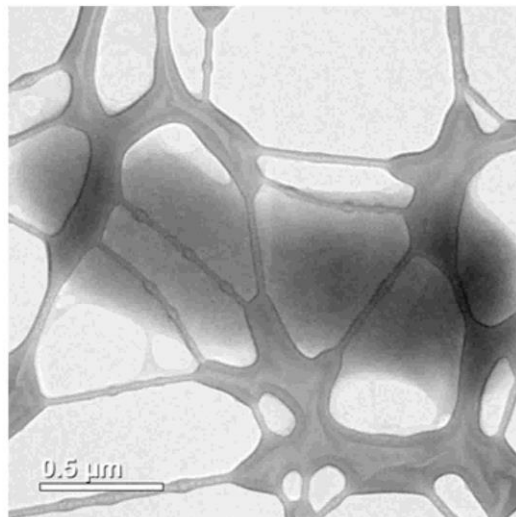
пространстве, где локализована и основная часть купроэнзимов, тогда как цитозольное пространство тщательно предохраняется от ионов Cu. При попадании ионов Cu туда они быстро связываются транскрипционным фактором CueR, который после активации индуцирует экспрессию своего регулона (*cue*-регулон). В него входят медьсвязывающий цитозольный шаперон CopZ, Cu-транспортная АТФаза CopA, переносящая ионы Cu через цитоплазматическую мембрану и мультимедная оксидаза CopO, окисляющая Cu(I) в периплазме для их секвестрации там. В дополнение к перечисленному CueR стимулирует экспрессию периплазматического шаперона CusF и протонного антипортера CusCBA, который экспортирует ионы Cu во внеклеточное пространство (*Giachino & Waldron, 2020*). Вероятно, что наблюдаемый двухфазный ответ *E. coli* на ионное серебро связан с активацией описанной системы, тем более, что для некоторых её компонентов известно взаимодействие с Ag(I) (*Randall et al., 2014*). Сначала связывающие и экспортирующие белки частично справляются с нагрузкой, в чем им помогает NdCTR1, после чего же наступает перегрузка системы, влекущая за собой снижение способности к делению.

Важно отметить, что интактные клетки штаммов, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1 имели нормальную морфологию, что можно заключить по снимкам на рисунке 3.15, полученным с помощью ПЭМ. После инкубации в растворе с 3 мкМ AgNO₃ большинство индуцированных клеток штамма pGEX-4T-1 сохраняли стандартную морфологию (рисунок 3.16-А) и зачастую содержали включения хлорида серебра (рисунок 3.16-Б). Мы нашли единственный пример образования кристаллического серебра на поверхности или в объёме бактерии этого штамма, что видно по энергодисперсионному спектру эмиссии от обнаруженных структур (рисунок 3.16-В, Г).

А



Б



В

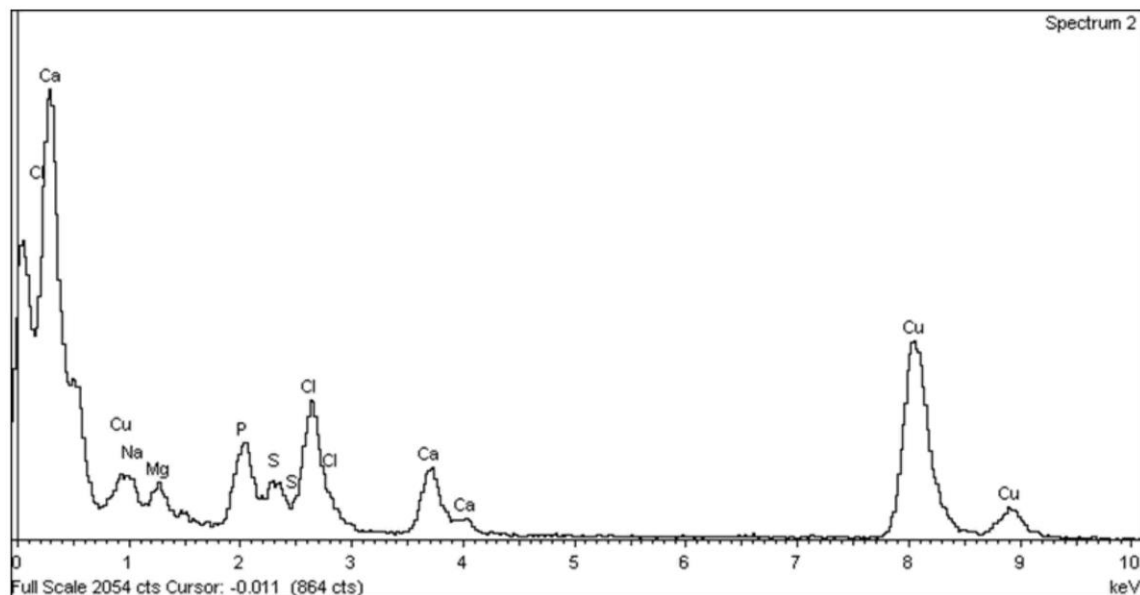


Рисунок 3.15. Снимки intactных бактерий *E. coli*, экспрессирующих GST (А) или GST-NdCTR1 (Б), полученные на ПЭМ. (В) Характерный для бактерий, синтезирующих GST-NdCTR1, энергодисперсионный спектр эмиссии.

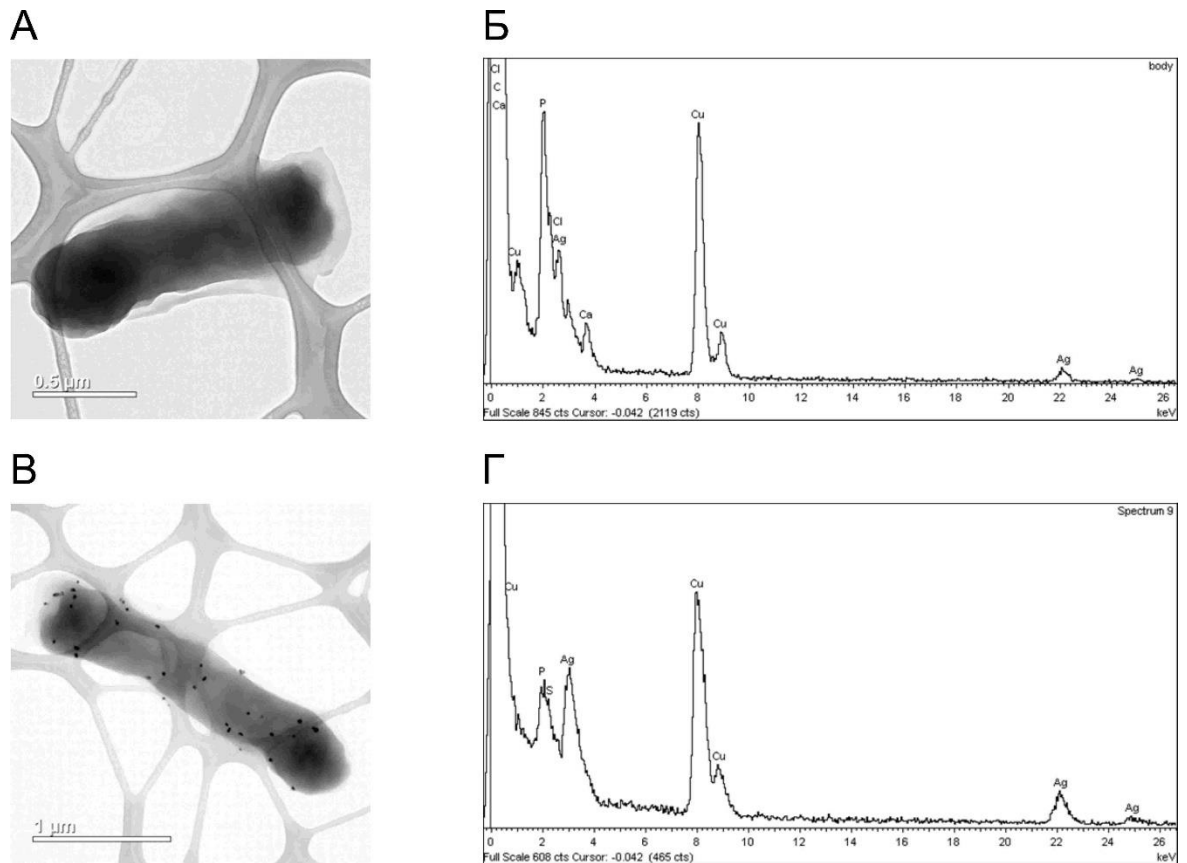


Рисунок 3.16. (А) Характерная морфология бактерий *E. coli*, экспрессирующих GST, после инкубации в растворе 3 мкМ AgNO_3 , снимок получен на ПЭМ. (Б) Энергодисперсионный спектр эмиссии участка бактерии с (А). (В) Бактерия, синтезирующая GST, с образованиями кристаллического серебра на ней и (Г) характерный для такой структуры спектр.

После инкубации в растворе 3 мкМ AgNO_3 бактерий, синтезирующие GST-NdCTR1, гораздо чаще наблюдали образования, содержащие Ag в целом (рисунок 3.17-А,В,Г), и серебро в кристаллической форме в частности (рисунок 3.17-Б,Г). Факт более активного образования различных структур на основе соединений Ag по сравнению с клетками без NdCTR1, по всей видимости, вытекает из их способности накапливать больше ионов Ag. Зафиксированное явление служит еще одним примером так называемого «зелёного» синтеза наночастиц серебра (НЧС), при котором они формируются из источника ионного серебра под воздействием биологических молекул, лизатов микроорганизмов или даже их самих, как и происходит в представленном случае (Roy *et al.*, 2019). Интересной особенностью

стало и то, что для этого штамма мы обнаружили филаментирование бактерий при наличии токсичного металла во внешней среде (рисунок 3.17-Д,Е).

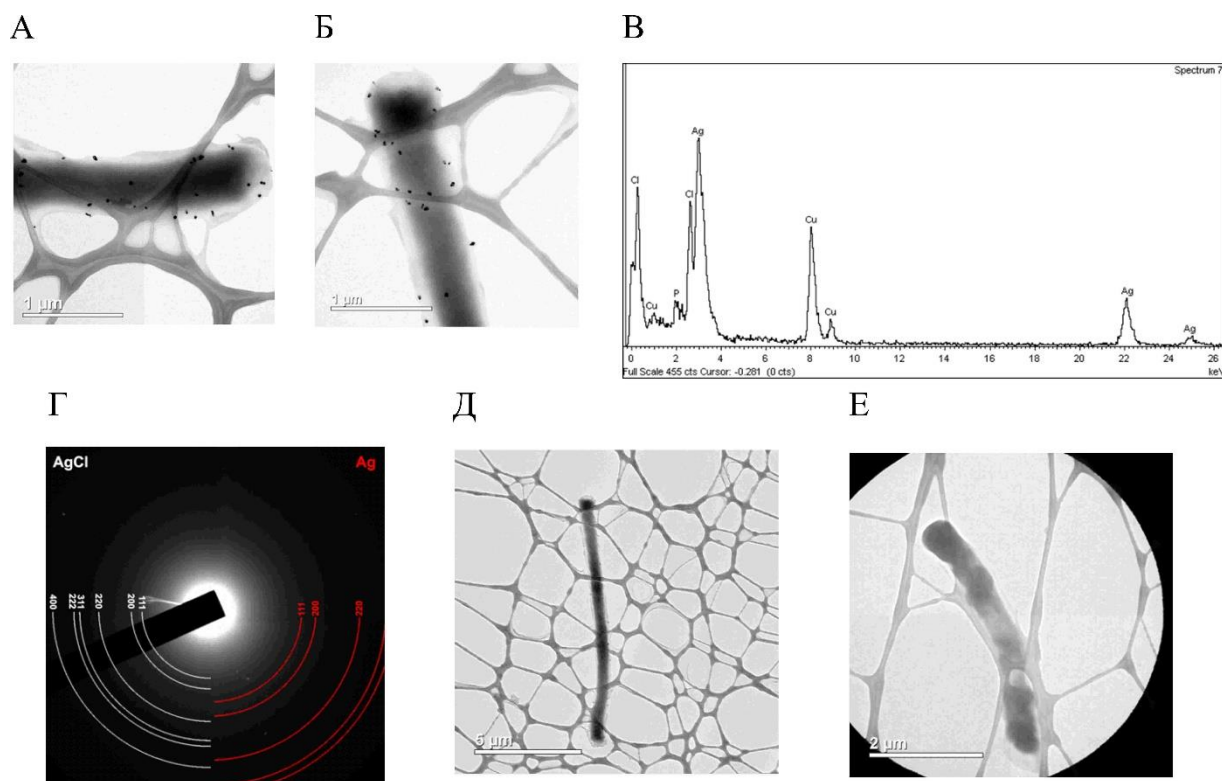


Рисунок 3.17. (А) Характерная морфология бактерий *E. coli*, экспрессирующих GST-NdCTR1, после инкубации в растворе 3 мкМ AgNO_3 , снимок получен на ПЭМ. (В) Энергодисперсионный спектр эмиссии участка бактерии с (А). (Г) Рентгеновская дифрактометрия образований из хлорида серебра (левая половина) или кристаллического серебра (правая половина). (Д) и (Е) обнаруженные бактериальные филаменты.

Только что упомянутые НЧС в последнее время приобретают всё большую популярность. Их используют для диагностики заболеваний, доставки лекарств, покрытия медицинских изделий и как противоопухолевые агенты (*Zhang et al., 2016*). Несмотря на обширное применение НЧС, наибольший интерес к ним вызван их антибактериальными свойствами. НЧС даже рассматривают как один из способов преодоления проблемы распространяющейся антибиотикорезистентности, хотя сам механизм антибактериального действия остаётся не изученным. В нашей работе мы рассмотрели устойчивость штамма *E. coli*, трансформированного рNdCTR1, к сферическим НЧС с диаметром порядка 20

нм, результаты экспериментов приведены на рисунке 3.18. Видно, что НЧС оказывали дозо- и времязависимое угнетение роста бактерий. Так, 10 мкМ концентрация НЧС действовала медленнее по сравнению со 100 мкМ. Важный результат заключается в способности NdCTR1 повышать устойчивость не только к ионам серебра, как описано выше, но и к его наночастицам. И правда, судя по полученным данным, 10 мкМ концентрация НЧС через 24 часа инкубации снижала титр контрольных *E. coli* ниже предела детекции, тогда как в случае штамма, синтезирующего не только GST, но и конъюгированный с ним NdCTR1, концентрация CFU пусть и падала драматически, но детектировалась даже через 2 суток после начала эксперимента.

