

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.169:[546.56+546.57+546.9]

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА CTR1, ВЫСОКОАФФИННОГО ИМПОРТЕРА МЕДИ ЭУКАРИОТ, ОПРЕДЕЛЯЕТ ЕГО СПОСОБНОСТЬ ТРАНСПОРТИРОВАТЬ МЕДЬ, СЕРЕБРО И ЦИСПЛАТИН

© 2012 г. А. Н. Скворцов^{1,2*}, Е. А. Затуловский¹, Л. В. Пучкова¹

¹Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург, 195251

²Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

Поступила в редакцию 26.04.2011 г.

Принята к печати 03.08.2011 г.

Эукариотический белок CTR1, высокоаффинный импортер Cu(I), переносит, как показано *in vitro*, также абиогенные Ag(I) и противоопухолевый препарат цисплатин. Пока не известно, каким образом CTR1 импортирует платиновую группу, которая обладает принципиально другими координационными свойствами по сравнению со сходными между собой Cu(I) и Ag(I). Для того, чтобы понять этот феномен, с помощью расчетных методов проведен анализ свойств 25 последовательностей белка CTR1 хордовых, на основании которого установлено строение внеклеточного N-концевого домена этого белка. Изучена степень консервативности координационных свойств внеклеточных медьсвязывающих мотивов CTR1. Показано, что взаимное положение этих мотивов, обогащенных метионином и гистидином, служит предпосылкой для селективного связывания меди, серебра и цисплатина. Исследована также связь между тканеспецифической экспрессией гена *CTR1*, содержанием меди и накоплением серебра и платины в органах мышей *in vivo*. Оказалось, что между этими параметрами существует значимая, но не абсолютная положительная корреляция. На основании структурно-функциональных особенностей организации N-конца CTR1 предложена модель сопряженного транспорта цисплатина и ионов меди, разрешающая противоречие между транспортом цисплатина *in vivo* и необратимым связыванием платины с метионин-богатыми пептидами.

Ключевые слова: CTR1, метаболизм меди, перенос серебра, цисплатин, молекулярная эволюция, корреляционный анализ.

STRUCTURE-FUNCTIONAL ORGANIZATION OF EUKARYOTIC HIGH-AFFINITY COPPER IMPORTER CTR1 DETERMINES ITS ABILITY TO TRANSPORT COPPER, SILVER AND CISPLATIN, by A. N. Skvortsov^{1,2*}, E. A. Zatulovskiy¹, L. V. Puchkova¹ (¹St-Petersburg State Polytechnical University, St-Petersburg, 195251 Russia; ²Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, 194064 Russia; *e-mail: colbug@mail.ru). It was shown recently, that high affinity Cu(I) importer eukaryotic protein CTR1 can also transport *in vitro* abiogenic Ag(I) ions and anticancer drug cisplatin. At present there is no rational explanation how CTR1 can transfer platinum group, which is different by coordination properties from highly similar Cu(I) and Ag(I). To understand this phenomenon we analyzed 25 sequences of chordate CTR1 proteins, and found out conserved patterns of organization of N-terminal extracellular part of CTR1 which correspond to initial metal binding. Extracellular copper-binding motifs were qualified by their coordination properties. It was shown that relative position of Met- and His-rich copper-binding motifs in CTR1 predisposes the extracellular CTR1 part to binding of copper, silver and cisplatin. Relation between tissue-specific expression of CTR1 gene, steady-state copper concentration, and silver and platinum accumulation in organs of mice *in vivo* was analyzed. Significant positive but incomplete correlation exists between these variables. Basing on structural and functional peculiarities of N-terminal part of CTR1 a hypothesis of coupled transport of copper and cisplatin has been suggested, which avoids the disagreement between CTR1-mediated cisplatin transport *in vitro*, and irreversible binding of platinum to Met-rich peptides.

Keywords: CTR1, copper metabolism, silver transport, cisplatin, molecular evolution, correlation analysis

Принятые сокращения: ГК – главная компонента; ТМД – трансмембранный домен; hCTR1 – CTR1 человека; а.о. – аминокислотный остаток.

* Эл. почта: colbug@mail.ru

Медь входит в состав активных центров жизненно важных ферментов [1–3], является компонентом сигнальных путей [4], участвует в перепрограммировании энергетического метаболизма при гипоксии [5] и ответственна за развитие ряда тяжелых заболеваний [3, 6]. Ионы меди переносятся в клетки трансмембранным белком-импортером CTR1 (*SLC31A1*). В физиологически активной форме он представляет собой гомотример [7, 8] и обладает высокой селективностью к восстановленной меди Cu(I) [9, 10]. Белок CTR1 импортирует также абиогенные ионы серебра Ag(I) [11], которые могут рассматриваться как потенциальные конкуренты транспорта меди, поскольку по электронным свойствам Ag(I) и Cu(I) сходны. Особое внимание к этому белку привлекает то, что он способен переносить в клетки цисплатин, противоопухолевый препарат на основе платины [12, 13]. Опубликованные данные позволяют допустить, что эффективность цисплатина может модулироваться ионами меди и серебра. Однако механизм транспорта металлов посредством CTR1 изучен недостаточно полно [9, 14], и многие его аспекты остаются не известными. Например, неясно, как у высших эукариот происходит восстановление Cu(II) перед поступлением в клетку; каков механизм переноса цисплатина, который содержит ион Pt(II), по ряду свойств принципиально отличающийся от Cu(I); имеется ли взаимосвязь между транспортом меди и транспортом цисплатина. Ответы на эти вопросы важны для понимания роли CTR1 в метаболизме платиновых препаратов и могут способствовать созданию менее токсичных схем применения цисплатина.

В настоящей работе предпринята попытка ответить на эти актуальные вопросы, используя методы теоретического анализа особенностей структурной организации белка CTR1, обуславливающие его специфичность по отношению к упомянутым субстратам. Предложена модель, объясняющая различные аспекты взаимодействия процессов транспорта меди и платиновых препаратов через CTR1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали взрослых мышей линии C57Bl (питомник “Рапполово” РАН, Ленинградская область). Животных содержали в стандартных условиях, они получали корм, соответствующий стандартам ГОСТ Р50258-92, и воду без ограничения. Для изучения распределения серебра мышьяк в течение 3 недель содержали на Ag-диете [15]. Цисплатин в дозе 4 мг/кг веса тела вводили внутривенно. Органы мышьяк сразу после извлечения замораживали и хранили при -70°C .

Экстракцию клеточной РНК, синтез кДНК (обратную транскрипцию, ОТ), разработку структу-

ры праймеров, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и анализ ПЦР-продуктов проводили, как описано ранее [16].

Концентрацию металлов измеряли при помощи метода атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре “Perkin-Elmer” (Model 4100ZL, США) с палладиевым модификатором (2 мкг). При измерении концентрации меди и серебра исследуемые ткани гомогенизировали в лизирующей смеси [15]. При измерении платины ткани растворяли в царской водке.

Корреляционный анализ производили методом главных компонент (ГК) [17], примененным к центрованным и нормированным данным с помощью надстройки Chemometrics для MS Excel (www.chemometrics.ru/materials/textbooks/projection.htm).

