

BUDOWA I FUNKCJA BIAŁEK Z RODZINY CTR – BŁONOWYCH TRANSPORTERÓW JEDNOWARTOŚCIOWYCH JONÓW METALI

STRUCTURE AND FUNCTION OF PROTEINS BELONGING TO THE
CTR FAMILY – MEMBRANE TRANSPORTERS OF THE MONOVALENT
METAL IONS

Olga PIERZCHAŁA, Mateusz OGÓREK, Aleksandra BEDNARZ,
Małgorzata LENARTOWICZ

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie: Miedź jest mikroelementem, który dzięki swoim zdolnościom oksydoredukcyjnym wbudowany jest w centrum aktywne wielu białek enzymatycznych biorących udział w podstawowych procesach metabolicznych, takich jak oddychanie komórkowe, synteza neurotransmiterów, detoksykacja wolnych rodników, metabolizm żelaza czy formowanie tkanek łącznych. Jednak nadmiar miedzi w komórce jest bardzo toksyczny, dlatego procesy związane z pobieraniem tego pierwiastka są kontrolowane przez białka błonowe należące do rodziny CTR. Białko CTR1 wykazujące wysokie powinowactwo do jednowartościowych jonów miedzi (Cu^+) jest głównym błonowym transporterem uczestniczącym w pobieraniu kationów Cu^+ przez komórkę. CTR1 w formie aktywnej przyjmuje postać homo-trimeru przechodzącego przez błonę komórkową i formuje kanał dla transportu jonów Cu^+ . Ekspresję tego białka stwierdzono we wszystkich rodzajach tkanek i narządów, jednak poziom tej ekspresji i wewnątrzkomórkowa lokalizacja CTR1 zależą od stężenia jonów miedzi. Białko to jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju organizmu w okresie prenatalnym, jak również uczestniczy w regulacji metabolizmu miedzi w trakcie życia postnatalnego. CTR2 jest kolejnym transbłonowym białkiem uczestniczącym w komórkowym transporcie miedzi, ale w przeciwieństwie do CTR1 zlokalizowane jest głównie w obrębie cytoplazmy, gdzie wbudowane jest w błony pęcherzyków, lizosomów i endosomów. Białko to uczestniczy w uwalnianiu miedzi zlokalizowanej w strukturach pęcherzykowych a pochodzącej z rozpadu białek miedziozależnych w komórce. Obydwa białka CTR1 i CTR2 pełnią kluczową rolę w komórkowym transporcie leków antynowotworowych zawierających jony platyny.

Słowa kluczowe: CTR1, CTR2, metabolizm miedzi, transport przez błonę, transport chemioterapeutyków

Summary: Copper is an essential micronutrient which is a cofactor for enzymes that participate in fundamental metabolic processes including respiratory oxidation, neurotransmitter synthesis, iron metabolism, oxygen radicals scavenging and connective tissue formation. However, an excess of copper in cells is highly toxic. That is why cellular copper uptake is highly controlled and mediated by proteins belonging to the CTR family. High affinity copper-transporter 1 (CTR1) is a membrane protein that plays a key role in Cu^+ import into a cell. CTR1 forms a transmembrane homo-trimer with a pore which facilitates Cu^+ movement across the membrane. CTR1 was found to be expressed in all tissues, but its expression pattern and subcellular localization is modulated by changes in intracellular copper levels. CTR1 is not only indispensable in embryo development, but it also regulates copper homeostasis in different tissues during the postnatal period. CTR2 is the next membrane protein, but in contrast to CTR1 it is mainly localized in intracellular membrane structures such as endosomes and lysosomes and it participates in copper recycling from intracellular stores. Of importance, both CTR1 and CTR2 are the principal transporters of platinum- based chemotherapeutic drugs in cells.

Key words: CTR1, CTR2, copper metabolism, transmembrane transport, platinum-based chemotherapeutic drugs transport

WSTĘP

Miedź (Cu) jest pierwiastkiem należącym do pierwszej grupy pobocznej układu okresowego i równocześnie mikroelementem niezbędnym do funkcjonowania organizmów żywych. Jest też trzecim, po żelazie i cynku, najczęściej występującym pierwiastkiem śladowym [77]. Miedź jest metalem przejściowym, posiada więc zdolność do przyjmowania i oddawania elektronów, dzięki czemu może ona występować zarówno w formie utlenionej (Cu^{2+}) jak i zredukowanej (Cu^+). Dlatego pierwiastek ten jest wbudowany w centra aktywne wielu enzymów biorących udział w kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu procesach metabolicznych [20, 50, 51], takich jak oddychanie mitochondrialne, obrona przed wolnymi rodnikami, synteza neuroprzekaźników, produkcja kolagenu i elastyny, synteza melaniny czy metabolizm żelaza [13, 22, 50]. Obecnie znanych jest około 30 białek, zarówno enzymatycznych jak i nieenzymatycznych, które zawierają w swoim składzie jony tego metalu. Jednak pomimo swojej znaczącej roli, miedź w zbyt wysokim stężeniu jest toksyczna, gdyż przyczynia się do powstania wolnych rodników tlenowych, które mają właściwości silnie utleniające, przez co niszczą strukturę białek, lipidów i kwasów nukleinowych [13, 35, 50, 77].