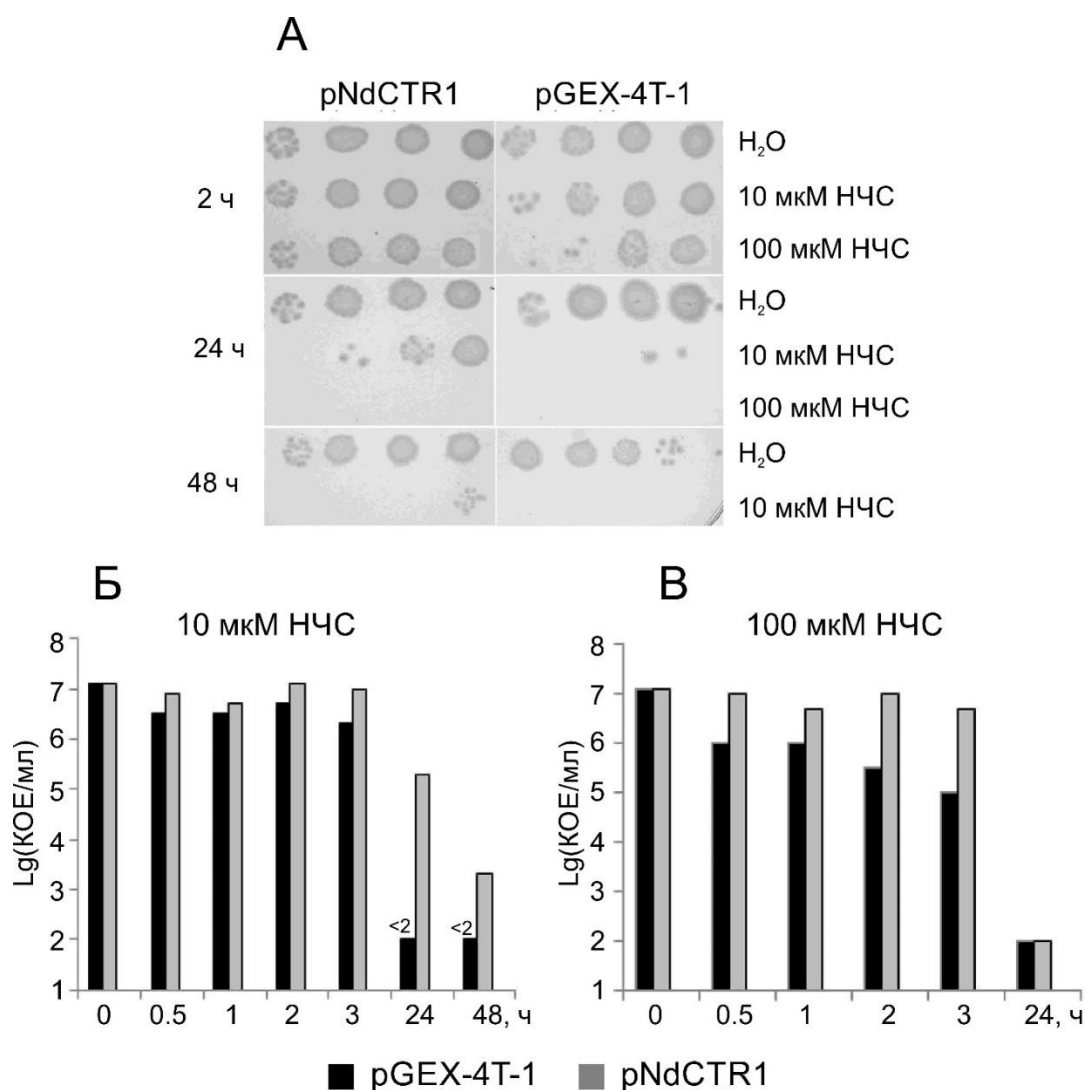


Рисунок 3.18. (А) Титр *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1, после инкубации с НЧС, определенный на чашках Петри. Результаты

экспериментов по инкубации *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 или pNdCTR1 в растворах НЧС концентрации 10 (Б) или 100 (В) мкМ. Ось ординат - десятичный логарифм CFU.

У эукариотических организмов широко наблюдается процесс апоптоза, запрограммированной клеточной гибели, в ходе которого клетки контролируемо самоуничтожаются. Стадии апоптоза, в которые входят высвобождение митохондриальных компонентов, активация неспецифических клеточных цистеиновых протеаз, каспаз, нарушение структуры клеточной мембраны, деградация ДНК и другие хорошо описаны в литературе (*Elmore, 2007*). Самым распространенным методом определения апоптоза служит одновременная окраска Аннексином V, конъюгированным с флюоресцентной молекулой, и йодидом пропидия. Первый связывается с фосфатидилсеринем, который в норме находится на цитозольной стороне мембраны, но на ранней стадии апоптоза оказывается экспонирован наружу, а второй связывается с ДНК клеток, с нарушенной структурой мембраны. Так, в зависимости от набора наблюдаемых флуоресценций можно определить стадию клеточной гибели (*Riccardi & Nicoletti, 2006*).

Сходное явление, названное апоптозо-подобным процессом, не так давно было описано и у прокариотических *E. coli* при массивном повреждении клеточной ДНК (*Erental et al., 2014*). Проточная цитометрия с упомянутыми выше красителями показала, что уже через нескольких минут после начала инкубации *E. coli* в растворе НЧС, повышается количество Аннексин V-положительных бактерий, которое через 4 часа превышает 5% всей популяции (рисунок 3.19-А,Б,В). Уровень клеток с нарушенной проницаемостью клеточной мембраны, судя по флуоресценции йодида пропидия, в течение первых двух часов не отличался у контрольных бактерий и тех, что взаимодействовали с НЧС. Однако и этот показатель через 4 часа после начала инкубации вырос в три раза по сравнению с контрольным условием (рисунок 3.19-А,Б,Г).

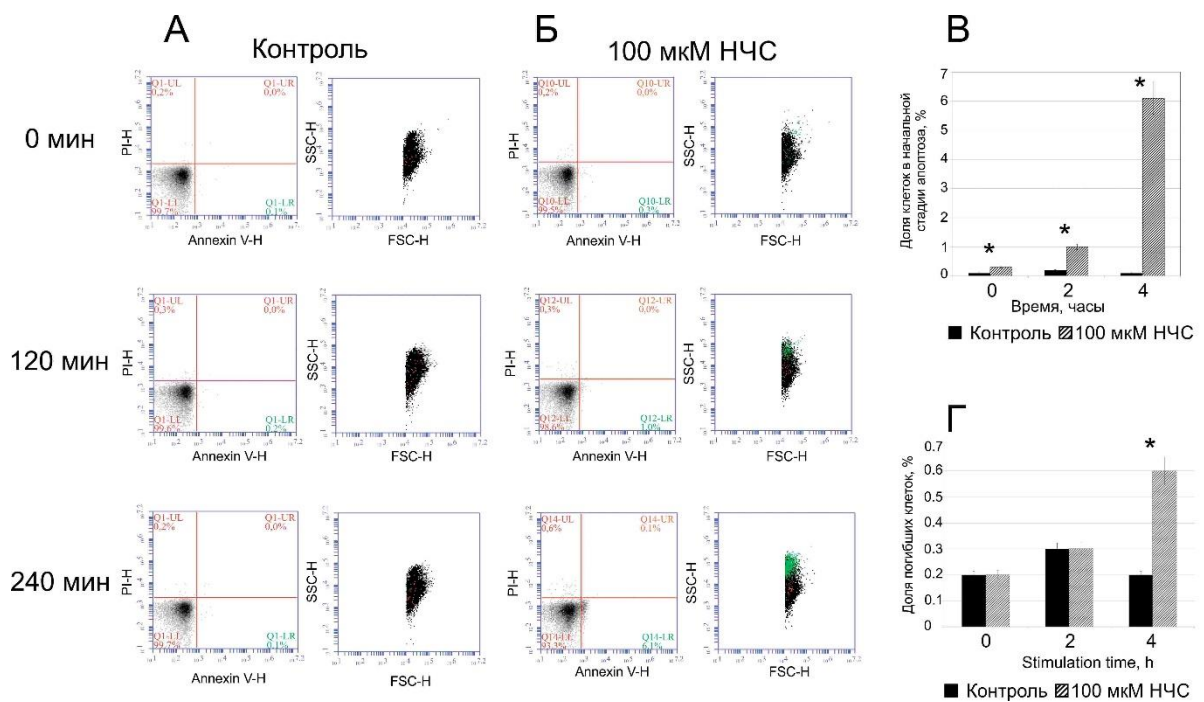


Рисунок 3.19. Результаты проточной цитометрии *E. coli* штамма BL21(DE3) с красителями Аннексин V (ось абсцисс на графиках) и йодид пропидия (ось ординат на графиках) после инкубации в воде (А) или 100 мкМ растворе НЧС (Б). Количество бактерий, находящихся на ранней стадии гибели (В), и уже погибших (Г). Ось ординат на (В) и (Г) - доля клеток с соответствующим флуоресцентным сигналом.

Полученные результаты говорят о том, что механизм антибактериального действия НЧС опосредован главным образом ионами Ag, которые они могут продуцировать в результате попадания в биологическую среду, например, под воздействием окисляющих клеточных акцепторов электрона (НАД⁺ или НАДФ⁺). Сама гибель бактерии идёт по апоптозо-подобному механизму, в ходе которого сначала нарушается асимметрия липидного бислоя, а затем и целостность мембраны.

После инкубации бактерий в 3.5 мкМ растворе ионов Ag(I) в течение нескольких часов их лизировали ультразвуком, после чего разделили белковые экстракты на фракции в зависимости от молекулярной массы белковых компонентов. В полученных фракциях измерили активность GST и концентрацию Ag (рисунок 3.20-А,Б). Максимальные концентрации Ag как в контрольном, так и

в штамме, синтезирующем GST-NdCTR1, обнаружили во фракциях, соответствующих свободному объёму. Это неудивительно, учитывая использование тотальных клеточных лизатов, содержащих большое количество бактериальной ДНК, с азотистыми основаниями которой могут связываться ионы Ag(I) (Swasey *et al.*, 2015).

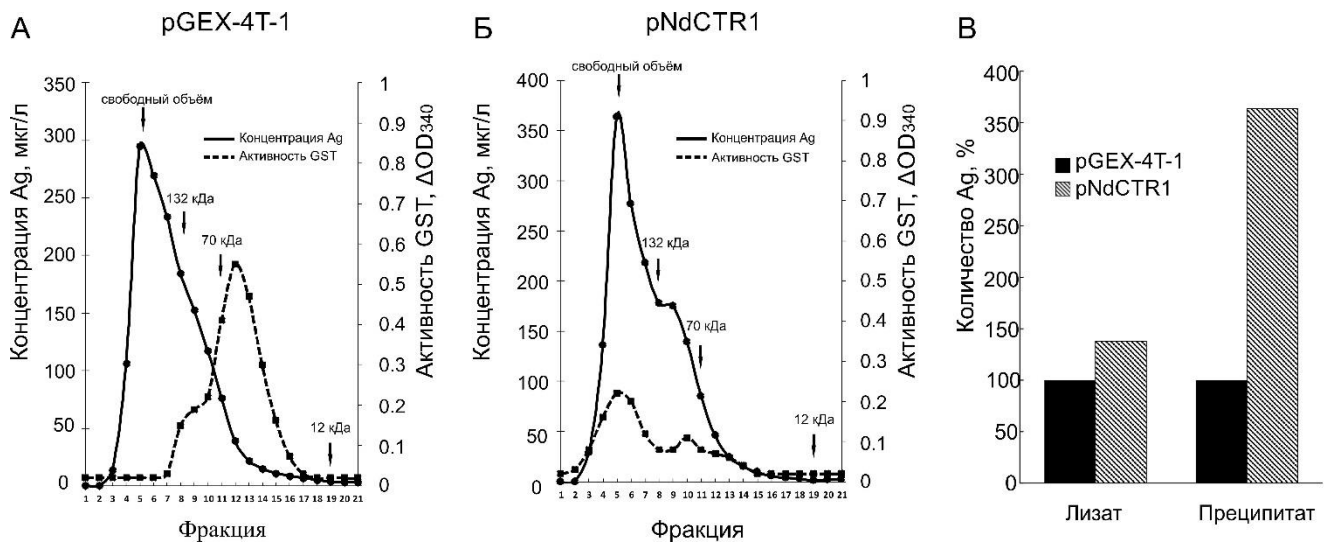


Рисунок 3.20. Концентрация Ag (сплошная линия) и активность GST (прерывистая линия) в хроматографических фракциях гомогенатов *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 (А) или pNdCTR1 (Б) и инкубированных в 3.5 мкМ растворе AgNO₃, после гель фильтрации. (В) Количество Ag в лизатах, разделенных гель фильтрацией на (А) и (Б), и иммунопреципитатах, полученных их инкубацией с антителами ко второму медьсвязывающему домену NdCTR1, а после со вторичными антителами к IgG кролика. Количества Ag представлены как отношение к обнаруженному в контрольном штамме, экспрессирующем GST.

Активность GST распределялась отличным для двух штаммов образом. В гомогенатах *E. coli*, трансформированных pGEX-4T-1 и синтезирующих только GST, максимум глутатион-S-трансферазной активности находился во фракциях, включающих белки с массой немного меньше 70 кДа. GST *S. japonicum*, чей ген встроен в pGEX-4T-1 активна именно в виде димера, поэтому наблюдаемый результат соответствовал ожидаемому (Lim *et al.*, 1994). В случае *E. coli*, производящих GST-NdCTR1, в хроматограмме имелось два пика GST-активности.

Первый из них совпадал со свободным объёмом, а второй, меньший, лежал в районе 70 кДа. Важно отметить, что в *E. coli*, экспрессирующих NdCTR1, фракции, демонстрировавшие наибольшую активность GST и концентрацию Ag были колокализованы, чего не наблюдали у контрольного штамма. Нахождение большей части GST-NdCTR1 в свободном объёме хорошо согласуется с описанной выше (рисунок 3.12) склонностью белка к агрегации. К такому поведению полипептида приводят сразу несколько факторов. Во-первых, это врожденная склонность GST к димеризации, а во-вторых склонность к олигомеризации и NdCTR1, описанная ранее (Tsigelny *et al.*, 2012). Скорее всего именно агрегацией белка можно объяснить сниженную по сравнению с контролем суммарную глутатион-S-трансферазную активность бактерий, синтезирующих GST-NdCTR1. Мультимеризация белков могла повлиять на пространственную укладку полипептидов, а также механически ограничить доступ субстрата к активному центру фермента.

