

3. Daugherty, A.M. Accumulation of iron in the putanem predicts its shrinkage in healthy older adults: a multi-occasion longitudinal study / A.M.Daugherty, N. Raz // Neuroimage. – 2016. – Vol. 128. – P. 11–20.
4. Radha, K.S. Iron-mediated stability of PAI-1 mRNA in adenocarcinoma cells-involvement of a mRNA-binding nuclear protein / K.S. Radha et al. // Thromb. Res. – 2005. – Vol. 116, No 3. – P. 255–263.
5. Ornstein, D.L., Zacharski L.R. Iron stimulates urokinase plasminogen activator expression and activates NF-kappa B in human prostate cancer cells / D.L.Ornstein, L.R.Zacharski // Nutr. Cancer. – 2007. – Vol. 58, No 1. – P. 115–126.
6. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Выш. шк., 2013. – Гл. 5. – С. 132–157.
7. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С.Пыжова, В.Н.Никандров // Биоорг. химия. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382–391.

**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА КЛЕТКИ  
ESCHERICHIA COLI, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ N-КОНЦЕВОЙ  
ДОМЕН ВЫСОКО АФФИННОГО ИМПОРТЕРА  
МЕДИ ЧЕЛОВЕКА**

**Санькова Т.П.<sup>1,2</sup>, Орлов Ю.А.<sup>1,2</sup>, Савельев А.Н.<sup>1</sup>, Соснин И.М.<sup>2</sup>,  
Бабич П.С.<sup>3</sup>, Романов А.Е.<sup>2</sup>, Пучкова Л.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет  
информационных технологий, механики и оптики, Россия*

<sup>3</sup>*Российский государственный педагогический университет  
им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*

Медь является структурным и каталитическим кофактором ряда жизненно важных ферментов, требуется для неоваскуляризации, контролирует активность многоцелевых и специфических транскрипционных факторов (HIF1, p53, Sp1, Acl1 и др.), участвует в сигналинге, контролирует клеточный цикл и апоптоз [1, 2].

Нарушения в транспортной системе меди (ТСМ) ведут к освобождению меди из координационных сфер белков-переносчиков и нефизиологическому локальному повышению концентрации меди в клетке. Это способствует развитию тяжелых сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и опухолевых заболеваний [3]

Центральным звеном безопасной ТСМ является консервативный белок CTR1, принадлежащий семейству высоко аффинных транспортеров меди Cu(I) [4]. Белок CTR1 локализуется на плазматической мембране, его функциональная форма состоит из трех идентичных субъединиц, включающих N-концевой внеклеточный домен, трансмембранный домен из трех альфа-спиралей и короткий цитозольный домен [5]. CTR1 также связывает и переносит в клетки абиогенные атомы серебра и цисплатин, эффективный противоопухолевый препарат [6]. Ag(I) изоэлектронен Cu(I), поэтому узнается Cu(I)-переносчиками, однако, не способный к окислению, включаясь в купрозинзимы, нарушает их активность. На этом может быть основано использование серебра для замедления скорости роста опухолей, нуждающихся в повышенном уровне меди [7,8].

В представленной работе полноразмерный эктодомен CTR1 человека (NdCTR1) клонирован в экспрессионном бактериальном векторе и исследовано влияние рекомбинантного белка на чувствительность трансформированных клеток *E. coli* к обработке ионами серебра и наночастицами серебра (AgNP). Индуцированные IPTG клетки *E. coli* BL21 (DE3)/pNdCTR1, синтезируют 34-kDa полипептид, по молекулярной массе, соответствующий слитому белку GST-NdCTR1. Рекомбинантный белок содержит участок, связывающийся с антителами к CTR1.

Токсическое действие ионов и наночастиц серебра на клетки *E. coli* оценивали по их колониеобразующей способности. Данные, представленные на Рис. 1А, показывают, что ионы серебра снижают выживаемость клеток, синтезирующих GST, эффективнее клеток, экспрессирующих GST-NdCTR1. Экспрессия NdCTR1 повышает также устойчивость клеток к действию AgNP в дозо- и время-зависимой манере (Рис. 1В), причем действие наночастиц замедленно по сравнению с ионами серебра. Методом проточной цитометрии показано, что эффект AgNP обусловлен индукцией апоптозоподобного процесса.

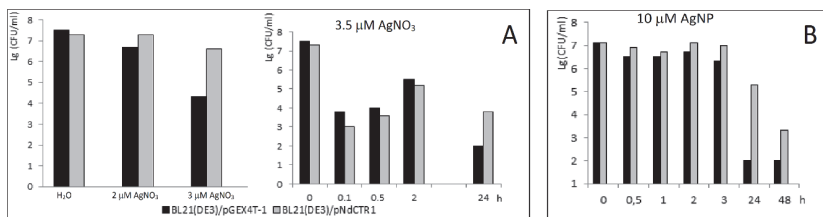


Рис. 1. Выживаемость клеток *E. coli*, экспрессирующих слитый белок GST-NdCTR1 или GST, после обработки ионами (A) и AgNP (B).