Для анализа аминокислотных последовательностей CTR1 хордовых, взятых из открытой базы данных Entrez (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), использовали программы ClustalX версии 2.0 (www.clustal.org), Cobalt (NCBI), PHYLIP (evolution.genetics.washington.edu/phylip). Для предсказания вторичной структуры, положения и ориентации трансмембранных доменов использовали алгоритмы PSIPRED v3.0 и MEMSAT-SVM/MEMSAT3, предоставляемые сервером PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Проводили анализ всей последовательности без использования масок. Локализацию гидрофобных участков в последовательности CTR1 предсказывали на основании индексов гидрофобности аминокислотных остатков (а.о.) [18]. Свойства и анализ частоты встречаемости а.о. усредняли с помощью программы, реализованной на Object Pascal. Тест на отклонение частот встречаемости а.о. от средне-статистических частот а.о. в белках млекопитающих [19] проводили с помощью биномиального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ in vivo взаимосвязи между экспрессией гена CTR1 и транспортом меди, серебра и платины

Корреляционный анализ предполагаемой взаимосвязи между уровнем экспрессии гена CTR1 и концентрацией металлов проводили при помощи метода ГК на основе экспериментальных данных, представленных на рис. 1а–г. В том случае, когда анализируются все органы (рис. 1д), две старшие ГК описывают 85% дисперсии набора, т.е. наблюдаемые значения можно условно представить в виде комбинации двух независимых факторов. При этом наблюдается сильная положительная корреляция между содержанием меди и серебра в органах. Поступление платины в органы не кор-

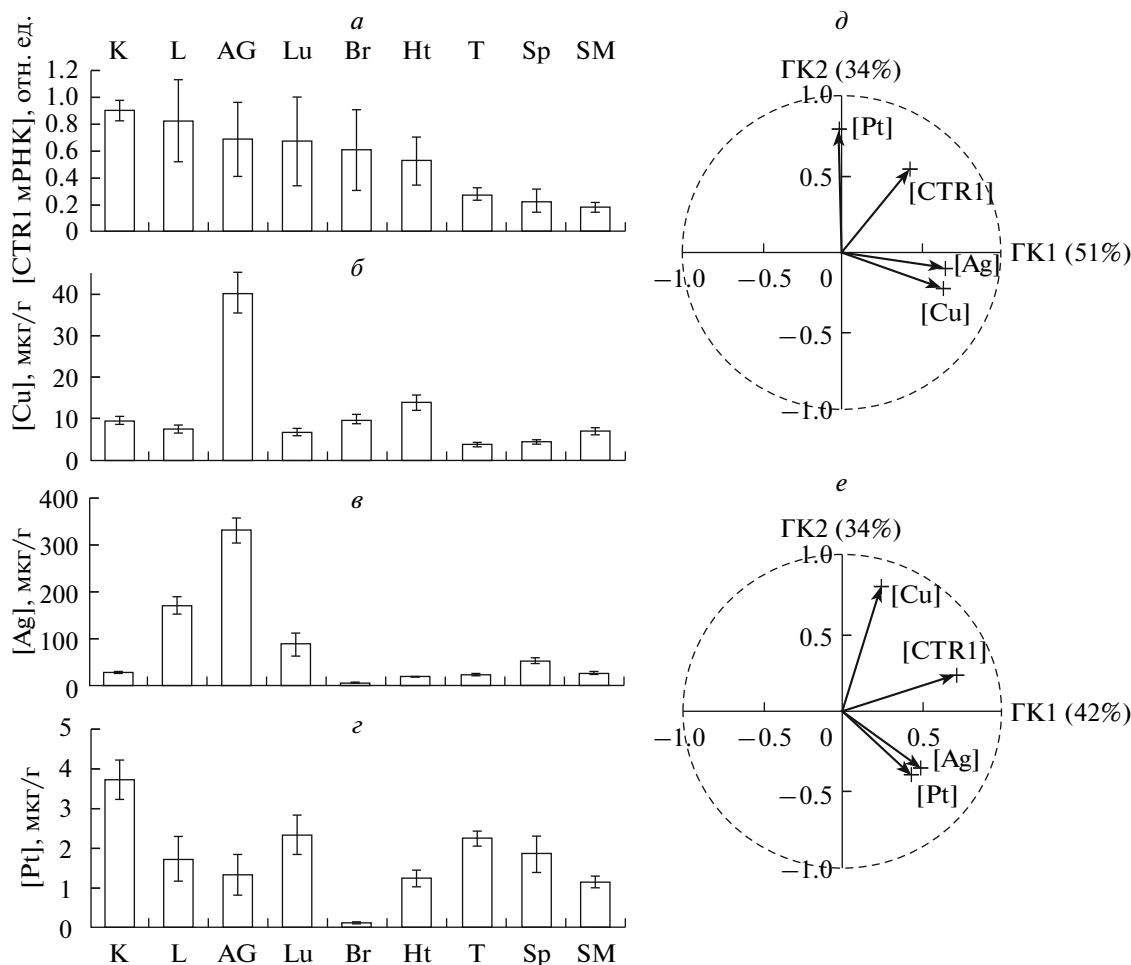


Рис. 1. Квазистационарный уровень экспрессии CTR1-мРНК в органах мышей C57Bl (а), концентрация меди (б), концентрация серебра в органах Ag-мышей (в) и концентрация платины через 30 мин после внутрибрюшинной инъекции 4 мг/кг цисплатина (г) в тех же органах. Концентрация металлов дана в мкг/г сырой ткани. К – почки, L – печень, AG – надпочечники, Lu – легкие, Br – мозг, Ht – сердце, T – семенники, Sp – селезенка, SM – скелетные мышцы. Указано стандартное отклонение в группе животных. Круговые диаграммы – анализ корреляции переменных методом главных компонент (ГК), график нагрузок: все образцы (д) и все образцы за исключением надпочечников (е). Доля дисперсии, описанная ГК, указана в подписях к осям (коэффициент корреляции Пирсона r между двумя переменными численно равен косинусу угла между векторами нагрузок соответствующих переменных, а длина векторов соответствует доле дисперсии переменных, описываемой двумя старшими ГК).

релирует с содержанием меди и серебра, однако, наблюдается положительная корреляция между уровнем CTR1-мРНК и содержанием меди и серебра, а также с поступлением платины. Существенная часть дисперсии количества Cu и Ag в разных органах обусловлена тем, что в надпочечниках это количество значительно выше средних значений. При исключении надпочечников из анализа вклад двух старших ГК в описание дисперсии падает до 75%, а корреляция между содержанием Ag и Cu не наблюдается (рис. 1е). Однако сохраняется положительная корреляция между уровнем CTR1-мРНК и всеми концентрациями металлов; корреляции между содержанием меди и платины нет.

Эти данные позволяют заключить, что *in vivo* наблюдается достоверная положительная корреляция между синтезом CTR1, содержанием меди, накоплением серебра и транспортом платины. Это согласуется с концепцией, предполагающей участие CTR1 в импорте указанных металлов в органы грызунов.

Анализ свойств последовательности белка CTR1

Последовательность белка CTR1 нескольких видов ранее уже подвергалась филогенетическому анализу. Показано, что CTR1 имеет три консервативных трансмембранных домена (ТМД), содержащих аминокислоты, боковые группы которых способны координировать атомы меди.

Таблица 1. Последовательности белков CTR1 хордовых, использованные для анализа, и некоторые их свойства

Protein_ID последовательности	Организм	Длина последовательности CTR1	Тандемные повторы	Потенциальные сайты N-гликозилирования*
XP_785308	морской еж, <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (внешняя группа)	208	2×MTXGHGHHTMPXG 2×GMT	N(-13), N31
EEN65462	ланцетник, <i>Branchiostoma floridae</i>	189	4.5×MDHSN	
AAH67161	данио [рыба], <i>Danio rerio</i>	188		
CAG01694	тетрадон [рыба], <i>Tetraodon nigroviridis</i>	188	2×GGH	
CAF34419	дорада [рыба], <i>Sparus aurata</i>	185		
ACN11071	семга [рыба], <i>Salmo salar</i>	186	2×MDH	
AAH75178	шпорцевая лягушка, <i>Xenopus laevis</i>	187		
AAH67952	шпорцевая лягушка, <i>Xenopus tropicalis</i>	183		
CAD13301	ящерица, <i>Podarcis siculus</i>	191		N13
XP_001506031	утконос, <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	189	3×MDH, 3×MNH	N18
XP_002743257	игрунка, <i>Callithrix jacchus</i>	192		N13
XP_001103110	макак, <i>Macaca mulatta</i>	190		N15
XP_520197	шимпанзе, <i>Pan troglodytes</i>	190		N15
AAB66306	человек, <i>Homo sapiens</i>	190		N15
CAH91134	орангутан, <i>Pongo abelii</i>	190		N15
XP_001489029	лошадь, <i>Equus caballus</i>	190		N15
XP_538800	собака, <i>Canis familiaris</i>	189**		N16
EFB15518	панда, <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	189		N16
AAI50135	бык, <i>Bos taurus</i>	189		N19
AAL49494	свинья, <i>Sus scrofa</i>	189		N20
XP_002708160	кролик, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	167		
ADP09413	хомячок, <i>Cricetulus griseus</i>	196	3×MGMNH, 3.5×MDH	N21/N22
AAH34674	мышь, <i>Mus musculus</i>	196		N12, N17
AAF72546	крыса, <i>Rattus norvegicus</i>	187		N17, N22
XP_001364740	опоссум, <i>Monodelphis domestica</i>	189		N16
XP_001232515	курица, <i>Gallus gallus</i>	183		N14
XP_002194656	амадина, <i>Taeniopygia guttata</i>	182		N14

Примечание. Из рассмотрения исключены повторяющиеся последовательности, полиморфные варианты и последовательности с отсутствующим N-концом.