Из тех же гомогенатов, что были разделены гель фильтрацией, иммунопреципитировали GST-NdCTR1. Для этого использовали антитела ко второму медьсвязывающему домену NdCTR1. После инкубации с первичными антителами разветвленные иммунные комплексы образовали с помощью добавления вторичных антител, затем их осадил с помощью центрифугирования. В полученных осадках измерили концентрацию Ag (рисунок 3.20-В). По результатам измерений видно, что количество серебра, связанного преципитатом, полученного из гомогената с GST-NdCTR, более чем в три раза выше, чем из контрольного.

Таким образом, в представленной части работы показана способность NdCTR1 связывать ионы Cu и Ag в *E. coli*. Это утверждение поддерживается несколькими наблюдаемыми фактами. Так, наличие NdCTR1 в *E. coli* снижало их чувствительность как Cu, так и Ag, несмотря на повышенное накопление этих металлов бактериями. В дополнение к этому ионы Ag(I) были ассоциированы с эндогенными белками, масса которых совпадает с ожидаемой для GST-NdCTR1, и

теми, что взаимодействуют с антителами к NdCTR1. Наблюдаемые свидетельства функционирования NdCTR1 в качестве хелатора Cu *in vivo* могут иметь важные последствия для терапии целого ряда заболеваний. Хелаторы меди со второй половины прошлого века применяли для терапии дефектов метаболизма меди, в первую очередь БВ. Их приём помогал связать и вывести излишек токсичных ионов Cu из организма. С течением времени и накоплением знаний как о роли меди в биологических процессах, так и механизмах возникновения и протекания различных патологий, появлялись данные об участии ионов Cu в патогенезе всё большего количества заболеваний. В настоящее время уже признан вклад дисгомеостаза меди в развитие таких нейродегенеративных заболеваний как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (*Rasia et al., 2005; Noda et al., 2013*), а её хелаторы с большим или меньшим успехом применяют в процессе их лечения (*Drew, 2017; Giampietro et al., 2018*). Стратегия ограничения поступления ионов Cu к растущим опухолям - тоже перспективный подход в их терапии (*Babich et al., 2013*). Появляются свидетельства о целесообразности использования хелаторов Cu при сахарном диабете и идиопатическом лёгочном фиброзе (*Baldari et al., 2020*). Существующие хелаторы, справляются со связыванием и выведением Cu из организма, однако, их применение часто сопровождается тяжелыми побочными эффектами, которые выражаются в развитии дефицита биологически доступной меди. NdCTR1 имеет перед ними ряд преимуществ. NdCTR1 - компонент СТМ человека, который находится во внеклеточном пространстве, и поэтому не должен вызвать иммунной реакции. Судя по представленным результатам, он способен хелатировать Cu(II), Cu(I) и Ag(I), к ним может примкнуть цисплатин. При всём этом NdCTR1 не способен попадать внутрь клетки, а значит и экстрагировать медь из внутриклеточных белков. Всё это говорит о перспективности NdCTR1 как специфического хелатора Cu для применения в клинической практике.

3.3. Изучение свойств NdCTR1 *in vitro*

После проведения исследований свойств NdCTR1 в *E. coli* закономерно захотели изучить этот белок в лучше контролируемых условиях *in vitro*. Для этого

растворили тельца включения, содержащие GST-NdCTR1 с помощью высоких концентраций хаотропных агентов (6М мочевины или 8М гуанидин хлорида), но не смогли провести рефолдинг белка, как упомянуто выше. В то же время, хотя первоначально собирались очищать GST-NdCTR1 на колонке с иммобилизованным GSH, это получилось это сделать на сефарозном носителе, заряженном ионами как Ni²⁺, так и Cu²⁺, что объясняется наличием 8 остатков His в 67 аминокислотном NdCTR1. На этапе планирования нового эксперимента внимательно рассмотрели профиль гидрофобности NdCTR1, обнаружив увеличение этого показателя к С-концу белка (рисунок 3.21). Это неудивительно, так как С-концевой участок NdCTR1 находится у самой клеточной мембраны, по определению имеющей липофильные свойства (*Skvortsov et al., 2012*). К этому нужно добавить, что границы самого внеклеточного домена CTR1 определены нечетко, как раз из-за его плавного перехода в трансмембранный участок (*De Feo et al., 2009; Tsigelny et al., 2012*). Тот факт, что последний металлсвязывающий мотив заканчивается до 50 а.о. привёл к решению клонировать первые 55 а.о. белка, исключив последние 12 наиболее гидрофобных аминокислот.

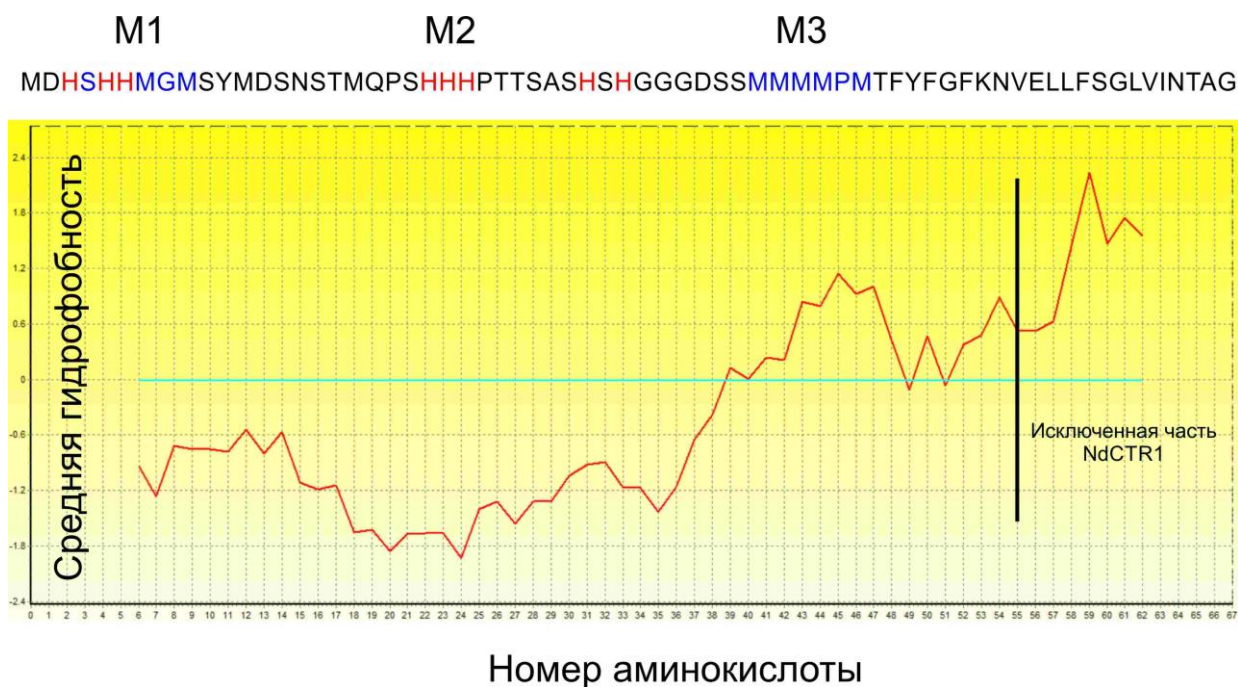


Рисунок 3.21. Профиль гидрофобности NdCTR1 (скользящее среднее по 5 соседним а.о.). Основания, которые должны участвовать в связывании лигандов

маркер молекулярного веса (в), GB1, синтезированный ПЦР с 10-кратным избытком фланкирующих олигонуклеотидов (г), (д) то же самое, но равные количества блоков; ПЦР с использованием первой (е) или второй (ж) пары перекрывающихся блоков. (Б) Карта плазмиды pGB1-NdCTR1.

Синтез GB1-NdCTR1, как и раньше, индуцировали добавлением IPTG. Оптимальными условиями оказались 0.2 мМ концентрация IPTG и инкубация при 25 °С в течение ночи. Оба белка, GB1 и GB1-NdCTR1, оказались хорошо растворимы, так как в большом количестве присутствовали в цитозольной фракции бактериального лизата (рисунок 3.23-А). После протеолиза GB1-NdCTR1 тромбином в первоначальном растворе белка образовывалось две дополнительные полипептидные зоны, имевшие мобильность чуть больше и чуть меньше, чем у 10 кДа белкового стандарта (рисунок 3.23-Б). Менее подвижная зона окрашивалась коммерческими антителами к NdCTR1 в составе CTR1 (рисунок 3.23-В). Наблюдаемая в ПААГ аномальная электрофоретическая подвижность продуктов протеолиза GB1-NdCTR1 (теоретически рассчитанная молекулярная масса NdCTR1 - около 6.5 кДа; рисунок 3.23-А,Б,В) не позволила достоверно идентифицировать GB1 и NdCTR1. Для этой цели применили метод времяпролётной масс-спектрометрии, спектры белковых зон приведены на рисунках 3.23-Г,Д,Е.

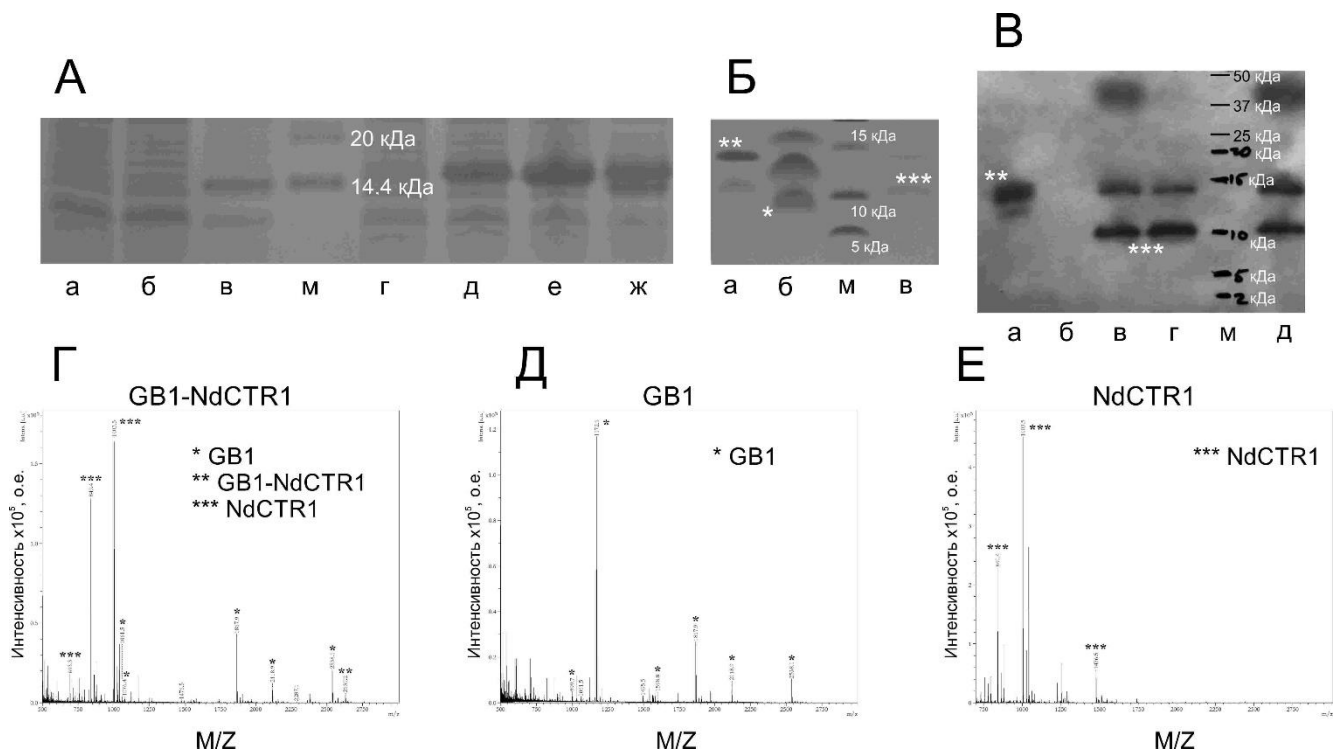


Рисунок 3.23. (А) Электрофоретическое разделение в ПААГ: грубый клеточный экстракт *E. coli*, экспрессирующий GB1, после индукции IPTG в течение 1 часа (а), 3 часов (б) при комнатной температуре и его растворимая фракция (в); грубый клеточный экстракт неиндуцированных (г) *E. coli*, трансформированных рGB1-NdCTR1, индуцированных в течение 1 (д) или 3 (е) часов при комнатной температуре и растворимая фракция лизата (ж). (Б) Электрофоретическое разделение: элюат с Ni²⁺-заряженной колонки 200 мМ имидазолом (а), «проскок» с Ni²⁺-заряженной колонки после обработки (а) тромбином (б), смыв 200 мМ имидазолом белков, сорбированных на колонке после нанесения на неё гидролизата (а) тромбином. (В) Иммуноблоттинг ПААГ с коммерческими антителами к NdCTR1: Б-а (а), Б-б (б), Б-в (в), (г) - то же, что и Б-в, но смыв 500 мМ имидазолом. (М) - маркер молекулярных весов. Масс-спектры белковых зон, которые по массе соответствуют GB1-NdCTR1 (Г), GB1 (Д) и NdCTR1 (Е). Набором символов «*» на (Г), (Д) и (Е) обозначены фрагменты, принадлежащие соответствующим белкам, так же обозначены бенды этих белков на (Б) и (В).

Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что NdCTR1 в ПААГ демонстрирует аномальную электрофоретическую подвижность с показателем в районе 10-12 кДа и образует в нём агрегаты определенной молекулярной массы,

значение которой лежит в интервале от 37 до 50 кДа. Важной деталью служит тот факт, что исключительно GB1-NdCTR1 таких структур не образовывал, из чего следует необходимость свободного NdCTR1 для их образования. Совокупность приведённых в работе данных говорит о высокой склонности NdCTR1 к образованию агрегатов, даже без гидрофобного участка, начинающегося после 55 а.о. Это наблюдение говорит в пользу предположения о наличии у NdCTR1 роли в олигомеризации CTR1 в клеточной мембране, которая ранее приписывалась его трансмембранным доменам (*De Feo et al., 2009*). Единственным неучтенным в работе фактором, который ограничивает универсальность сделанных выводов, остаётся отсутствие у рекомбинантного NdCTR1 гликозилирования, тогда как две модификации этого типа наблюдаются у NdCTR1 в организме человека. Гликозилирование, как известно, может повышать растворимость белков (*Solá & Griebenow, 2009*). Кроме того, в данном конкретном случае гликановые цепи могут отвечать за «жесткость» внеклеточной «ловушки», образующейся при тримеризации CTR1, или участвовать в процессе связывания ионов Cu, а могут быть вовлечены в оба процесса одновременно. Для ответа на упомянутые вопросы необходимы эксперименты с рекомбинантным NdCTR1, синтезированным эукариотическими клетками, которые смогут обеспечить его правильное гликозилирование.