О локализации атомов серебра в клетке судили по данным гель-фильтрации лизатов бактерий, обработанных нитратом серебра, GST-активности и измерению концентрации серебра в хроматографических фракциях, а также по данным иммунопреципитации. Не индуцированные клетки *E. coli* поглощают ионы серебра, которые локализуются в высокомолекулярной фракции клеточного лизата (Рис. 2А).

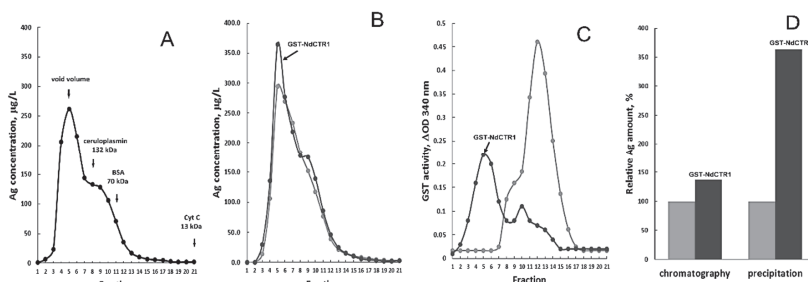


Рис. 2. Гель-хроматография цитозольной фракции клеток *E. coli*, синтезирующих белок GST-NdCTR1 или GST, после обработки нитратом серебра

Эти данные полностью согласуются с наблюдениями, что Ag(I), конкурентно с Cu(I), переносится в бактериальные клетки, связывается с медьтранспортными белками и купроэнзимами, создает дефицит меди для новых поколений клеток, что приводит к остановке размножения бактерий. В клетках *E. coli*, экспрессирующих GST, формируются функциональные гомодимеры (Рис. 2В), с которыми атомы серебра не связываются. В клетках, синтезирующих слитый белок, атомы серебра ко-локали-

зуются с гомодимером и с гомотетрамером GST-NdCTR1 (Рис. 2С). Тотальная концентрация серебра в клетках, экспрессирующих NdCTR, в 2 раза выше, чем в контрольных клетках, экспрессирующих GST (Рис. 2D), при этом выживаемость первых на 3 порядка выше. Тот факт, что рекомбинантный NdCTR1 связывает экзогенные ионы серебра, указывает на его способность интегрироваться в бактериальную систему переноса Cu(I)/Ag(I). Причем хелатирует серебро в химерном белке именно CTR1.

### Литература

1. C. Brady, M. S. Crowe, M. L. Turski, G. A. Hobbs, X. Yao, A. Chaikuad, S. Knapp, K. Xiao, S. L. Campbell, D. J. Thiele and C. M. Counter, Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis, *Nature*. – 2014. – V. 509, – P. 492–496.
2. J. T. Rubino and K. J. Franz, Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function, *J. Inorg. Biochem.*, – 2012. – V. 107, – P. 129–143.
3. H. Kozłowski, P. Kozłowska, J. Watly, K. Krzywoszynska and S. Potocki, General Aspects of Metal Toxicity, *Curr. Med. Chem.*, – 2014. – V. 21, – P. 3721–3740.
4. Gupta and S. Lutsenko, Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential, *Future Med. Chem.*, – 2009. – V. 1. – P. 1125–1142.
5. N. Skvortsov, E. A. Zatulovskii and L.V. Puchkova, Structure-functional organization of eukaryotic high-affinity copper importer CTR1 determines its ability to transport copper, silver and cisplatin, *Mol. Biol. (Mosk)*, – 2012. – V. 46, – P. 335–347.
6. X. Du, X. Wang, H. Li and H. Sun, Comparison between copper and cisplatin transport mediated by human copper transporter 1 (hCTR1), *Metalomics*, – 2012. – V. 4, – P. 679–685.
7. P. S. Babich, A. N. Skvortsov, P. Rusconi, N. V. Tsymbalenko, M. Mutanen, L. V. Puchkova and M. Broggin, Non-hepatic tumors change the activity of genes encoding copper trafficking proteins in the liver, *Cancer Biol. Ther.*, – 2013. – V. 14, – P. 614–624.
8. D. Kovács, K. Szóke, N. Igaz, G. Spengler, J. Molnár, T. Tóth, D. Madarász, Z. Rázga, Z. Kónya, I. M. Boros and M. Kiricsi, Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multi-drug resistant cancer, *Nanomedicine*, 2015. – pii: S1549-9634. – V. 15. P. –207-215.