* Нумерация остатков дана по последовательности CTR1 человека после выравнивания всех последовательностей по C-концам.

** Запись базы данных содержит явно ошибочный N-конец, не имеющий гомологии в геномах других млекопитающих. В анализ взята часть последовательности, гомологичная CTR1 близких видов.

Расположение этих аминокислот в модели α -спиральных ТМД допускает возможность образования ими медь-проводящего канала [8, 9]. Эти расчетные данные частично подтверждены экспериментально [20, 21]. К настоящему времени известно уже несколько сотен последовательностей CTR1, принадлежащих к разнообразным филогенетическим группам, однако их филогенетического анализа не проводили. Мы сравнили все белковые последовательности баз данных, ко-

торые имеют высокую гомологию с последовательностью CTR1 человека (hCTR1), без N-концевого домена (NP_001850, а.о. 62–190) (табл. 1). Отобранные последовательности автоматически выравнивали с помощью алгоритма ClustalX. Результаты показали, что последовательность, соответствующая аминокислотам в положениях 43–190 домена hCTR1, в эволюции высококонсервативна: у позвоночных она содержит единичные точечные замены, в основном — синонимиче-

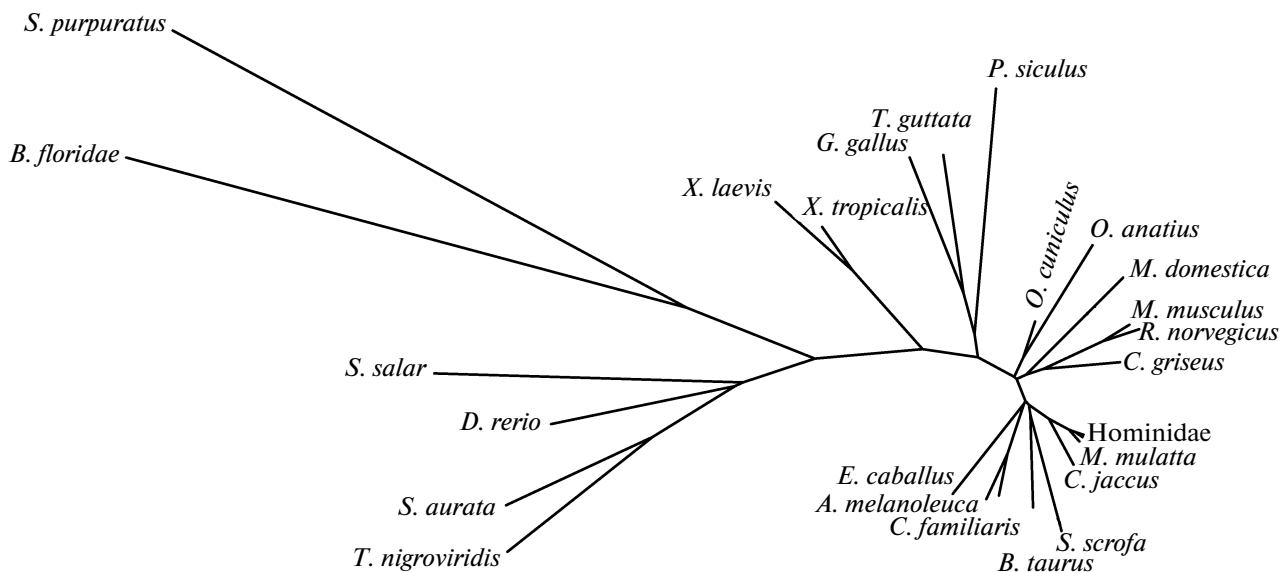


Рис. 2. Неукорененное филогенетическое дерево последовательностей CTR1 хордовых, построенное программами ClustalX и Phylip/DrawTree. Обозначения, см. табл. 1.

ские, и не имеет вставок и делеций. Поэтому использовали нумерацию аминокислот по гомологии с последовательностью hCTR1. Топология филогенетического дерева последовательностей хорошо соответствует топологии видового дерева позвоночных (рис. 2).

Предсказанные усредненные профили гидрофобности, положение и ориентация ТМД и предпочтительные вторичные структуры вышеперечисленных последовательностей приведены на рис. 3. Анализ надежно предсказывает положение ТМД2 и ТМД3 и внеклеточной петли в положениях 156–158; ориентация всех ТМД, предсказанная при использовании алгоритма MEMSAT3, во всех случаях согласуется с общепринятой топологией CTR1 в мембране [21]. Ключевая пара остатков метионина Met150 и Met154, строго консервативная в семействе белков CTR1, находится в ТМД2 в непосредственной близости к внеклеточной петле. По данным литературы, ТМД1 содержит 19–20 а.о. в положениях 67–86 [22–24], т.е. относится к коротким ТМД. Алгоритм MEMSAT-SVM предсказывает, что в более чем 75% проанализированных нами последовательностей ТМД находится в области 67–86 (20 а.о.), а алгоритм MEMSAT3 – в области 65–86 (23 а.о.) (рис. 3). В то же время, структурные исследования покоящегося hCTR1 [14] указывают на то, что наблюдается сильно наклонное положение ТМД1 в мембране, что мало согласуется с “минимальной” длиной 19 а.о. Алгоритм PSIPRED предсказывает α -спираль потенциального ТМД во всех проанализированных последовательностях, она продолжается в сторону С-конца до суммарной длины 37 а.о. Однако в области

86–96 имеется пять положительно заряженных а.о., что ограничивает ТМД1 с цитозольной стороны позицией 86. В то же время, анализ профиля гидрофобности допускает продолжение ТМД1 в сторону N-конца (рис. 3а). Таким образом, проведенный анализ позволяет считать, что ТМД1 включает в себя аминокислоты с 62 по 86 (25 а.о.), а возможно – с 54 по 86 (33 а.о.).

При использовании алгоритма MEMSAT-SVM ни в одном из проанализированных CTR1 не обнаружено сигнальных последовательностей для встраивания белка в мембрану по механизму, соответствующему концепции Блобеля (Blobel) [25], поэтому механизм направления CTR1 в мембрану остается непонятным. Возможно, роль сигнала переноса/остановки выполняет ТМД1. Если это так, то предсказанное нами удлинение его к N-концу оправдано.