Как ни странно, на этот раз мы не обнаружили у *E. coli*, синтезировавших GB1-NdCTR1, повышенной устойчивости к ионам Cu или Ag по сравнению с контрольными бактериями, продуцирующими GB1 (данные не приведены). Точно так же между штаммами не было различий в способности накапливать эти ионы. В то же время GB1-NdCTR1 удалось очистить на сефарозном носителе, заряженном Ni²⁺ или Cu²⁺, тогда как GB1 с ним не взаимодействовал, не задерживаясь на колонке.

Из-за высокой склонности свободного NdCTR1 к агрегации решили ограничить эксперименты *in vitro* белком GB1-NdCTR1, так как отсутствие взаимодействия свободного GB1 с Ni²⁺ и Cu²⁺, упомянутое выше,

легитимизировало такой подход. На следующем этапе изучения свойств GB1-NdCTR1 решили рассмотреть его взаимодействие с ионами Cu(II) и Ag(I) методом UV/vis-спектроскопии. Некоторые спектры, полученные в опытах с Cu и анализ результатов представлены на рисунке 3.24. В качестве белка сравнения выбрали хорошо растворимый белок - бычий сывороточный альбумин (BSA), для которого известно связывание и с Cu(II), и с Ag(I) (Zhang & Wilcox, 2002; Zhao et al., 2011).

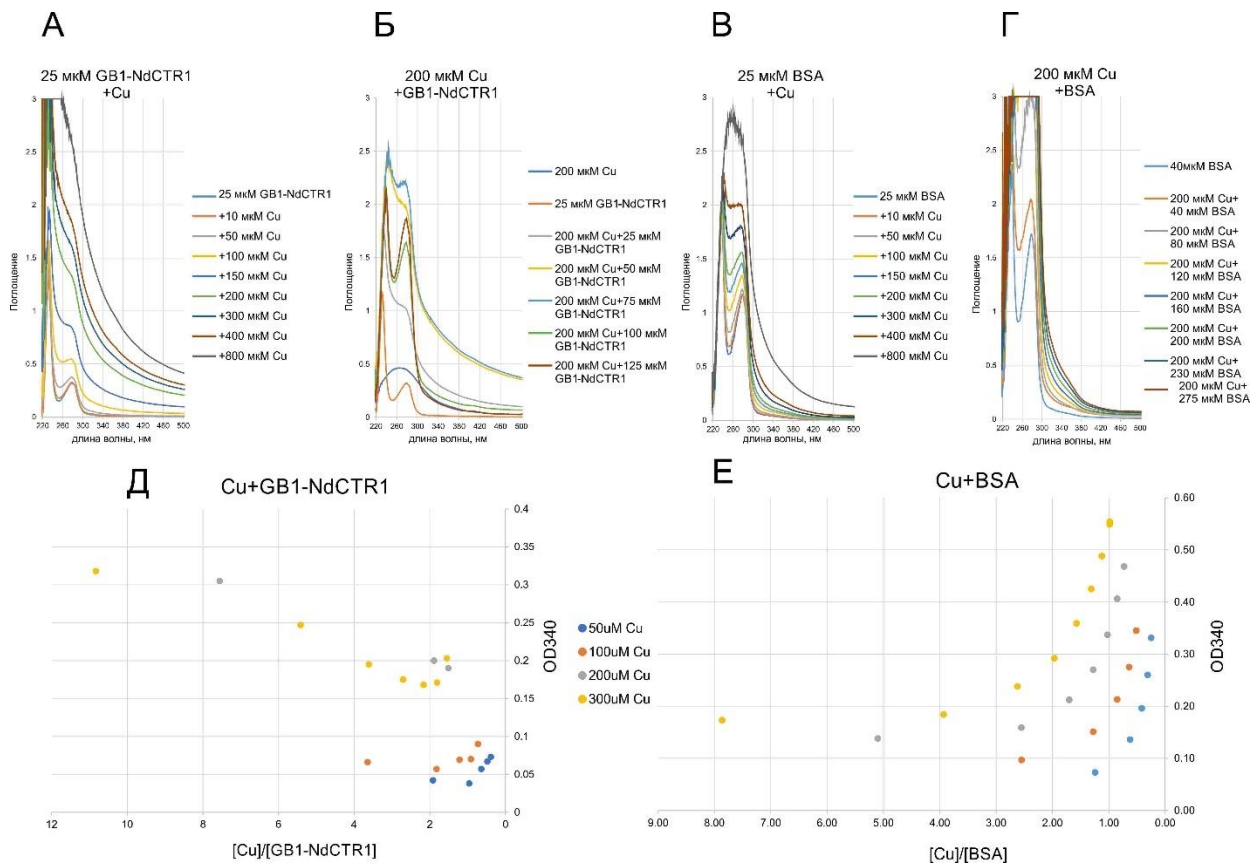


Рисунок 3.24. (А) Спектры 25 μM GB1-NdCTR1 при добавлении различных концентраций Cu. (Б) Спектры 200 μM Cu при добавлении различных концентраций GB1-NdCTR1. (В) Спектры 25 μM BSA при добавлении различных концентраций Cu. (Г) Спектры 200 μM Cu при добавлении различных концентраций BSA. (Д) Зависимость оптической плотности раствора на длине волны 340 нм, содержащего смесь Cu и GB1-NdCTR1, от отношения молярных концентраций компонентов. (Е) То же, что и (Д), но для BSA и Cu. Ось абсцисс инвертирована так, чтобы движение слева направо соответствовало ходу эксперимента.

Видно, что повышение концентрации ионов Cu влечет за собой рост оптической плотности раствора в области длин волн свыше 300 нм (рисунок 3.24-А,В), где поглощение электромагнитного излучения боковыми цепями а.о. стремится к нулю. Судя по всему, наблюдаемый эффект связан не с поглощением, а рассеянием электромагнитных волн белковыми агрегатами. Таким образом, ионы Cu вызывают агрегацию как GB1-NdCTR1, так и BSA. Нужно отметить, что в случае GB1-NdCTR1 этот эффект, который численно характеризовали с помощью показателя оптической плотности при длине волны излучения 340 нм (OD340) был гораздо более выраженным, чем для BSA.

К интересным наблюдениям привели эксперименты по титрованию растворов Cu постоянной концентрации белками BSA и GB1-NdCTR1 (рисунок 3.24-Б,Г). Для BSA наблюдали монотонное увеличение OD340 при росте его концентрации, тогда как для GB1-NdCTR1 эффект был иным. Вначале, пока ионы Cu присутствовали в 5-10-кратном избытке по отношению к GB1-NdCTR1, детектировали драматическое увеличение оптической плотности, сопровождавшееся потерей характерных для белкового спектра особенностей (в первую очередь пик поглощения на 280 нм). При снижении показателя $[Cu(II)]/[GB1-NdCTR1]$ в ходе увеличения концентрации белка, мы наблюдали снижение и оптической плотности, ассоциированное с приобретением спектром особенностей типичных для белкового раствора. При этом эффект имел тенденцию развиваться во времени: при сравнении спектров, взятых сразу после повышения концентрации GB1-NdCTR1 и через 10 минут после этого, было замечено уменьшение оптической плотности раствора в длинноволновой области >300 нм (данные не представлены). Эти результаты подтверждены экспериментами с рядом концентраций Cu (рисунок 3.24-Д,Е). Из графиков видно, что при высоких показателях $[Cu(II)]/[GB1-NdCTR1]$ наблюдается образование белковых агрегатов GB1-NdCTR1, тогда как его снижение влечет за собой их разборку. Таким образом, можно сделать вывод об обратимости агрегации GB1-NdCTR1 под воздействием ионов Cu. Это наблюдение имеет большое значение в контексте исследования механизмов связывания ионов Cu белком NdCTR1 и говорит о том, что, возможно,

захват Cu из внеклеточного пространства вызывает ассоциацию этих доменов, принадлежащих разным SE тримера. В такой структуре ионы Cu служат скрепляющим элементом, который стабилизирует обычно неорганизованные N-концевые домены и способствует транспорту ионов в клетку.

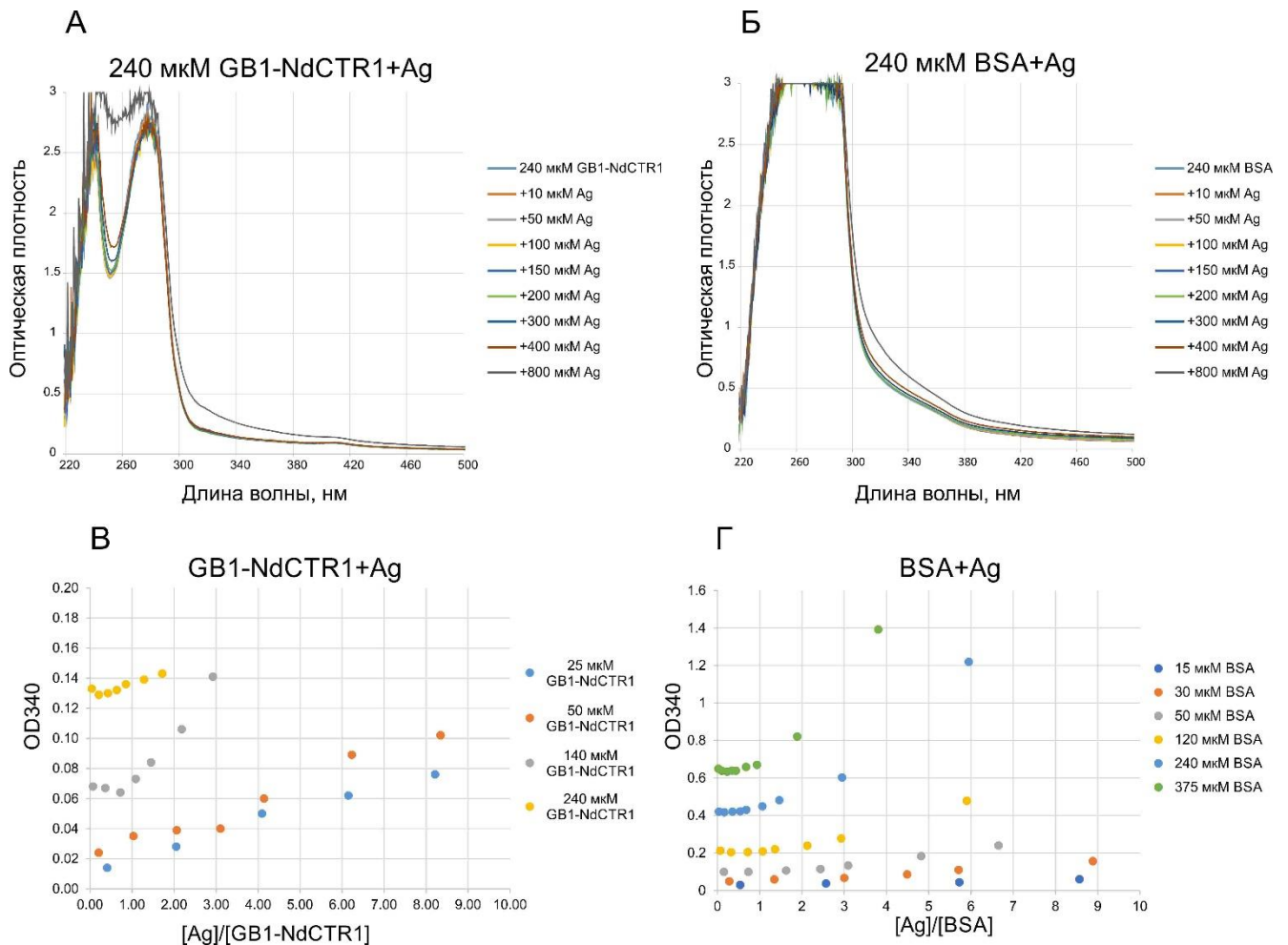


Рисунок 3.25. (А) Спектры 240 мкМ GB1-NdCTR1 при добавлении Ag. (Б) Спектры 240 мкМ BSA при добавлении Ag. (В) Зависимость оптической плотности раствора, содержащего смесь Cu и GB1-NdCTR1, на длине волны 340 нм от отношения молярных концентраций компонентов. (Г) То же, что и (В), но для BSA и Cu.

Примеры спектров растворов GB1-NdCTR1 или BSA с Ag(I), как и зависимость показателя агрегации белка - OD340 от соотношения концентраций компонентов, приведены на рисунке 3.25. По представленным данным видно, что влияние Ag(I) на белки отличается от эффекта, оказываемого Cu(II). Так, ионы

Ag(I) в гораздо меньшей степени провоцировали олигомеризацию полипептидов, что особенно хорошо заметно для GB1-NdCTR1 (рисунок 3.25). Для обоих белков при относительных низких значениях концентрации Ag(I) наблюдали почти неизменное значение OD₃₄₀. Характер зависимости изменялся в районе эквимольного состава смеси, что может отражать связывание обоими белками Ag(I) в соотношении 1:1. Из проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что взаимодействие NdCTR1, обеспечивающее его мультимеризацию в составе тримера, происходит через ионы Cu(II), а не Cu(I)

Для получения численных параметров связывания ионов Cu(II) с GB1-NdCTR1 применили метод изотермической калориметрии титрования (рисунок 3.26). Результаты наглядно свидетельствуют о трехступенчатом протекании процесса связывания иона Cu(II) с полипептидом. Рассмотрение каждой стадии взаимодействия с помощью модели независимого связывания позволило определить константы диссоциации (K_d) образованных на всех этапах реакции комплексов. Полученные значения K_d лежали в пределах 50-100 нМ для первых двух и порядка 10 нМ для финальной стадии, что говорит о сильном связывании компонентов. На протяжении всего процесса наблюдался существенный рост энтропии системы, сопровождающийся небольшим увеличением её энтальпии. Преобладание энтропийной составляющей говорит о протекании взаимодействия под действием энтропийных сил, под которыми чаще всего подразумеваются гидрофобные взаимодействия (*O'Brien et al., 2017*). Конечный образованный комплекс состоял из четырех полипептидных цепей, координирующих один ион Cu (стехиометрия 4:1).

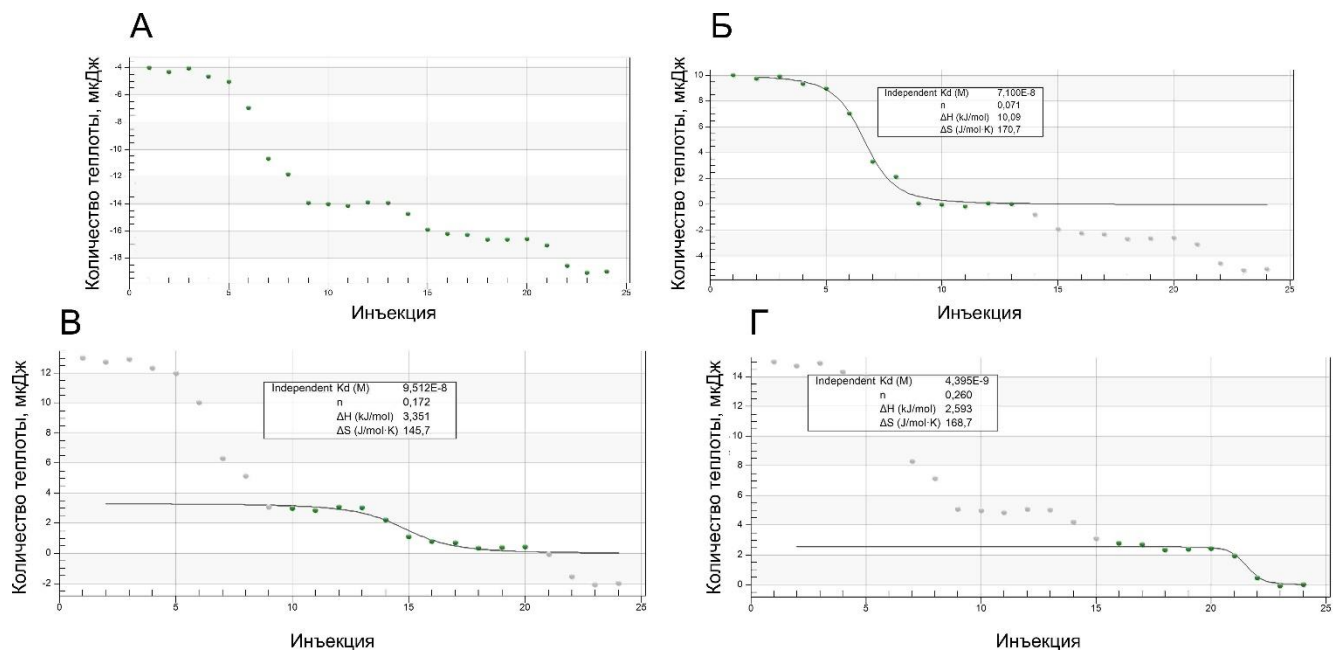


Рисунок 3.26. (А) Термограмма титрования 90 мкМ раствора GB1-NdCTR1 ионами Cu. Оценка параметров связывания по первой (Б), второй (В) и третьей (Г) ступени процесса с помощью модели независимого связывания.

Тем же методом изучили взаимодействие GB1-NdCTR1 с ионами Ag(I) (рисунок 3.27). Связывание Ag(I) протекало в три стадии, так же как и в случае взаимодействия GB1-NdCTR1 с Cu(II). Оба процесса имеют эндотермическую природу. В целом картины, полученные для двух видов ионов, несильно отличались друг от друга: то же количество этапов, схожая стехиометрия и энтропийная направленность. Стоит отметить, несколько менее сильное связывание ионов Ag(I), для которых наблюдали чуть более высокие значения Kd, лежащие в районе 20 нМ для последнего комплекса.

На протяжении всего исследования свойств NdCTR1 на передний план выходила его склонность к агрегации, образованию гидрофобных связей между полипептидными цепями. Совокупность экспериментальных данных, полученных разными методами, позволяет предположить существенный вклад этих сил в укладку транспортера в мембране и процесс связывания ионов Cu с последующим их транспортом через клеточную мембрану.

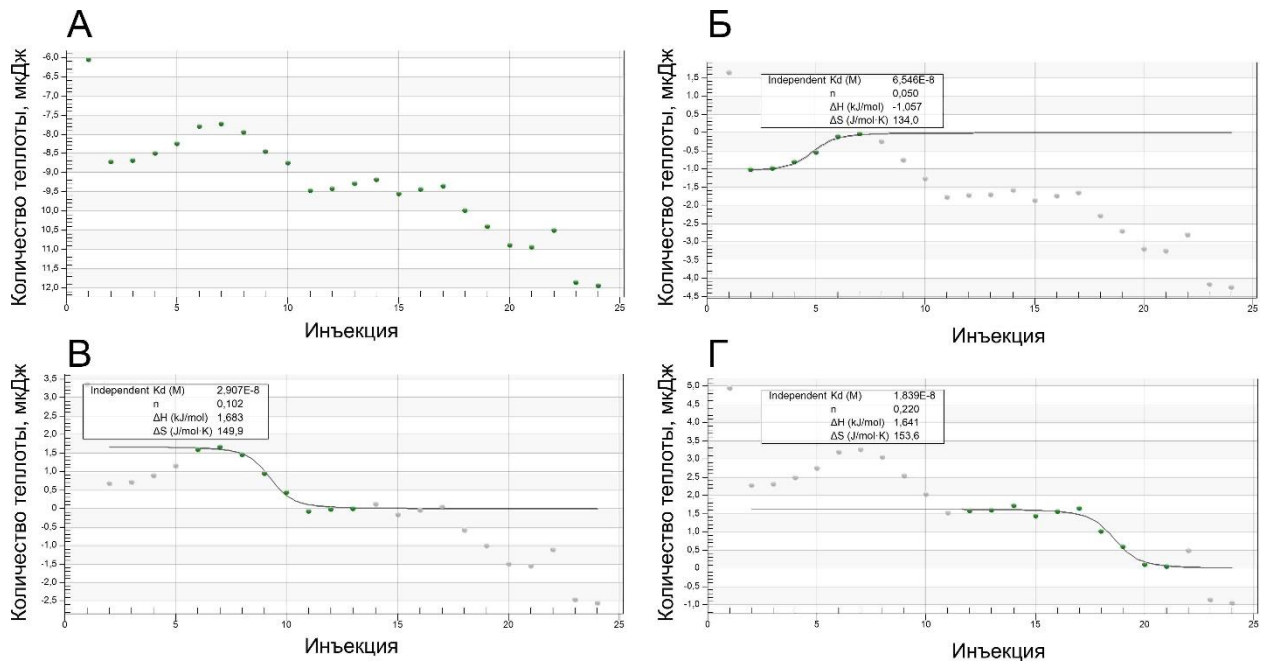


Рисунок 3.27. (А) Термограмма титрования 90 мкМ раствора GB1-NdCTR1 ионами Ag. Оценка параметров связывания по первой (Б), второй (В) и третьей (Г) ступени процесса с помощью модели независимого связывания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа лежит в области изучения клеточного импорта меди. Исследование состоит из двух частей: изучение функций двух описанных на данный момент транспортеров меди CTR1 и DMT1 человека на клеточном уровне и изучение свойств N-концевого домена CTR1. Работа проведена на клеточной линии человека H1299, бактериях *E. coli* и очищенном белковом препарате GB1-NdCTR1.

Показано, что CTR1 и DMT1 транспортируют ионы Cu и проявляют по отношению друг к другу компенсаторные функции. Наличие в клетке ионов Cu даже при нокауте обоих транспортеров свидетельствует о существовании еще неоткрытых импортеров Cu в клетку. Выявлены различия в специфичности CTR1 и DMT1 к переносимым ионам: так, CTR1 импортирует Cu(I), тогда как DMT1 в большей степени Cu(II). Полученные данные не свидетельствуют в пользу теории, в рамках которой разные транспортеры переносят ионы Cu для «каталитического» и «регуляторного» пулов меди, но тем не менее говорят о их поступлении в различные метаболические пути через них. Это значит, что CTR1 и DMT1 не полностью дублируют работу друг друга и имеют различающиеся функции внутри клетки. Важный с практической точки зрения результат заключается в повышенной при нокауте CTR1 резистентности клеток немелкоклеточной карциномы лёгкого к ряду агентов, используемых в противоопухолевой терапии.

Как в *E. coli*, так и *in vitro*, удалось показать способность NdCTR1 связывать ионы Cu, что говорит в пользу современной концепции, в которой этот домен играет роль внеклеточного акцептора меди. Определенные константы диссоциации комплекса NdCTR1 с ионами Cu(II) и Ag(I) имеют значения порядка 10 нМ, а в состав образованного комплекса входили 4 молекулы белка на 1 ион металла. Склонность NdCTR1 к олигомеризации и зависимость этого явления от присутствия и концентрации ионов металла, свидетельствуют об участии эктодомена, наряду с трансмембранными участками белка, в процессе сборки и функционирования тримеров CTR1 в плазматической мембране.

Результаты работы приносят новые знания в область исследования метаболизма меди, освещая ранее неизвестные аспекты функционирования импортеров меди в клетку. Полученные сведения важны не только с точки зрения фундаментальной науки, но и в терапии ряда заболеваний, связанных с дисгомеостазом меди, а также злокачественных новообразований.

ВЫВОДЫ

1. В клетках H1299 транспортеры CTR1 и DMT1 проявляют по отношению друг к другу компенсаторные функции. CTR1 переносит Cu(I), тогда как DMT1 импортирует Cu(II) в большей степени чем Cu(I).
2. Ядро и митохондрии имеют наивысшую потребность в меди среди клеточных органелл, тогда как цитоплазма содержит лабильный пул этого металла.
3. Дифференциальная экспрессия медь-зависимых генов при нокаутах CTR1 и DMT1 свидетельствует о том, что они не взаимозаменяемы.
4. NdCTR1 обладает способностью олигомеризоваться и хелатировать Cu(II) и Ag(I) в *E. coli* и *in vitro*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ATOX1 – антиоксидантный белок 1
АТР7А/В – Cu-транспортная АТФ-аза Р-типа Менкеса (А) или Вильсона (В)
BSA – бычий сывороточный альбумин
CCS –Cu-шаперон для SOD1
CFU – колониеобразующие единицы
COX – цитохром с-оксидаза
CTR1 – высокоаффинный селективный транспортер меди в клетку 1
CTR1 КО – клеточная линия с нокаутом CTR1
CTR2 – низкоаффинный селективный транспортер меди 2
Cys – цистеин
DBH – дофамин-β-гидроксилаза
DKO – клеточная линия с одновременным нокаутом CTR1 и DMT1
DMT1 – транспортер дивалентных катионов 1
DMT1 КО – клеточная линия с нокаутом DMT1
FIIa – тромбин
GB1 – В1 домен иммуноглобулин-связывающего белка G стрептококка
Glu – глутаминовая кислота
GSH – глутатион
GST – глутатион-S-трансфераза
HIF1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1
His – гистидин
IMAC – металл-аффинная хроматография
IPTG – изопропил-β-D-галактопиранозид
Kd – константа диссоциации
LOX – лизилоксидаза
MBD – металл-связывающий домен
Met – метионин
MT – металлотионеин
NdCTR1 – N-концевой домен CTR1
NF-κB – ядерный фактор κB
РАМ – пептидил-глицин α-амидирующая монооксигеназа
RFP – красный флуоресцентный белок
SOD – супероксиддисмутаза
XIAP – X-сцепленный ингибитор апоптоза
ZF – домен «цинковый палец»
ZFP – белок с ZF
АГ – аппарат Гольджи
АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активные формы кислорода
БВ – болезнь Вильсона
ВКМ – внутриклеточные мембраны
СЕ – субъединица
СТМ – система транспорта меди

ММГБ – мультимедные голубые белки
ММО – мультимедные оксидазы
ММП – межмембранное пространство митохондрий
НЧС – наночастицы серебра
ОТ – обратная транскрипция
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ЭП – электронно-парамагнитный
ЦП – церулоплазмин

СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ackerman C.M., Chang C.J. Copper signaling in the brain and beyond // *Journal of Biological Chemistry*. 2018; 293(13): 4628–4635.
2. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond // *Nature Communications*. 2018; 9(1): 1911.
3. Alda J.O., Garay R. Chloride (or bicarbonate)-dependent copper uptake through the anion exchanger in human red blood cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1990; 259(4): C570–C576.
4. Amaravadi R., Glerum D.M., Tzagoloff A. Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment // *Human Genetics*. 1997; 99(3): 329–333.
5. Antonyuk S. V., Strange R.W., Marklund S.L. et al. The Structure of Human Extracellular Copper-Zinc Superoxide Dismutase at 1.7 Å Resolution: Insights into Heparin and Collagen Binding // *Journal of Molecular Biology*. 2009; 388(2): 310–326.
6. Arredondo M., Mendiburo M.J., Flores S. et al. Mouse divalent metal transporter 1 is a copper transporter in HEK293 cells // *BioMetals*. 2014; 27(1): 115–123.
7. Arredondo M., Muñoz P., Mura C. V. et al. DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2003; 284(6 53-6): 1525–1530.
8. Ashino T., Kohno T., Sudhahar V. et al. Copper transporter ATP7A interacts with IQGAP1, a Rac1 binding scaffolding protein: Role in PDGF-induced VSMC migration and vascular remodeling // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2018; 315(6): C850–C862.
9. Ashino T., Sudhahar V., Urao N. et al. Unexpected role of the copper transporter ATP7A in PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration // *Circulation Research*. 2010; 107(6): 787–799.
10. Assaf S.Y., Chung S.H. Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity // *Nature*. 1984; 308(5961): 734–736.
11. Audi G., Bersillon O., Blachot J. et al. The Nubase evaluation of nuclear and decay

- properties // *Nuclear Physics A*. 2003; 729(1): 3–128.
12. Babich P.S., Skvortsov A.N., Rusconi P. et al. Non-hepatic tumors change the activity of genes encoding copper trafficking proteins in the liver // *Cancer Biology and Therapy*. 2013; 14(7): 614–624.
 13. Baker Z.N., Cobine P.A., Leary S.C. The mitochondrion: A central architect of copper homeostasis // *Metallomics*. 2017; 9(11): 1501–1512.
 14. Baldari S., Di Rocco G., Toietta G. Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(3): 1069.
 15. Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S. et al. Affinity gradients drive copper to cellular destinations // *Nature*. 2010; 465(7298): 645–648.
 16. Bao W.J., Gao Y.G., Chang Y.G. et al. Highly efficient expression and purification system of small-size protein domains in *Escherichia coli* for biochemical characterization // *Protein Expression and Purification*. 2006; 47(2): 599–606.
 17. Barnes N., Bartee M.Y., Braiterman L. et al. Cell-Specific Trafficking Suggests a new role for Renal ATP7B in the Intracellular Copper Storage // *Traffic*. 2009; 10(6): 767–779.
 18. Beaino W., Guo Y., Chang A.J. et al. Roles of Atox1 and p53 in the trafficking of copper-64 to tumor cell nuclei: Implications for cancer therapy // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2014; 19(3): 427–438.
 19. Van Den Berghe P.V.E., Folmer D.E., Malingré H.E.M. et al. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake // *Biochemical Journal*. 2007; 407(1): 49–59.
 20. Bergmans H.E., van Die I.M., Hoekstra W.P. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. // *Journal of Bacteriology*. 1981; 146(2): 564–570.
 21. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. // *Journal of bacteriology*. 1951; 62(3): 293–300.
 22. Bertinato J., Cheung L., Hoque R. et al. Ctr1 transports silver into mammalian cells // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2010; 24(3): 178–184.
 23. Bertinato J., Swist E., Plouffe L.J. et al. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells // *Biochemical Journal*.