По-видимому, как мы и предполагали ранее [8], канал формируется доменами ТМД2 и ТМД3, а наружное устье – петлями между ними (рис. 4а, б). Такое строение обеспечивает образование двух тиоэфирных “колец”, образованных остатками Met154 и Met150 [14, 20]. Исследование эволюционной консервативности остатков в α -спиралях подтверждает размещение ТМД1 в мембране и их функциональную роль (рис. 5). ТМД2 обладает ярко выраженным амфипатическим характером. Консервативные нуклеофильные аминокислоты сгруппированы с одной стороны спирали, а другая ее сторона сохраняет в эволюции хорошо выраженные гидрофобные свойства. ТМД3 не содержит консервативных нуклеофильных остатков, но консервативные аминокислоты также находятся по одну сторону спирали и включают в

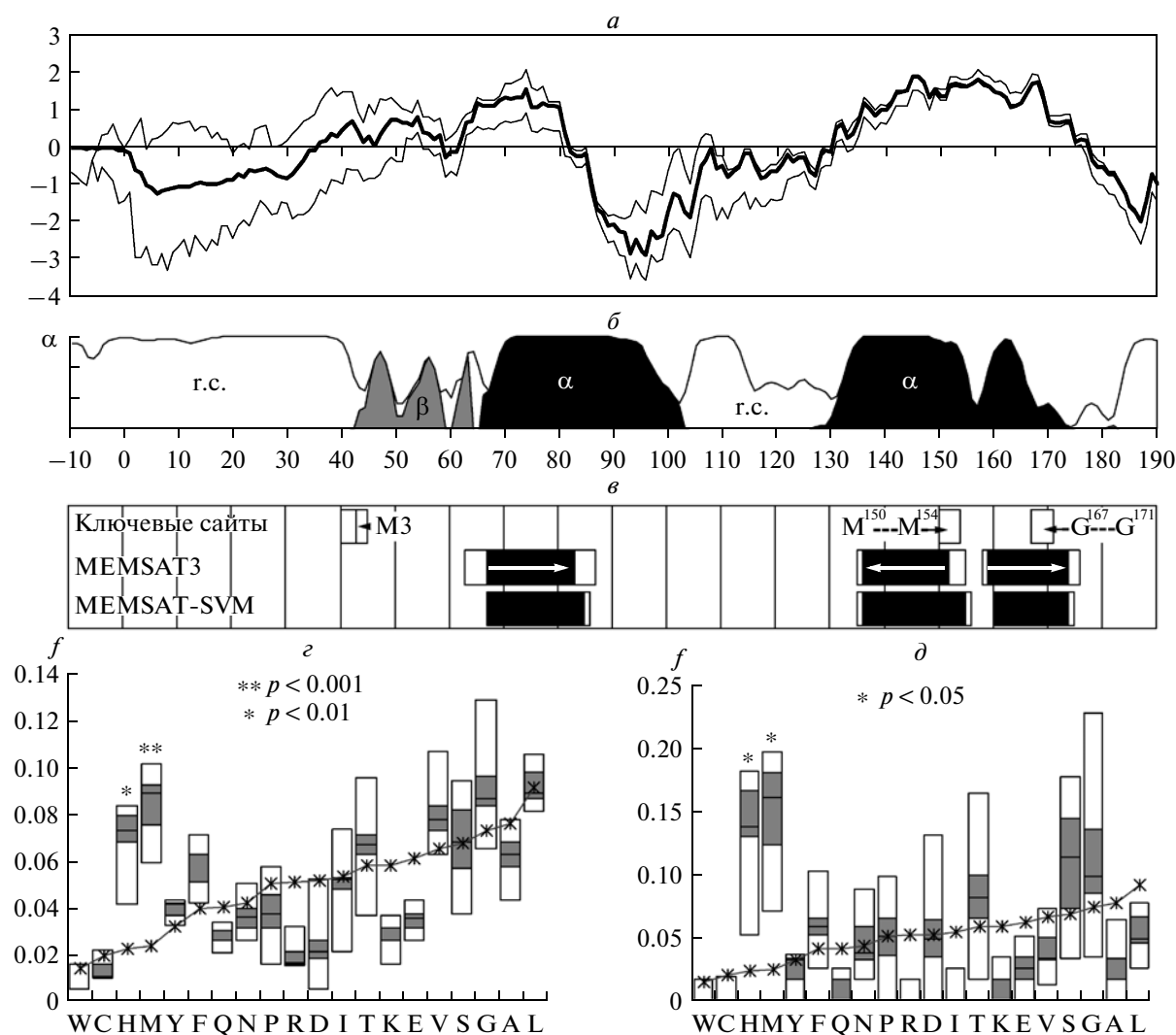


Рис. 3. Предсказанные свойства последовательностей CTR1 хордовых, выравненных по С-концу без вставок. *a* – Профиль гидрофобности (рамка 19 а.о. [18]), тонкие линии обозначают минимум и максимум, толстая линия – среднее значение по всем последовательностям. *b* – Предсказание вторичной структуры с помощью алгоритма PsiPred. Ордината: надежность предсказания (0 – наименьшая надежность). Белый – неупорядоченная структура (г.с.), серый – β -тяж, черный – α -спираль. *c* – Положение ключевых сайтов и предсказание трансмембранных доменов (ТМД) алгоритмом MEMSAT. Белый – ТМД предсказан в более чем в двух третях последовательностей, черный – во всех последовательностях. Стрелки направлены в сторону внеклеточных концов ТМД в соответствии с ориентацией, предсказанной MEMSAT3. По абсциссе (*a*–*c*) – номер аминокислоты по последовательности hCTR1. *d* – Частоты встречаемости аминокислот в полной последовательности CTR1, *e* – в N-концевом фрагменте (аминокислоты с номерами меньше 62). Прямоугольники отображают квантили распределения частоты встречаемости f каждой из аминокислот в анализируемых последовательностях. Линия – средняя встречаемость аминокислот в белках позвоночных [19]. Уровни значимости для аминокислот, частоты которых существенно отличаются от средних величин, указаны явно. По оси абсцисс – однобуквенный код аминокислотных остатков.

себя остатки Gly167 и Gly171, необходимые для тримеризации [26].

Наиболее вариабельной частью белка CTR1 является внеклеточный N-концевой домен (аминокислоты с номерами меньше 42): его длина изменчива, а автоматическое выравнивание неинформативно. В последовательности N-концевого домена не удается найти консервативные участки или сайты, типичные для внутриклеточных медь-

связывающих мотивов. Таким образом, для функционирования домена важна не конкретная последовательность аминокислот, а ее свойства. Во-первых, последовательность сильно обогащена остатками Met и His и обеднена положительно заряженными аминокислотами (рис. 3*d,e*). Общий заряд N-конца отрицательный, что благоприятствует электростатическому притяжению катионов. Остатки Met и His чаще всего разделены одним или двумя аминокислотами, а такое располо-

жение остатков способствует возможности образования хелатного комплекса обеими нуклеофильными группами His или Met в β - и α -конформациях пептидного остова соответственно. Во-вторых, N-конец, несмотря на высокое содержание остатков Met, обладает гидрофильными свойствами (рис. 3а). В-третьих, в N-концевой части последовательности отсутствует выраженная вторичная структура (рис. 3б). Это подтверждается наличием переменных в эволюции остатков пролина и полиглициновых трактов.

Кроме того, большинство последовательностей содержит в N-концевой части один или несколько потенциальных сайтов N-гликозилирования (табл. 1), экспериментально найденного в hCTR1 [27]. Остатки цистеина практически не встречаются и, следовательно, дисульфидные связи не требуются для формирования функционального гомотримера. Это хорошо объясняет лабильность гомотримера CTR1 на клеточной мембране, наблюдаемое в культивируемых клетках [10]. Интересной особенностью N-конца CTR1 многих организмов является наличие tandemно повторяющихся последовательностей — от 3–5 до десятков аминокислот (табл. 1). Повторы негомолгичны, хотя их одиночные и измененные копии могут быть прослежены в последовательностях близкородственных видов. Наличие этих повторов — основная причина неэффективности алгоритмов выравнивания последовательностей.

В последовательности N-конца CTR1 позвоночных традиционно выделяют три медь-связывающих мотива (табл. 2) [28]. Потенциальный сайт N-гликозилирования находится между мотивами 1 и 2, а между мотивами 2 и 3 — переменный полиглициновый линкер. Мотив 3 представляет собой уникальный элемент последовательности CTR1 и встречается в высокоаффинных транспортерах меди многих таксонов эукариот. Он имеет последовательность $(Met)_n-X-Met_{45}$, где число n обычно равно 3–4, но может варьировать от 1 до 6. Известно, что мотив 3 строго необходим для транспорта меди [20] и эффективного импорта платиновых препаратов [29]. Свойства N-концевого домена CTR1 позволяют предположить, что функциональная роль N-конца — улавливать ионы меди, удерживать их и концентрировать вблизи устья канала в восстановленном состоянии. Дистальные части N-концов, направленные во внеклеточную среду, обладают конформационной свободой, а отрицательный заряд, гидрофильность и олигосахаридная цепь препятствуют их слипанию с мембраной и друг с другом. В то же время, если ТМД1 удлинен, как предсказывает изложенный выше анализ гидрофобности, участки, содержащие M-богатые мотивы, окажутся сближенными у устья канала (рис. 4в).