- 2008; 409(3): 731–740.
24. De Bie P., Muller P., Wijmenga C. et al. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: Correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes // *Journal of Medical Genetics*. 2007; 44(11): 673–688.
25. Bielli P., Calabrese L. Structure to function relationships in ceruloplasmin: A ‘moonlighting’ protein // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002; 59(9): 1413–1427.
26. Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA // in *Methods in Enzymology*. 1983; 243–255.
27. Bisaglia M., Bubacco L. Copper ions and Parkinson’s disease: Why is homeostasis so relevant? // *Biomolecules*. 2020; 10(2).
28. Blair B.G., Larson C.A., Adams P.L. et al. Copper Transporter 2 Regulates Endocytosis and Controls Tumor Growth and Sensitivity to Cisplatin In Vivo // *Molecular Pharmacology*. 2011; 79(1): 157–166.
29. Bompiani K.M., Tsai C.Y., Achatz F.P. et al. Copper transporters and chaperones CTR1, CTR2, ATOX1, and CCS as determinants of cisplatin sensitivity // *Metallomics*. 2016; 8(9): 951–962.
30. Brady D.C., Crowe M.S., Turski M.L. et al. Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis // *Nature*. 2014; 509(7501): 492–496.
31. Brady G.F., Galbán S., Liu X. et al. Regulation of the Copper Chaperone CCS by XIAP-Mediated Ubiquitination // *Molecular and Cellular Biology*. 2010; 30(8): 1923–1936.
32. Brose J., La Fontaine S., Wedd A.G. et al. Redox sulfur chemistry of the copper chaperone Atox1 is regulated by the enzyme glutaredoxin 1, the reduction potential of the glutathione couple GSSG/2GSH and the availability of Cu(i) // *Metallomics*. 2014; 6(4): 793–808.
33. Bunton T.E., Baksi S.M., George S.G. et al. Abnormal Hepatic Copper Storage in a Teleost Fish (*Morone americana*) // *Veterinary Pathology*. 1987; 24(6): 515–524.
34. Calvo J., Jung H., Meloni G. Copper metallothioneins // *IUBMB Life*. 2017; 69(4): 236–245.

35. Camire R.M., Bos M.H.A. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 7(12): 1951–1961.
36. Caruano-Yzermans A.L., Bartnikas T.B., Gitlin J.D. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase // *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(19): 13581–13587.
37. Casali N. *Escherichia coli* Host Strains // in *E. coli Plasmid Vectors*. 2003. New Jersey: Humana Press; 27–48.
38. Cassandri M., Smirnov A., Novelli F. et al. Zinc-finger proteins in health and disease // *Cell Death Discovery*. 2017; 3(1): 17071.
39. Chan D.A., Sutphin P.D., Nguyen P. et al. Targeting GLUT1 and the Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma by Chemical Synthetic Lethality // *Science Translational Medicine*. 2011; 3(94): 94ra70-94ra70.
40. Chen S.-N., Fang T., Kong J.-Y. et al. Third BIR domain of XIAP binds to both Cu(II) and Cu(I) in multiple sites and with diverse affinities characterized at atomic resolution // *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 7428.
41. Clifford R.J., Maryon E.B., Kaplan J.H. Dynamic internalization and recycling of a metal ion transporter: Cu homeostasis and CTR1, the human Cu⁺ uptake system // *Journal of Cell Science*. 2016; 129(8): 1711–1721.
42. Coaglio A.L., Ferreira M.A.N.D., Dos Santos Lima W. et al. Identification of a phenoloxidase- and melanin-dependent defence mechanism in *Achatina fulica* infected with *Angiostrongylus vasorum* // *Parasites and Vectors*. 2018; 11(1): 1–8.
43. Cobine P.A., Moore S.A., Leary S.C. Getting out what you put in: Copper in mitochondria and its impacts on human disease // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2021; 1868(1): 118867.
44. Cobine P.A., Pierrel F., Bestwick M.L. et al. Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase // *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(48): 36552–36559.
45. Cotton F.A., Wilkinson G. 21-H. Copper // *Practical Inorganic Chemistry*. 1980; 798–822.
46. Crampton R.F., Matthews D.M., Poisner R. Observations on the mechanism of

- absorption of copper by the small intestine // *The Journal of Physiology*. 1965; 178(1): 111–126.
47. Dancis A., Yuan D.S., Haile D. et al. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport // *Cell*. 1994; 76(2): 393–402.
48. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer // *Nature*. 2002; 417(6892): 949–954.
49. Denoyer D., Masaldan S., La Fontaine S. et al. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’ // *Metallomics*. 2015; 7(11): 1459–1476.
50. Dikalov S.I., Vitek M.P., Mason R.P. Cupric-amyloid β peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radical // *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 340–347.
51. Dodani S.C., Firl A., Chan J. et al. Copper is an endogenous modulator of neural circuit spontaneous activity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(46): 16280–16285.
52. Doku R.T., Park G., Wheeler K.E. et al. Spectroscopic characterization of copper(I) binding to apo and metal-reconstituted zinc finger peptides // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2013; 18(6): 669–678.
53. Dong G., Chen H., Qi M. et al. Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions (Review) // *Molecular Medicine Reports*. 2015; 11(3): 1582–1586.
54. Drew S.C. The Case for Abandoning Therapeutic Chelation of Copper Ions in Alzheimer’s Disease. // *Frontiers in neuroscience*. 2017; 11(JUN): 317.
55. Du X., Li H., Wang X. et al. Kinetics and thermodynamics of metal binding to the N-terminus of a human copper transporter, hCTR1 // *Chemical Communications*. 2013; 49(80): 9134–9136.
56. Duan X., Peng D., Zhang Y. et al. Sub-cytotoxic concentrations of ionic silver promote the proliferation of human keratinocytes by inducing the production of reactive oxygen species // *Frontiers of Medicine*. 2018; 12(3): 289–300.
57. Dziegiel P., Pula B., Kobierzycki C. et al. Metallothioneins: Structure and

- Functions // in *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*. 2016; 3–20.
58. Eckers A., Reimann K., Klotz L.O. Nickel and copper ion-induced stress signaling in human hepatoma cells: Analysis of phosphoinositide 3'-kinase/Akt signaling // *BioMetals*. 2009; 22(2): 307–316.
59. Eisses J.F., Kaplan J.H. Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. // *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(32): 29162–29171.
60. Eisses J.F., Kaplan J.H. The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1: A mutational analysis // *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(44): 37159–37168.
61. Ejaz H.W., Wang W., Lang M. Copper toxicity links to pathogenesis of alzheimer's disease and therapeutics approaches // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(20): 1–33.
62. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicologic Pathology*. 2007; 35(4): 495–516.
63. Erental A., Kalderon Z., Saada A. et al. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. // *mBio*. 2014. Edited by P. Rosa; 5(4): e01426-14.
64. Feng W., Ye F., Xue W. et al. Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity // *Molecular Pharmacology*. 2009; 75(1): 174–182.
65. De Feo C.J., Aller S.G., Siluvai G.S. et al. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(11): 4237–4242.
66. Ferreira C.R., Gahl W.A. Disorders of metal metabolism // *Translational Science of Rare Diseases*. 2017; 2(3–4): 101–139.
67. Festa R.A., Thiele D.J. Copper: An essential metal in biology // *Current Biology*. 2011; 21(21): R877–R883.
68. Fetherolf M., Boyd S.D., Winkler D.D. et al. Oxygen-dependent activation of Cu,Zn-superoxide dismutase-1 // *Metallomics*. 2017; 9(8): 1047–1059.
69. Fieten H., Leegwater P.A.J., Watson A.L. et al. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism // *Mammalian Genome*. 2012;

- 23(1–2): 62–75.
70. Fokas E., Prevo R., Pollard J.R. et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation // *Cell Death & Disease*. 2012; 3(12): e441.
71. La Fontaine S., Mercer J.F.B. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007; 463(2): 149–167.
72. Fowler N.J., Blanford C.F., Warwicker J. et al. Prediction of Reduction Potentials of Copper Proteins with Continuum Electrostatics and Density Functional Theory // *Chemistry - A European Journal*. 2017; 23(61): 15436–15445.
73. Francipane M.G., Lagasse E. Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1 // *Oncotarget*. 2013; 4(11): 1948–1962.
74. Fridovich I. Superoxide Anion Radical ($O_2^{\cdot-}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters // *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(30): 18515–18517.
75. Fru E.C., Rodr -Guez N.P., Partin C.A. et al. Cu isotopes in marine black shales record the Great Oxidation Event // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113(18): 4941–4946.
76. Fukai T., Ushio-Fukai M., Kaplan J.H. Copper transporters and copper chaperones: Roles in cardiovascular physiology and disease // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2018; 315(2): C186–C201.
77. Galbán S., Duckett C.S. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling // *Cell Death and Differentiation*. 2010; 17(1): 54–60.
78. Giachino A., Waldron K.J. Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways // *Molecular Microbiology*. 2020; 114(3): 377–390.
79. Giampietro R., Spinelli F., Contino M. et al. The Pivotal Role of Copper in Neurodegeneration: A New Strategy for the Therapy of Neurodegenerative Disorders // *Molecular Pharmaceutics*. 2018; 15(3): 808–820.
80. Gr ff M., Buchholz P.C.F., Le Roes-Hill M. et al. Multicopper oxidases: modular structure, sequence space, and evolutionary relationships // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2020; 88(10): 1329–1339.

81. Gralla E.B., Thiele D.J., Silar P. et al. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88(19): 8558–8562.
82. Gray H.B., Malmström B.G., Williams R.J.P. Copper coordination in blue proteins // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2000; 5(5): 551–559.
83. Gudekar N., Shanbhag V., Wang Y. et al. Metallothioneins regulate ATP7A trafficking and control cell viability during copper deficiency and excess // *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 1–11.
84. Gunshin H., Fujiwara Y., Custodio A.O. et al. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver // *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115(5): 1258–1266.
85. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter // *Nature*. 1997; 388(6641): 482–488.
86. Haas K.L., Putterman A.B., White D.R. et al. Model Peptides Provide New Insights into the Role of Histidine Residues as Potential Ligands in Human Cellular Copper Acquisition via Ctr1 // *Journal of the American Chemical Society*. 2011; 133(12): 4427–4437.
87. Hamza I., Faisst A., Prohaska J. et al. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(12): 6848–6852.
88. Han M., Chang J., Kim J. Loss of divalent metal transporter 1 function promotes brain copper accumulation and increases impulsivity // *Journal of Neurochemistry*. 2016; 138(6): 918–928.
89. Hartter D.E., Barnea A. Evidence for release of copper in the brain: Depolarization-induced release of newly taken-up ⁶⁷copper // *Synapse*. 1988; 412–415.
90. Hatori Y., Clasen S., Hasan N.M. et al. Functional partnership of the copper export machinery and glutathione balance in human cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(32): 26678–26687.

91. Hatori Y., Lutsenko S. The role of copper chaperone atox1 in coupling redox homeostasis to intracellular copper distribution // *Antioxidants*. 2016; 5(3): 1–16.
92. Hatori Y., Yan Y., Schmidt K. et al. Neuronal differentiation is associated with a redox-regulated increase of copper flow to the secretory pathway // *Nature Communications*. 2016; 7(155): 1–12.
93. Hirasawa F., Kawarada Y., Sato M. et al. The effect of silver administration on the biosynthesis and the molecular properties of rat ceruloplasmin // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1997; 1336(2): 195–201.
94. Hodgkinson V., Petris M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface // *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(17): 13549–13555.
95. Van Holde K.E., Miller K.I., Decker H. Hemocyanins and Invertebrate Evolution // *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(19): 15563–15566.
96. Holm R.H., Kennepohl P., Solomon E.I. Structural and functional aspects of metal sites in biology // *Chemical Reviews*. 1996; 96(7): 2239–2314.
97. Holzer A.K., Howell S.B. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure // *Cancer Research*. 2006; 66(22): 10944–10952.
98. Holzer A.K., Manorek G.H., Howell S.B. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin // *Molecular Pharmacology*. 2006; 70(4): 1390–1394.
99. Horn D., Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome C oxidase // *IUBMB Life*. 2008; 60(7): 421–429.
100. Hou M.-M., Polykretis P., Luchinat E. et al. Solution structure and interaction with copper in vitro and in living cells of the first BIR domain of XIAP // *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 16630.
101. Hsu T.I., Wang M.C., Chen S.Y. et al. Sp1 expression regulates lung tumor progression // *Oncogene*. 2012; 31(35): 3973–3988.
102. Huster D., Finegold M.J., Morgan C.T. et al. Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b* ^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice // *American Journal of Pathology*. 2006; 168(2): 423–434.