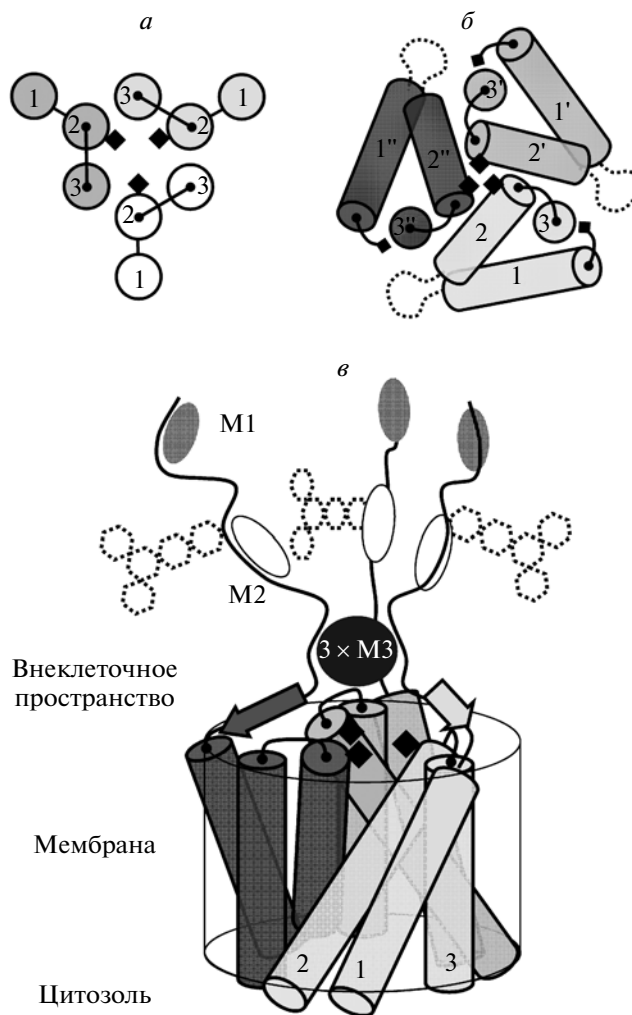


Рис. 4. Модель трансмембранной и внеклеточной части гомотримера CTR1 позвоночных. *а* — Гипотетическое расположение трансмембранных α -спиралей, предсказанное на основании амфипатических свойств ТМД [8]. *б* — Наклонное расположение α -спиралей ТМД на основании электронно-микроскопических данных [14], вид с внеклеточной стороны. *в* — Возможное расположение нуклеофильных сайтов относительно медьпроводящего канала на основании предсказанных свойств последовательностей CTR1. Черные ромбы указывают на положение остатков M154, пунктиром отмечено положение сайта N-гликозилирования у млекопитающих. Цилиндры — условное обозначение α -спиралей, цифры — номера ТМД1–ТМД3. Оттенками серого отмечены индивидуальные полипептидные цепи CTR1 в составе гомотримера.

Предполагаемая роль медьсвязывающих мотивов N-концевого фрагмента CTR1 в транспорте ионов меди, серебра и платины

Эффективность связывания металла с нуклеофильной группой аминокислоты в значительной мере обусловлена соответствием их поляризуемостей, которые количественно характеризуются шкалой жесткости по Пирсону [30]. По этой шка-

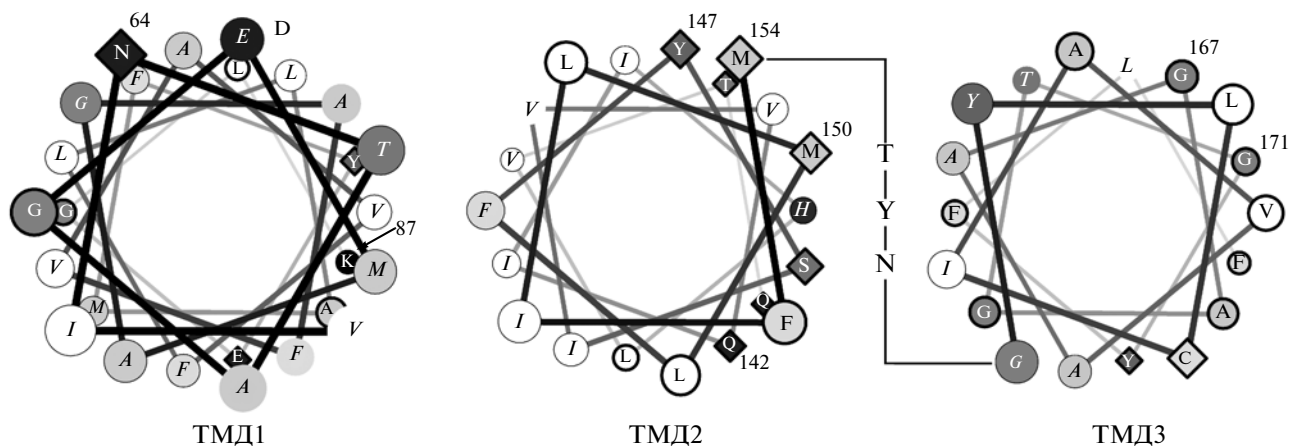


Рис. 5. Спиральная диаграмма потенциальных трансмембранных α -спиралей CTR1 позвоночных (изображены виды спиралей с внеклеточной стороны, последовательность hCTR1, а также внеклеточная петля), демонстрирующая асимметричное распределение нуклеофильных и консервативных остатков. Строго консервативные аминокислоты обведены полужирной линией, из них те, которые содержат нуклеофильные группы, изображены ромбами. Прочие аминокислоты изображены кружками. Более светлые оттенки соответствуют большей гидрофобности. Консервативные заряженные или гидрофобные остатки обведены тонкой линией. Вариабельные остатки – без линий. Буквы – однобуквенный код аминокислотных остатков.

ле медь (I) – наиболее мягкий биогенный электрофил, медь (II) занимает промежуточное положение (табл. 3). Для Cu(I) концепция Пирсона предсказывает взаимодействие с остатками Cys, Met и His, а для Cu(II) – предпочтительное связывание с остатками His. Поэтому медь-связывающие мотивы N-конца CTR1 идеально приспособлены для связывания Cu(I) (мотивы 1 и 3) и Cu(II) (мотивы 1 и 2). Традиционно считалось, что координация меди только остатками Met нетипична. Но новые данные по изучению Cu(I)-связывающих белков прокариот (CusA, PcoA, CopA, CopK, CopC, медь-транспортный шаперон DR1885 и другие) показывают, что сайт, образованный только остатками Met, самостоятелен и широко представлен в эволюции классом Cu(I)-связывающих сайтов [34, 35]. Мотивы CTR1, обогащенные остатками Met, могут рассматриваться как принадлежащие к этому классу. Однако в упомянутых прокариотических белках остатки Met образуют сайт с предпочтительной для Cu(I) квазитетраэдрической геометрией координационной сферы за счет формирования третичной структуры белка. Предварительно сформированная координационная сфера обеспечивает большой хелатный эффект и резко увеличивает аффинность взаимодействия по отношению к целевому иону. Мотивы CTR1, богатые Met, по-видимому, лишены постоянной вторичной структуры. По этой причине их селективность по отношению к различным катионам должна быть меньше, чем у структурно жестких сайтов, однако сродство к ионам может оставаться высоким за счет большого числа нуклеофильных групп. Фактически, вблизи

наружного устья остатки Met мотивов 3 могут образовывать наноклапту тиоэфира (рис. 4в).