103. Huster D., Lutsenko S. Wilson disease: Not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism // *Molecular BioSystems*. 2007; 3(12): 816–824.
104. Illing A.C., Shawki A., Cunningham C.L. et al. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(36): 30485–30496.
105. Ilyechova E.Y., Miliukhina I. V., Karpenko M.N. et al. Case of early-onset Parkinson's disease in a heterozygous mutation carrier of the ATP7B gene // *Journal of Personalized Medicine*. 2019; 9(3): 1–16.
106. Ilyechova E.Y., Saveliev A.N., Skvortsov A.N. et al. The effects of silver ions on copper metabolism in rats // *Metallomics*. 2014; 6(10): 1970–1987.
107. Itoh S. Developing Mononuclear Copper-Active-Oxygen Complexes Relevant to Reactive Intermediates of Biological Oxidation Reactions // *Accounts of Chemical Research*. 2015; 48(7): 2066–2074.
108. Itoh S., Ha W.K., Nakagawa O. et al. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation // *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(14): 9157–9167.
109. Ivy K.D., Kaplan J.H. A Re-Evaluation of the Role of hCTR1, the Human High-Affinity Copper Transporter, in Platinum-Drug Entry into Human Cells // *Molecular Pharmacology*. 2013; 83(6): 1237–1246.
110. Jensen L.T., Culotta V.C. Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS // *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(50): 41373–41379.
111. Jiang L., Garrick M.D., Garrick L.M. et al. Divalent metal transporter 1 (Dmt1) Mediates Copper Transport in the Duodenum of Iron-Deficient Rats and When Overexpressed in Iron-Deprived HEK-293 Cells // *Journal of Nutrition*. 2013; 143(12): 1927–1933.
112. Jiang P., Wu X., Wang X. et al. NEAT1 upregulates EGCG-induced CTR1 to enhance cisplatin sensitivity in lung cancer cells // *Oncotarget*. 2016; 7(28): 43337–43351.

113. Jiang Y., Reynolds C., Xiao C. et al. Dietary copper supplementation reverses hypertrophic cardiomyopathy induced by chronic pressure overload in mice // *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(3): 657–666.
114. Kadenbach B., Hüttemann M. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase // *Mitochondrion*. 2015; 24: 64–76.
115. Kaim W., Rall J. Copper—A ‘Modern’ Bioelement // *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1996; 35(1): 43–60.
116. Kaler S.G. *Inborn errors of copper metabolism*. 1st edn // *Handbook of Clinical Neurology*. 1st edn. 2013. Elsevier B.V.
117. Kaplan J.H., Maryon E.B. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal // *Biophysical Journal*. 2016; 110(1): 7–13.
118. Kardos J., Héja L., Simon Á. et al. Copper signalling: causes and consequences. // *Cell communication and signaling : CCS*. 2018; 16(1): 71.
119. Kelly E.J., Palmiter R.D. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein // *Nature Genetics*. 1996; 13(2): 219–222.
120. Kelner G.S., Lee M.H., Clark M.E. et al. The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival // *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(1): 580–584.
121. Kenneth N.S., Hucks G.E., Kocab A.J. et al. Copper is a potent inhibitor of both the canonical and non-canonical NFκB pathways // *Cell Cycle*. 2014; 13(6): 1006–1014.
122. Keown W., Gary J.B., Stack T.D.P. High-valent copper in biomimetic and biological oxidations // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2017; 22(2–3): 289–305.
123. Kim B.E., Nevitt T., Thiele D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation // *Nature Chemical Biology*. 2008; 4(3): 176–185.
124. Kim B.E., Turski M.L., Nose Y. et al. Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs // *Cell Metabolism*. 2010; 11(5): 353–363.

125. Kim H., Son H.Y., Bailey S.M. et al. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009; 296(2): 356–364.
126. Kluska K., Peris-Díaz M.D., Płonka D. et al. Formation of highly stable multinuclear Ag: NSn clusters in zinc fingers disrupts their structure and function // *Chemical Communications*. 2020; 56(9): 1329–1332.
127. Komori H., Higuchi Y. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins // *Biomolecular Concepts*. 2010; 1(1): 31–40.
128. Kram K.E., Finkel S.E. Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture // *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 81(13): 4442–4450.
129. Krishnamoorthy L., Cotruvo J.A., Chan J. et al. Copper regulates cyclic-AMP-dependent lipolysis // *Nature Chemical Biology*. 2016; 12(8): 586–592.
130. Kuo M.T., Huang Y.-F., Chou C.-Y. et al. Targeting the Copper Transport System to Improve Treatment Efficacies of Platinum-Containing Drugs in Cancer Chemotherapy // *Pharmaceuticals*. 2021; 14(6): 549.
131. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein // *Journal of Molecular Biology*. 1982; 157(1): 105–132.
132. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970; 227(5259): 680–685.
133. Latorre R., Baez-nieto D. Encyclopedia of Biophysics. Cupredoxins // *Encyclopedia of Biophysics*. 2013; 404–406.
134. Lee J., Peña M.M.O., Nose Y. et al. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(6): 4380–4387.
135. Lee J., Petris M.J., Thiele D.J. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the Ctr1 high affinity copper transporter: Identification of a Ctr1-independent copper transport system // *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(43): 40253–40259.

136. Lee J., Prohaska J.R., Thiele D.J. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(12): 6842–6847.
137. Lewis J.B., Randol T.M., Lockwood P.E. et al. Effect of subtoxic concentrations of metal ions on NF-kB activation in THP-1 human monocytes // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003; 64A(2): 217–224.
138. Li H., Webb S.P., Ivanic J. et al. Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins // *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(25): 8010–8019.
139. Li L., Kaplan J. A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism // *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(32): 33653–33661.
140. Li S., Ahmed L., Zhang R. et al. Smelling Sulfur: Copper and Silver Regulate the Response of Human Odorant Receptor OR2T11 to Low-Molecular-Weight Thiols // *Journal of the American Chemical Society*. 2016; 138(40): 13281–13288.
141. Liao Y., Zhao J., Bulek K. et al. Inflammation mobilizes copper metabolism to promote colon tumorigenesis via an IL-17-STEAP4-XIAP axis. // *Nature communications*. 2020; 11(1): 900.
142. Liggi M., Murgia D., Civolani A. et al. The relationship between copper and steatosis in Wilson's disease // *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2013; 37(1): 36–40.
143. Lim K., Ho J.X., Keeling K. et al. Three-Dimensional structure of schistosoma japonicum glutathione s -transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from hiv // *Protein Science*. 1994; 3(12): 2233–2244.
144. Lin C., Zhang Z., Wang T. et al. Copper uptake by DMT1: a compensatory mechanism for CTR1 deficiency in human umbilical vein endothelial cells // *Metallomics*. 2015; 7(8): 1285–1289.

145. Lin D.L., Chang C. p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily // *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(25): 14649–14652.
146. Lin S.J., Culotta V.C. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(9): 3784–3788.
147. Linder M.C. *Biochemistry of Copper*. 1991. Boston, MA: Springer US.
148. Linder M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update // *Metallomics*. 2016; 8(9): 887–905.
149. Linder M.C., Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. // *The American journal of clinical nutrition*. 1996; 63(5): 797S-811S.
150. Linz R., Barnes N.L., Zimnicka A.M. et al. Intracellular targeting of copper-transporting ATPase ATP7A in a normal and *Atp7b* $-/-$ kidney // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2008; 294(1): F53–F61.
151. Liochev S.I., Fridovich I. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: An alternative view [1] // *Redox Report*. 2002; 7(1): 55–57.
152. Liu H., Guo H., Deng H. et al. Copper induces hepatic inflammatory responses by activation of MAPKs and NF- κ B signalling pathways in the mouse // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020; 201(May): 110806.
153. Llanos R.M., Michalczyk A.A., Freestone D.J. et al. Copper transport during lactation in transgenic mice expressing the human ATP7A protein // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 372(4): 613–617.
154. Logie L., Harthill J., Patel K. et al. Cellular responses to the metal-binding properties of metformin // *Diabetes*. 2012; 61(6): 1423–1433.
155. Lönnerdal B. Intestinal regulation of copper homeostasis: A developmental perspective // *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 88(3): 846–850.
156. Lowe J., Taveira-da-Silva R., Hilário-Souza E. Dissecting copper homeostasis in diabetes mellitus // *IUBMB Life*. 2017; 69(4): 255–262.

157. Lu M., Lin S.C., Huang Y. et al. XIAP Induces NF- κ B Activation via the BIR1/TAB1 Interaction and BIR1 Dimerization // *Molecular Cell*. 2007; 689–702.
158. Lutsenko S. Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014; 1315(1): 56–63.
159. Lutsenko S. Copper trafficking to the secretory pathway // *Metallomics*. 2016; 8(9): 840–852.
160. Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y. et al. Function and regulation of human copper-transporting ATPases // *Physiological Reviews*. 2007; 87(3): 1011–1046.
161. Lutsenko S., Petris M.J. Function and Regulation of the Mammalian Copper-transporting ATPases: Insights from Biochemical and Cell Biological Approaches // *Journal of Membrane Biology*. 2003; 191(1): 1–12.
162. Lutsenko S., Washington-Hughes C., Ralle M. et al. Copper and the brain noradrenergic system // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2019; 24(8): 1179–1188.
163. Macomber L., Imlay J.A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(20): 8344–8349.
164. Mäki J.M., Sormunen R., Lippo S. et al. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues // *American Journal of Pathology*. 2005; 167(4): 927–936.
165. Malinouski M., Hasan N.M., Zhang Y. et al. Genome-wide RNAi ionomics screen reveals new genes and regulation of human trace element metabolism // *Nature Communications*. 2014; 5(1): 3301.
166. Mandal T., Kar S., Maji S. et al. Structural and Functional Diversity Among the Members of CTR, the Membrane Copper Transporter Family // *Journal of Membrane Biology*. 2020; 253(5): 459–468.
167. Marchi G., Busti F., Zidanes A.L. et al. Aceruloplasminemia: A severe neurodegenerative disorder deserving an early diagnosis // *Frontiers in*

- Neuroscience. 2019; 13(APR): 1–8.
168. Martínez-González J., Varona S., Cañes L. et al. Emerging roles of lysyl oxidases in the cardiovascular system: New concepts and therapeutic challenges // *Biomolecules*. 2019; 9(10).
169. Maryon E., Molloy S., Ivy K. et al. Rate and Regulation of Copper Transport by Human Copper Transporter 1 (hCTR1) // *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(25): 18035–18046.
170. Maryon E.B., Molloy S.A., Kaplan J.H. O-linked glycosylation at threonine 27 protects the copper transporter hCTR1 from proteolytic cleavage in mammalian cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(28): 20376–20387.
171. Maryon E.B., Molloy S.A., Kaplan J.H. Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1 // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2013; 304(8): 768–779.
172. Masoud G.N., Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2015; 5(5): 378–389.
173. Materia S., Cater M.A., Klomp L.W.J. et al. Clusterin and COMMD1 independently regulate degradation of the mammalian copper ATPases ATP7A and ATP7B // *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(4): 2485–2499.
174. Matsuoka R., Shiba-Ishii A., Nakano N. et al. Heterotopic production of ceruloplasmin by lung adenocarcinoma is significantly correlated with prognosis // *Lung Cancer*. 2018; 118(December 2017): 97–104.
175. McElwee M.K., Song M.O., Freedman J.H. Copper Activation of NF- κ B Signaling in HepG2 Cells // *Journal of Molecular Biology*. 2009; 393(5): 1013–1021.
176. Meija J., Coplen T.B., Berglund M. et al. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report) // *Pure and Applied Chemistry*. 2016; 88(3): 265–291.
177. Meyer L.A., Durley A.P., Prohaska J.R. et al. Copper Transport and Metabolism Are Normal in Aceruloplasminemic Mice // *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(39): 36857–36861.

178. Mills E.S. THE TREATMENT OF IDIOPATHIC (HYPOCHROMIC) ANAEMIA WITH IRON AND COPPER. // Canadian Medical Association journal. 1930; 22(2): 175–8.
179. Moira Glerum D., Shtanko A., Tzagoloff A. SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae* // Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(34): 20531–20535.
180. Molloy S.A., Kaplan J.H. Copper-dependent recycling of hCTR1, the human high affinity copper transporter // Journal of Biological Chemistry. 2009; 284(43): 29704–29713.
181. Morgan M.T., Nguyen L.A.H., Hancock H.L. et al. Glutathione limits aquacopper(I) to sub-femtomolar concentrations through cooperative assembly of a tetranuclear cluster // Journal of Biological Chemistry. 2017; 292(52): 21558–21567.
182. Mufti A.R., Burstein E., Duckett C.S. XIAP: Cell death regulation meets copper homeostasis // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2007; 463(2): 168–174.
183. Müller S., Versini A., Sindikubwabo F. et al. Metformin reveals a mitochondrial copper addiction of mesenchymal cancer cells // PLOS ONE. 2018. Edited by R. Samant; 13(11): e0206764.
184. Noda Y., Asada M., Kubota M. et al. Copper enhances APP dimerization and promotes A β production. // Neuroscience letters. 2013; 10–15.
185. Noh H., Lee S.J., Jo H.J. et al. Histidine residues at the copper-binding site in human tyrosinase are essential for its catalytic activities // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2020; 35(1): 726–732.
186. Nose Y., Kim B.E., Thiele D.J. Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function // Cell Metabolism. 2006; 4(3): 235–244.
187. Nose Y., Wood L.K., Kim B.E. et al. Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability // Journal of Biological Chemistry. 2010; 285(42): 32385–32392.

188. O'Brien R., Markova N., Holdgate G.A. Thermodynamics in Drug Discovery // in Applied Biophysics for Drug Discovery. 2017. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 7–28.
189. O'Toole S.A., Sheppard B.L., McGuinness E.P.J. et al. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours // Cancer Detection and Prevention. 2003; 27(1): 47–54.
190. Ogra Y., Aoyama M., Suzuki K.T. Protective role of metallothionein against copper depletion // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2006; 451(2): 112–118.
191. Ogra Y., Miyayama T., Anan Y. Effect of glutathione depletion on removal of copper from LEC rat livers by tetrathiomolybdate // Journal of Inorganic Biochemistry. 2010; 104(8): 858–862.
192. Ohgami R.S., Campagna D.R., McDonald A. et al. The Steap proteins are metallo-reductases // Blood. 2006; 108(4): 1388–1394.
193. Öhrvik H., Nose Y., Wood L.K. et al. Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- And cisplatin-binding ecto-domain // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013; 110(46).
194. Öhrvik H., Thiele D.J. How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1, Ctr1 // Annals of the New York Academy of Sciences. 2014; 1314(1): 32–41.
195. Öhrvik H., Thiele D.J. The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2015; 31: 178–182.
196. Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria // Journal of Biological Chemistry. 2001; 276(42): 38388–38393.
197. Olsson M.H.M., Ryde U., Roos B. Theoretical calculations of the reduction potential of blue copper proteins // Journal of Inorganic Biochemistry. 1999; 74(1–4): 254.

198. Orłowski C., Piotrowski J.K. Metal composition of human hepatic and renal metallothionein // *Biological Trace Element Research*. 1998; 65(2): 133–141.
199. Ostrakhovitch E.A., Cherian M.G. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004; 423(2): 351–361.
200. Ostrakhovitch E.A., Lordnejad M.R., Schliess F. et al. Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002; 397(2): 232–239.
201. Pan Q., Bao L.W., Merajver S.D. Tetrathiomolybdate inhibits angiogenesis and metastasis through suppression of the NFkappaB signaling cascade. // *Molecular cancer research : MCR*. 2003; 1(10): 701–6.
202. Parisi S., Polishchuk E. V., Allocca S. et al. Characterization of the most frequent ATP7B mutation causing Wilson disease in hepatocytes from patient induced pluripotent stem cells // *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 6247.
203. Pearson R.G. Hard and Soft Acids and Bases // *Journal of the American Chemical Society*. 1963; 85(22): 3533–3539.
204. Persichini T., Percario Z., Mazzon E. et al. Copper Activates the NF-κB Pathway In Vivo // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; 8(9–10): 1897–1904.
205. Petris M.J., Smith K., Lee J. et al. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(11): 9639–9646.
206. Peyssonnaud C., Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: New concepts of activation // *Biology of the Cell*. 2001; 93(1–2): 53–62.
207. Pham A.N., Xing G., Miller C.J. et al. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production // *Journal of Catalysis*. 2013; 301: 54–64.
208. Pierson H., Yang H., Lutsenko S. Copper Transport and Disease: What Can We Learn from Organoids? // *Annual review of nutrition*. 2019; 39: 75–94.

209. Platonova N.A., Orlov I.A., Klotchenko S.A. et al. Ceruloplasmin gene expression profile changes in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and involution // *J Trace Elem Med Biol.* 2017; 43: 126–134.
210. Polishchuk E. V., Polishchuk R.S. The emerging role of lysosomes in copper homeostasis // *Metallomics.* 2016; 8(9): 853–862.
211. Polishchuk R.S. Cellular Function of ATP7B (Wilson ATPase) // in *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE.* 2019. Elsevier; 45–56.
212. Portnoy M.E., Rosenzweig A.C., Rae T. et al. Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone // *Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274(21): 15041–15045.
213. Puchkova L., Babich P., Zatulovskaia Y. et al. Copper Metabolism of Newborns Is Adapted to Milk Ceruloplasmin as a Nutritive Source of Copper: Overview of the Current Data // *Nutrients.* 2018; 10(11): 1591.
214. Puchkova L. V., Broggin M., Polishchuk E. V. et al. Silver Ions as a Tool for Understanding Different Aspects of Copper Metabolism // *Nutrients.* 2019; 11(6): 1364.
215. Pushie M.J., Shaw K., Franz K.J. et al. Model Peptide Studies Reveal a Mixed Histidine-Methionine Cu(I) Binding Site at the N-Terminus of Human Copper Transporter 1 // *Inorganic Chemistry.* 2015; 54(17): 8544–8551.
216. Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A. et al. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. // *Science (New York, N.Y.).* 1999; 284(5415): 805–8.
217. Ramos D., Mar D., Ishida M. et al. Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells // *PLoS ONE.* 2016; 11(3): 1–23.
218. Randall C.P., Gupta A., Jackson N. et al. Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2014; 70(4): 1037–1046.
219. Rasia R.M., Bertocini C.W., Marsh D. et al. Structural characterization of copper(II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;

- 102(12): 4294–4299.
220. Ren F., Logeman B.L., Zhang X. et al. X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1 // *Nature Communications*. 2019; 10(1): 1386.
221. Riccardi C., Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *Nature Protocols*. 2006; 1(3): 1458–1461.
222. Ridge P.G., Zhang Y., Gladyshev V.N. Comparative Genomic Analyses of Copper Transporters and Cuproproteomes Reveal Evolutionary Dynamics of Copper Utilization and Its Link to Oxygen // *PLoS ONE*. 2008. Edited by J.-N. Volff; 3(1): e1378.
223. Roy A., Bulut O., Some S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity // *RSC Advances*. 2019; 9(5): 2673–2702.
224. Rubino J.T., Franz K.J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012; 107(1): 129–143.
225. Saporito-Magriñá C.M., Musacco-Sebio R.N., Andrieux G. et al. Copper-induced cell death and the protective role of glutathione: The implication of impaired protein folding rather than oxidative stress // *Metallomics*. 2018; 10(12): 1743–1754.
226. Schägger H. Tricine–SDS-PAGE // *Nature Protocols*. 2006; 1(1): 16–22.
227. Scheiber I., Dringen R., Mercer J.F.B. Copper: Effects of Deficiency and Overload // in *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*. 2013; 359–387.
228. Schlieff M.L., Craig A.M., Gitlin J.D. NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons // *Journal of Neuroscience*. 2005; 25(1): 239–246.
229. Schulten H.-J. Pleiotropic Effects of Metformin on Cancer // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(10): 2850.
230. Schwab S., Shearer J., Conklin S.E. et al. Sequence proximity between Cu(II) and Cu(I) binding sites of human copper transporter 1 model peptides

- defines reactivity with ascorbate and O₂ // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2016; 158: 70–76.
231. Shawki A., Anthony S.R., Nose Y. et al. Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015; 309(8): G635–G647.
232. Shimberg G.D., Ok K., Neu H.M. et al. Cu(I) Disrupts the Structure and Function of the Nonclassical Zinc Finger Protein Tristetraprolin (TTP) // *Inorganic Chemistry*. 2017; 56(12): 6838–6848.
233. Sies H. Strategies of antioxidant defense // *European Journal of Biochemistry*. 1993; 215(2): 213–219.
234. Skjørringe T., Amstrup Pedersen P., Salling Thorborg S. et al. Characterization of ATP7A missense mutants suggests a correlation between intracellular trafficking and severity of Menkes disease // *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 757.
235. Skjørringe T., Burkhart A., Johnsen K.B. et al. Divalent metal transporter 1 (DMT1) in the brain: Implications for a role in iron transport at the blood-brain barrier, and neuronal and glial pathology // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2015; 8(June): 1–13.
236. Skopp A., Boyd S.D., Ullrich M.S. et al. Copper–zinc superoxide dismutase (Sod1) activation terminates interaction between its copper chaperone (Ccs) and the cytosolic metal-binding domain of the copper importer Ctr1 // *BioMetals*. 2019; 32(4): 695–705.
237. Skvortsov A.N., Zatulovskiy E.A., Puchkova L. V. Structure-functional organization of eukaryotic high-affinity copper importer CTR1 determines its ability to transport copper, silver, and cisplatin // *Molecular Biology*. 2012; 46(2): 304–315.
238. Snezhkina A. V., Kudryavtseva A. V., Kardymon O.L. et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019: Article ID 6175804.

239. Solá R.J., Griebenow K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. // *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009; 98(4): 1223–45.
240. Solomon E.I., Heppner D.E., Johnston E.M. et al. Copper active sites in biology // *Chemical Reviews*. 2014; 114(7): 3659–3853.
241. Spinazzi M., Sghirlanzoni A., Salviati L. et al. Impaired copper and iron metabolism in blood cells and muscles of patients affected by copper deficiency myeloneuropathy // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2014; 40(7): 888–898.
242. Squitti R., Polimanti R., Bucossi S. et al. Linkage disequilibrium and haplotype analysis of the ATP7B gene in alzheimer's disease // *Rejuvenation Research*. 2013; 16(1): 3–10.
243. Stefaniak E., Płonka D., Drew S.C. et al. The N-terminal 14-mer model peptide of human Ctr1 can collect Cu(ii) from albumin. Implications for copper uptake by Ctr1 // *Metallomics*. 2018; 10(12): 1723–1727.
244. Stewart D.J., Short K.K., Maniaci B.N. et al. COMMD1 and PtdIns(4,5)P₂ interaction maintain ATP7B copper transporter trafficking fidelity in HepG2 cells // *Journal of Cell Science*. 2019; 132(19): jcs231753.
245. Sun S., Cai J., Yang Q. et al. The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: A meta-analysis of literatures and datasets // *Oncotarget*. 2017; 8(9): 16036–16051.
246. Suzuki K.T., Someya A., Komada Y. et al. Roles of metallothionein in copper homeostasis: Responses to Cu-deficient diets in mice // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002; 88(2): 173–182.
247. Swasey S.M., Leal L.E., Lopez-Acevedo O. et al. Silver (I) as DNA glue: Ag⁺-mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints // *Scientific Reports*. 2015; 5(January): 1–9.
248. Szymański P., Fraczek T., Markowicz M. et al. Development of copper based drugs, radiopharmaceuticals and medical materials // *BioMetals*. 2012; 25(6): 1089–1112.
249. Taniguchi K., Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming

- of age // Nature Reviews Immunology. 2018; 309–324.
250. Tapia L., González-Agüero M., Cisternas M.F. et al. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels // Biochemical Journal. 2004; 378(2): 617–624.
251. Telianidis J., Hung Y.H., Materia S. et al. Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis // Frontiers in Aging Neuroscience. 2013; 5(AUG): 1–17.
252. Tsai C.-Y., Liebig J.K., Tsigelny I.F. et al. The copper transporter 1 (CTR1) is required to maintain the stability of copper transporter 2 (CTR2). // Metallomics. 2015; 7(11): 1477–1487.
253. Tsang C.K. wa., Liu Y., Thomas J. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance // Nature communications. 2014; 5: 3446.
254. Tsigelny I.F., Sharikov Y., Greenberg J.P. et al. An All-Atom Model of the Structure of Human Copper Transporter 1 // Cell Biochemistry and Biophysics. 2012; 63(3): 223–234.
255. Turski M.L., Brady D.C., Kim H.J. et al. A Novel Role for Copper in Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling // Molecular and Cellular Biology. 2012; 32(7): 1284–1295.
256. Valko M., Jomova K., Rhodes C.J. et al. *Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease* // Archives of Toxicology. 2016.
257. Valko M., Morris H., Cronin M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress // Current Medicinal Chemistry. 2005; 12(10): 1161–1208.
258. Vasin A., Klotchenko S., Puchkova L. Phylogenetic analysis of six-domain multi-copper blue proteins. // PLoS currents. 2013; 5.
259. Veronesi G., Gallon T., Deniaud A. et al. XAS Investigation of Silver(I) Coordination in Copper(I) Biological Binding Sites // Inorganic Chemistry. 2015; 54(24): 11688–11696.
260. Villoutreix B.O., Dahlbäck B. Structural investigation of the A domains of

- human blood coagulation factor V by molecular modeling // *Protein Science*. 1998; 7(6): 1317–1325.
261. Wadwa J., Chu Y.H., Nguyen N. et al. Effects of ATP7A overexpression in mice on copper transport and metabolism in lactation and gestation // *Physiological Reports*. 2014; 2(1): 1–11.
262. Wang F., Kim B.-E., Petris M.J. et al. The Mammalian Zip5 Protein Is a Zinc Transporter That Localizes to the Basolateral Surface of Polarized Cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(49): 51433–51441.
263. Wang L., Ge Y., Kang Y.J. Featured Article: Effect of copper on nuclear translocation of copper chaperone for superoxide dismutase-1 // *Experimental Biology and Medicine*. 2016; 241(14): 1483–1488.
264. Wang X., Flores S.R.L., Ha J.H. et al. Intestinal DMT1 is essential for optimal assimilation of dietary copper in Male and female mice with iron-deficiency anemia // *Journal of Nutrition*. 2018; 148(8): 1244–1252.
265. Wang Y., Branicky R., Noë A. et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling // *Journal of Cell Biology*. 2018; 217(6): 1915–1928.
266. Wang Y., Zhu S., Hodgkinson V. et al. Maternofetal and neonatal copper requirements revealed by enterocyte-specific deletion of the Menkes disease protein // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012; 303(11): G1236–G1244.
267. Wee N.K.Y., Weinstein D.C., Fraser S.T. et al. The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2013; 45(5): 960–963.
268. White C., Kambe T., Fulcher Y.G. et al. Copper transport into the secretory pathway is regulated by oxygen in macrophages // *Journal of Cell Science*. 2009; 122(9): 1315–1321.
269. Wilson D.F. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism // *Journal of Physiology*. 2017; 595(23): 7023–7038.
270. Wolff N.A., Ghio A.J., Garrick L.M. et al. Evidence for mitochondrial

- localization of divalent metal transporter 1 (DMT1) // *FASEB Journal*. 2014; 28(5): 2134–2145.
271. Wu L., Zhu Y. The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review) // *International Journal of Molecular Medicine*. 2015; 36(5): 1200–1204.
272. Wu Z., Zhang W., Kang Y.J. Copper affects the binding of HIF-1 α to the critical motifs of its target genes // *Metallomics*. 2019; 11(2): 429–438.
273. Xiao Y., Wang T., Song X. et al. Copper promotion of myocardial regeneration // *Experimental Biology and Medicine*. 2020; 245(10): 911–921.
274. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H. et al. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. // *Nucleic acids research*. 2004; 32(12): e98–e98.
275. Yan D., Aiba I., Chen H.H.W. et al. Effects of Cu(II) and cisplatin on the stability of Specific protein 1 (Sp1)-DNA binding: Insights into the regulation of copper homeostasis and platinum drug transport // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2016; 161: 37–39.
276. Yu X., Chen L., Ding H. et al. Iron Transport from Ferrous Bisglycinate and Ferrous Sulfate in DMT1-Knockout Human Intestinal Caco-2 Cells. // *Nutrients*. 2019; 11(3): 485.
277. Yuan S., Chen S., Xi Z. et al. Copper-finger protein of Sp1: The molecular basis of copper sensing // *Metallomics*. 2017; 9(8): 1169–1175.
278. Zatulovskaia Y.A., Ilyechova E.Y., Puchkova L. V. The Features of Copper Metabolism in the Rat Liver during Development // *PLOS ONE*. 2015. Edited by B. Zhivotovsky; 10(10): e0140797.
279. Zhang X.-F., Liu Z.-G., Shen W. et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(9): 1534.
280. Zhang Y., Wilcox D.E. Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2002; 7(3): 327–337.
281. Zhao X., Liu R., Teng Y. et al. The interaction between Ag⁺ and bovine

- serum albumin: A spectroscopic investigation // *Science of the Total Environment*. 2011; 409(5): 892–897.
282. Zheng G., Chen J., Zheng W. Relative contribution of CTR1 and DMT1 in copper transport by the blood-CSF barrier: Implication in manganese-induced neurotoxicity // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012; 260(3): 285–293.
283. Zhou B., Gitschier J. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94(14): 7481–7486.
284. Zimnicka A.M., Ivy K., Kaplan J.H. Acquisition of dietary copper: A role for anion transporters in intestinal apical copper uptake // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2011; 300(3): 588–599.
285. Zimnicka A.M., Maryon E.B., Kaplan J.H. Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes: Implications for copper homeostasis // *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(36): 26471–26480.
286. Zischka H., Einer C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2018; 102(June): 71–75.