Окружение тиоэфирных групп стабилизирует восстановленное состояние ионов меди, “растворенных” в этой капле, и изолирует Cu(I) от воды, предотвращая, тем самым, реакцию диспропорционирования Cu(I). Вероятно, пространственное сближение His-богатых и Met-богатых мотивов создает условия, в которых N-конец CTR1 может функционировать наподобие белка CopC из *Pseudomonas aeruginosa*. В этом прокариотическом белке восстановление меди сопряжено с ее перемещением из His-богатого сайта в Met-богатый сайт [36]. Таким образом, белок CTR1 может осуществлять внутримолекулярное восстановление меди, что подтверждено при исследовании свойств Met/His-богатых пептидов [37]. Сохранение в эволюции позвоночных трех различных медьсвязывающих мотивов, из которых только мотив 3 строго необходим для комплементации утраченного транспорта свободных ионов меди у дрожжей [35], позволяет предположить, что мотивы 1 и 2 необходимы для связывания Cu(II) от внеклеточных доноров в организме.

Проведенный анализ позволяет построить модель селекции рассматриваемых ионов металлов белком CTR1. Свободные ионы Cu²⁺ в кишечнике и медь из комплекса [His₂Cu] связываются мотивом 2, в то время как совокупность мотивов 1 и 2 служит для захвата лабильных ионов Cu(II) от церулоплазмينا [39], главного медьтранспортного белка – донора меди для клеток негепатоцитарных рядов [40]. При наличии донора электрона медь восстанавливается и перемещается в мотив 3, который изолирует ее от водного

Таблица 2. Вариант функционального ручного выравнивания металлсвязывающих мотивов N-конца белка CTR1 позвоночных

Видовое название	Мотив 1 (М/Н-богатый)	Мотив 2 (Н-богатый)	Поли(G) тракт	Мотив 3 (М-богатый)
<i>D. rerio</i>	MDSSHS HHH	D HGGH LTTTGNH GDH	–	MMMM QM
<i>T. nigroviridis</i>	MDHSN MDHS HHLS HPM	HDHGG – DGSSGGH GGH	–	MGMA AM
<i>S. aurata</i>	MDHS HHHH PTM	HDHGGGH GGNQG HEGH	GG	MV VM
<i>S. salar</i>	MDHMDH THH DH SKM	HEDH	GGGGG	FMM KM
<i>X. laevis</i>	MDHS HHM	HQHP –– TTSGGH GGGDH	GGG	CGM FMM PM
<i>X. tropicalis</i>	MDHS HH	HHH –– PTTSGN HGDH	GG	SM FMM QM
<i>P. siculus</i>	MSN HHMA HMG HDM	HHH –– AMTTAGH IHD	GG	MMMM EM
<i>O. anatinus</i>	MDHMDH MDH MNH MNH MNH	HHM –– PTTGS – HGH	GGGG	DMMM PM
<i>C. jacchus</i>	MDHS HHM EM	HHH –– PTTSASH SH	GG	DSN MMMMMM PM
<i>H. sapiens</i> ^a	MDHS HHM GMSY M	HHH –– PATSASH SH	GGG	DS HMMMM PM
<i>P. abelii</i>	MDHS HHM GMSY M	HHH –– PTTSASH SR	GGG	DSS MMMM PM
<i>E. caballus</i>	MDHS HHM GMS HTD H	HHH –– PTTSASH SH	GG	DM DHMMMM PM
<i>C. familiaris</i>	MDHS HHK GT SH M	HHH –– PTTSASH SH	G	EG MEN MMMM EM
<i>A. melanoleuca</i>	MDHS HHK ETS SH M	HHHH –– PTTSASH SH	GG	MDN MMMM EM
<i>B. taurus</i>	MGH SHI MG MN MD M	HHH –– PTTSSD HSH	–	D HMMMM PM
<i>S. scrofa</i>	MDHSA HMG MST HM GMS DM NH	HHH –– PTSSG SH	–	ES MMMM PM
<i>O. cuniculus</i>	?	M TTTASH SH	GGG	DGS MMMM PM
<i>C. griseus</i>	MG MN HMG MN HMG MN HMD HMD MD HM	HHH –– PTT – ASH SH	GGG	D MP PM
<i>M. musculus</i>	MN HMG MN HMG MN HMG MN HMG MN	HHH –– PTTSASH SH	GGG	DS MMMM PM
<i>R. norvegicus</i>	MR MN HMG MN HMG MN HMG MN	HQH –– PTTSASH SH	–	E MMMM PM
<i>M. domestica</i>	MNP GP NH GM NHM	HHH –– PSTTASH IH	GGGGG	HS MMMM PM
<i>G. gallus</i>	MS HHM NSS ML PTT H	HHH –– STASSGG H	G	MMMM AM
<i>T. guttata</i>	MS HHM – NS TL PT SH	HHH –– PSTTASG H SH	–	D MMMM AM

Примечание. Последовательности *M. mulatta* и *P. troglodytes* имеют мотивы, идентичные CTR1 *H. sapiens*, и в таблице не приводятся.

окружения. На этом этапе осуществляется селекция Cu(II) от сходных ионов Zn(II), которые, однако, неспособны к одноэлектронному восстановлению. Met-богатые мотивы 3 не обладают конформационной жесткостью, поэтому специфичность по отношению к меди (I) невелика. Теоретически, эти мотивы должны связывать любые мягкие электрофилы – Cu(I), Ag(I), Hg(II), Pt(II), Au(III)..., что отчасти подтверждается экспериментально [34, 41]. Восстановленные ионы Cu(I) переходят по градиенту свободной энергии от конформационно подвижных мотивов 3 к пространственно организованным остаткам Met154/Met150 в устье канала (за счет увеличения хелатного эффекта), затем к His-Cys-His-домену C-конца и далее, к Cys-X-X-Cys-сайтам медных шаперонов внутри клетки.

Ион серебра (I) – близкий аналог иона меди (I) в силу одинакового строения внешней электронной оболочки (табл. 3), способный образовывать изоструктурные комплексы с Cu(I)-сайтами [42,

43]. Поэтому можно ожидать, что механизм транспорта ионов серебра через CTR1, подтвержденный в экспериментах на клеточных культурах [10, 11], должен быть аналогичен механизму транспорта Cu(I). Ион серебра, являясь мягким электрофилом, вероятно, прямо связывается с мотивом 3 N-конца. Несколько больший размер Ag(I) не является препятствием для транспорта, так как CTR1 не содержит структурно жестких сайтов, а остатки Met, конформационно более подвижные, чем His и Cys, могут легко подстроиться под больший размер иона. Фундаментальным отличием серебра от меди является то, что оно не окисляется до Ag(II) в водных растворах. В условиях конкурентного транспорта Ag(I) и Cu(II) через CTR1 серебро может иметь преимущество, так как медь должна быть предварительно восстановлена. Тем не менее, у многоклеточных животных прямая конкуренция может иметь место *in vivo* только в клетках кишечника, так как другие клетки получают медь преимущественно

Таблица 3. Сравнение характеристик субстратов CTR1

Элемент	Медь		Серебро	Платина	
	Cu ⁺	Cu ²⁺		Pt ²⁺ , “водный ион”	Pt(II), аммиохлоро-комплексы
Состояние	Cu ⁺	Cu ²⁺	Ag ⁺	Pt ²⁺ , “водный ион”	Pt(II), аммиохлоро-комплексы
Ковалентный радиус, пм	132		145		136
Ионный радиус/размер молекулы, пм,	46 {2}	57 {4}	67 {2}	60 {4}	600 × 600 × 200 (цисплатин)
{координационное число}	60 {4}		100 {4}		
	77 {6}		110 {5}		
Электроотрицательность по Полингу	1.90	73 {6}	120 {6}	80 {6}	
Жесткость по Пирсону, эВ	1.90	2.00	1.93	2.28	
Жесткость по Пирсону, эВ	6.3	8.3	6.9	—	1.4 (цисплатин) 1.7 (карбоплатин) 1.3 (оксалиплатин)
Стандартный ОВ потенциал восстановления в водной среде, В	+0.521	+0.153	+0.7996	+1.18 (2e ⁻)	+0.755 (2e ⁻) [PtCl ₄] ²⁻
Стандартный ОВ потенциал окисления в водной среде, В	+0.153	+2.4	+1.98	—	+0.68 (2e ⁻) [PtCl ₄] ²⁻

Примечание. При составлении таблицы жесткости по Пирсону [30, 31] для атомных и ионных радиусов [32] и прочих характеристик [33] использованы данные литературы.

от Cu(II)-переносчиков, изоструктурное связывание серебра с которыми крайне маловероятно. Транспортёр серебра, абсорбированного из желудочно-кишечного тракта, в кровотоке пока не обнаружен. Тем не менее, в печени Ag(I) встраивается в церулоплазмин, который теоретически может быть донором Ag(I) для клеток некоторых органов [15].

Активированные молекулы цисплатина — мягкие электрофилы, поэтому в белках они связываются с остатками Met, Cys и His [44–46]. Комплексы платины с Met термодинамически менее устойчивы, чем комплексы с His или гуаниновыми нуклеотидами, однако кинетически их образование более вероятно [46]. При этом на белках платинируются остатки Met, доступные растворителю [47, 48]. Такие остатки, в соответствии с моделью (рис. 4в), в большом количестве содержатся в N-концевом домене CTR1. Поэтому причина первичного “селективного” связывания платиновых препаратов с CTR1 понятна: активированные формы цисплатина обладают сочетанием положительного заряда и малой жесткости по Пирсону, характерными для ионов Cu(I).

Показано, что у некоторых линий клеток экспрессия CTR1 положительно коррелирует с количеством платины, связавшейся с ДНК [29]. Это указывает на сохранение ДНК-повреждающих свойств платиновых комплексов, прошедших через CTR1. Для эффективного связывания с ДНК некоторые лиганды исходного комплекса платины должны быть сохранены [49], т.е. платина должна транспортироваться в клетку не в виде

иона, а в составе функциональной группы. Размер плоскочадратной молекулы цисплатина — наименьший из всех противоопухолевых цитостатиков, но даже с учетом того, что один из лигандов замещается на аминокислоты, он превосходит размер ионов Cu(I) или Ag(I) и наружного устья канала (табл. 3). Тем не менее, расположение ТМД, установленное с помощью электронной микроскопии [14], допускает их значительную конформационную подвижность. Возможно, за счет согласованного движения ТМД2 работающий канал может принимать конформацию, более близкую к изображенной на рис. 4а, с расширенной до 0.9 нм порой, через которую уже может пройти платиновая группа (~0.6 нм).

Более существенными отличиями, которые исключают перенос платиновой группы по механизму, аналогичному Cu(I), являются энергия образования связи Pt–S(Met) (15–20 кКал/моль) и кинетический *транс*-эффект метионина [50], резко увеличивающий скорость замещения лиганда в *транс*-положении к связи Pt–S(Met). В результате этого, в пептидах, содержащих несколько остатков Met, взаимодействие с цисплатином *in vitro* быстро приводит к образованию полидентантного комплекса с несколькими атомами серы и потере всех исходных лигандов цисплатина [41, 51]. Образование прочного хелатного комплекса практически необратимо и *in vivo* равносильно инактивации как платиновой группы, так и транспортёра. Обойти возникающее противоречие можно, если принять во внимание, что ионы меди (II) способны вытеснять

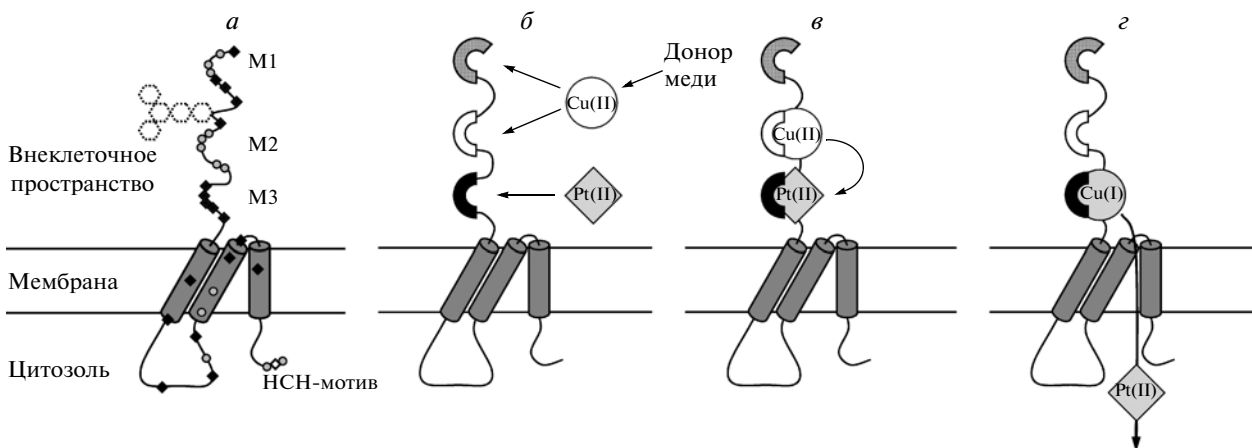


Рис. 6. Гипотетический механизм транспорта цисплатина через CTR1 с участием меди (для наглядности указана только одна из субъединиц гомотримера). *а* – Распределение нуклеофильных остатков – His (кружки) и Met (ромбы) в последовательности hCTR1. *б* – Цисплатин предпочтительно связывается с Met-богатым мотивом 3, в то время как медь(II), поставляемая внеклеточным донором, связывается с His-богатыми мотивами 1 и 2. *в* – Медь перемещается из мотива 2 в мотив 3, катализируя расщепление платинового аддукта и предотвращая его необратимое полидентатное связывание с транспортером. *г* – В результате платиновый комплекс проходит через медьпроводящий канал. Полу-кружиями условно обозначены металл-связывающие домены N-конца CTR1.

платину из комплексов с метионином, разрушая связи Pt–S [52]. При этом монодентатные комплексы платины, возникающие при первичном взаимодействии цисплатина с CTR1, теоретически могут эффективно расщепляться медью, транспортируемой через канал, до того как успеет образоваться прочный хелатный комплекс, инактивирующий транспортер. Схема соответствующей модели приведена на рис. 6.

В соответствии с этой моделью активированные платиновые группы связываются с Met-богатым мотивом 3. His-богатый мотив 2 в норме содержит медь(II), поступившую от внеклеточных доноров и ожидающую восстановления. В силу пространственного сближения этих мотивов создаются идеальные условия для вытеснения платиновой группы ионом меди. Данная модель предполагает возникновение в определенных условиях положительной корреляции между транспортом меди и поступлением цисплатина в клетки. Такой эффект, свидетельствующий в пользу предложенной гипотезы, обнаружен нами у крыс, получавших Ag-диету, концентрация меди в сыворотке крови которых снижена в 10 раз [16]. В опытах на клеточных культурах часто наблюдается конкуренция между импортом меди и цисплатина, индуцированная добавлением в среду больших – нефизиологических – количеств ионов меди. Это не противоречит предлагаемой нами модели, так как в таких условиях медь-связывающие мотивы CTR1 перегружены медью, которая препятствует первичному связыванию активированных платиновых комплексов хотя бы в силу электростатического отталкивания.

Таким образом, представленные в работе результаты позволяют заключить, что структурно-функциональная организация белка CTR1 и, в частности, строение его внеклеточных нуклеофильных сайтов обеспечивают сродство CTR1 по отношению к меди и нетипичным субстратам (серебру и платиновым препаратам), транспорт которых наблюдается *in vivo*. Эти сайты лишены четких консенсусных последовательностей и, по-видимому, жесткой пространственной структуры. Тем не менее, сочетание консервативных в эволюции свойств последовательности этих сайтов полностью соответствует биологической роли внеклеточного домена CTR1, а именно, функции первичного связывания меди и ее удержания в восстановленном состоянии. Наличие пространственно сближенных сайтов для Cu(I) и Cu(II) создает условия для внутримолекулярного восстановления меди и транспорта цисплатина при ее участии.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-01165 и 10-04-90048).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karlin K.D. 1993. Metalloenzymes, structural motif, and inorganic models. *Science*. **261**, 701–717.
2. Rosenzweig A.C., Sazinsky M.H. 2006. Structural insights into dioxygen-activating copper enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 729–735.
3. Madsen E., Gitlin J.D. 2007. Copper and iron disorders of the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 317–337.
4. Mufti A.R., Burstein E., Duckett C.S. 2007. XIAP: Cell death regulation meets copper homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* **463**, 168–174.

5. Martin F., Linden T., Katschinski D.M. 2005. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*. **105**, 4613–4619.
6. Gaggelli E., Kozlowski H., Valensin D., Valensin G. 2006. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem. Rev.* **106**, 1995–2044.
7. Aller S., Unger V. 2006. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 3627–3632.
8. Самсонов С.А., Платонова Н.А., Скворцов А.Н., Цымбаленко Н.В., Васин А.В., Пучкова Л.В. 2006. Активность гена CTR1 и статус меди в различных органах крысы. *Молекуляр. биология*. **40**, 239–251.
9. Sharp P. 2003. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 288–291.
10. Lee J., Pena M.M., Nose Y., Thiele D.J. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* **277**, 4380–4387.
11. Bertinato J., Cheung L., Hoque R., Plouffe L.J. 2010. Ctr1 transports silver into mammalian cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **24**, 178–184.
12. Ishida S., Lee J., Thiele D.J., Herskowitz I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 14298–14302.
13. Kuo M.T., Chen H.H.W., Song I.S., Savaraj N., Ishikawa T. 2007. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 71–83.
14. De Feo C.J., Aller S.G., Siluvai G.S., Blackburn N.J., Unger V.M. 2009. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 4237–4242.
15. Пычехова Е., Скворцов А., Затоловский Е., Тсымбаленко Н., Шавловский М., Бруггини М., Пучкова Л. 2011. Экспериментальное переключение статуса меди в лабораторных грызунах. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **25**, 27–35.
16. Клотченко С.А., Цымбаленко Н.В., Соловьев К.В., Скворцов А.Н., Затоловский Е.А., Бабич П.С., Платонова Н.А., Шавловский М.М., Пучкова Л.В., Броджини М. 2008. Влияние ионов серебра на метаболизм меди и экспрессию генов медьтранспортных белков в печени крыс. *Докл. Акад. Наук. РАН*. **418**, 549–552.
17. Brereton R.G. 2007. *Applied chemometrics for scientists*. Chichester: Wiley and Sons.
18. Engelman D.M., Steitz T.A., Goldman A. 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **15**, 321–353.
19. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. 1994. A mutation data matrix for transmembrane proteins. *FEBS Lett.* **339**, 269–275.
20. Puig S., Lee J., Lau M., Thiele D.J. 2002. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* **277**, 26021–26030.
21. Klomp A.E., Juijn J.A., van der Gun L.T., van den Berg I.E., Berger R., Klomp L.W. 2003. The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized extracellularly, and interacts with itself. *Biochem. J.* **370**, 881–889.
22. Abada P., Howell S.B. 2010. Regulation of cisplatin cytotoxicity by Cu influx transporters. *Met. Based. Drugs*. 2010:317581.
23. van den Berghe P.V., Folmer D.E., Malingré H.E., van Beurden E., Klomp A.E., van de Sluis B., Merckx M., Berger R., Klomp L.W. 2007. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J.* **407**, 49–59.
24. De Feo C.J., Mootien S., Unger V.M. 2010. Trypan blue scanning analysis of the membrane domain of CTR-copper transporters. *J. Membr. Biol.* **234**, 113–123.
25. Gilmore R., Blobel G. 1985. Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell*. **42**, 497–505.
26. Aller S., Eng E., De Feo C., Unger V. 2004. Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J. Biol. Chem.* **279**, 53435–53441.
27. Klomp A.E., Tops B.B., van Den Berg I.E., Berger R., Klomp L.W. 2002. Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem. J.* **364**, 497–505.
28. Guo Y., Smith K., Lee J., Thiele D.J., Petris M.J. 2004. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J. Biol. Chem.* **279**, 17428–17433.
29. Larson C.A., Adams P.L., Jandial D.D., Blair B.G., Safaei R., Howell S.B. 2010. The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 448–454.
30. Parr R.G., Pearson R.G. 1983. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 7512–7516.
31. Sarmah P., Deka R.C. 2008. Solvent effect on the reactivity of CIS-platinum (II) complexes: a density functional approach. *Int. J. of Quantum Chem.* **108**, 1400–1409.
32. Shannon R.D. 1976. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Cryst. Sec. A*. **32**, 751–767.
33. Мищенко К.П., Равдель А.А. 1974. *Краткий справочник физико-химических величин*. Л.: Химия.
34. Rubino J.T., Riggs-Gelasco P., Franz K.J. 2010. Methionine motifs of copper transport proteins provide general and flexible thioether-only binding sites for Cu(I) and Ag(I). *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 1033–1049.
35. Jiang J., Nadas I.A., Kim A.M., Franz K.J. 2005. A metals motif peptide found in copper transport proteins selectively binds Cu(I) with methionine-only coordination. *Inorg. Chem.* **44**, 9787–9794.
36. Zhang L., Koay M., Maher M.J., Xiao Z., Wedd A.G. 2006. Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal struc-

- tures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5834–5850.
37. Haas K.L., Putterman A.B., White D.R., Thiele D.J., Franz K.J. 2011. Model peptides provide new insights into the role of histidine residues as potential ligands in human cellular copper acquisition via Ctr1. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4427–4437.
38. Zhou B., Gitschier J. 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **94**, 7481–7486.
39. Zatulovskiy E., Samsonov S., Skvortsov A. 2007. Docking study on mammalian CTR1 copper importer motifs. *BMC Systems Biology.* **1(S1)**, P54.
40. Linder M.C. 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutat. Res.* **475**, 141–152.
41. Arnesano F., Scintilla S., Natile G. 2007. Interaction between platinum complexes and a methionine motif found in copper transport proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 9062–9064.
42. Long F., Su C.C., Zimmermann M.T., Boyken S.E., Rajashankar K.R., Jernigan R.L., Yu E.W. 2010. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature.* **467**, 484–488.
43. Su C.C., Yang F., Long F., et al. 2009. Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **393**, 342–355.
44. Hahn M., Kleine M., Sheldrick W.S. 2001. Interaction of cisplatin with methionine- and histidine-containing peptides: competition between backbone binding, macrochelation and peptide cleavage. *J. Bioinorg. Chem.* **6**, 556–566.
45. Reedijk J. 1999. Why does cisplatin reach G-N7 with competing S-donor ligands available in the cell. *Chem. Rev.* **99**, 2499–2510.
46. Barnham K.J., Djuran M.I., Murdoch P.D.-S., Sadler P.J. 1994. Intermolecular displacement of S-bound L-methionine on platinum (II) by guanosine 5'-monophosphate. Implications for the mechanism of action of anticancer drugs. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 721–722.
47. Dickerson R.E., Eisenberg D., Varnum J., Kopka M.L. 1969. $PtCl_4^{2-}$: A methionine-specific label for protein crystallography. *J. Mol. Biol.* **45**, 77–84.
48. Ivanov A.I., Christodoulou J., Parkinson J.A., Barnham K.J., Tucker A., Woodrow J., Sadler P.J. 1998. Cisplatin binding sites on human albumin. *J. Biol. Chem.* **273**, 14721–14730.
49. Wei M., Cohen S.M., Silverman A.P., Lippard S.J. 2001. Effects of spectator ligands on the specific recognition of intrastrand platinum-DNA cross-links by high mobility group box and TATA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 38774–38780.
50. Кукушкин Ю.Н. 1985. *Химия координационных соединений*. М.: Высшая школа.
51. Sze C.M., Khairallah G.N., Xiao Z., Donnelly P.S., O'Hair R.A., Wedd A.G. 2009. Interaction of cisplatin and analogues with a Met-rich protein site. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 163–165.
52. Cheng C.-C., Pai C.-H. 1998. Specific displacement of glutathione from the Pt(II)-glutathione adduct by Cu(II) in neutral phosphate buffer. *J. Inorg. Biochem.* **71**, 109–113.