Zaburzenia metabolizmu miedzi prowadzą do ciężkich syndromów metabolicznych, takich jak choroba Menkesa czy choroba Wilsona [51, 77]. Nieprawidłowości w metabolizmie miedzi mogą przyczyniać się także do rozwoju chorób serca, cukrzycy oraz rozwoju otyłości, gdyż pierwiastek ten bierze również udział w biosyntezie kwasów tłuszczowych i węglowodanów, co sugeruje wysoką wrażliwość biosyntezy

lipidów na zmiany w stężeniu jonów miedzi i udział tego pierwiastka w metabolizmie tłuszczów [27, 28]. Zaburzenia metabolizmu miedzi stwierdzono w przypadku wielu chorób neurologicznych i neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera [19, 55], neuropatia ruchowa [34] czy prionowe zapalenie mózgu [9]. Dlatego tak ważne jest poznanie mechanizmów, które kontrolują pobieranie tego pierwiastka przez komórki, jak również jego transport i wewnątrzkomórkowy metabolizm.

OGÓLNOUSTROJOWY METABOLIZM MIEDZI U SSAKÓW

Miedź jest mikroelementem absorbowanym z pokarmu w jelicie cienkim, a szczególnie w jego pierwszym odcinku, dwunastnicy, skąd trafia do krwioobiegu. Nie jest jednak do końca wyjaśnione, jakie białka uczestniczą w transporcie jonów miedzi z treści pokarmowej do komórek nabłonka jelitowego. Przypuszcza się, że częściowo pierwiastek ten jest pochłaniany na drodze endocytozy/pinocytozy lub jest aktywnie transportowany przez białko DMT1 (ang. *Divalent Metal Transporter 1*) [30, 56]. Następnie miedź jest transportowana z enterocytów do krwioobiegu przy udziale białka ATP7A [69]. W osoczu krwi jony miedzi nie występują w stanie wolnym, ale są przyłączone do albuminy, histydyny i glutationu. W postaci tych kompleksów miedź wraz z krwią rozprowadzana jest po całym organizmie [51]. Głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm miedzi jest wątroba. To właśnie wątroba gromadzi największą ilość tego pierwiastka [49, 81]. W hepatocytach zachodzi synteza ceruloplazminy (Cp), białka, które w każdej swojej cząsteczce wiąże 6 atomów miedzi, a po uwolnieniu do krwioobiegu pełni rolę głównego czynnika utrzymującego homeostazę tego mikroelementu. Warto dodać, że aż 65-70% miedzi w osoczu związana jest właśnie z Cp. Obok ceruloplazminy w wątrobie produkowana jest również, metalotioneina – bogate w cysteinę białko wiążące nadmiar miedzi w organizmie. Narząd ten pełni również ważną rolę w okresie prenatalnym – w trakcie życia płodowego w wątrobie płodu gromadzone są zapasy miedzi, które młody organizm wykorzystuje w pierwszych dniach samodzielnego życia [11, 49].

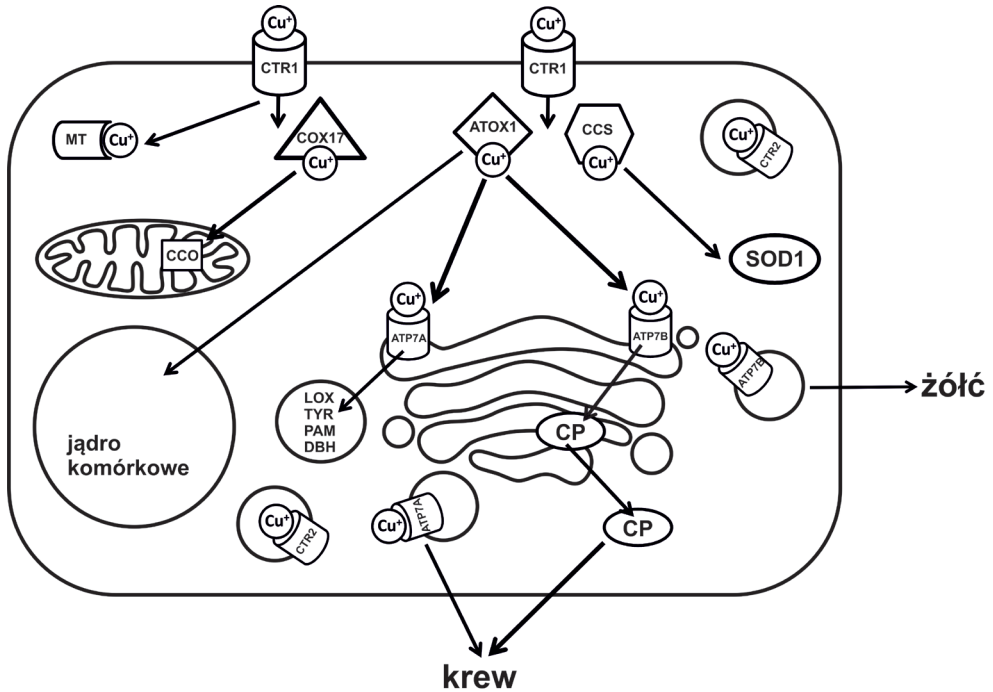
W wątrobie zachodzi również produkcja żółci, w której zawartość miedzi jest największa spośród wszystkich mikroelementów [81]. Również nadmiar Cu jest wydzielany do żółci, która następnie trafia do jelit i wraz z kałem zostaje wydalona z organizmu. W taki sposób 98% miedzi jest usuwane z organizmu. W nerkach podczas filtracji kłębuszkowej część miedzi trafia do przesączu pierwotnego, a w kanalikach krętych proksymalnych ulega reabsorpcji i jest zwracana do krwioobiegu. Jony, które nie zostaną zreabsorbowane są wydalane wraz z moczem. Około 2% miedzi jest usuwane właśnie tą drogą [50, 81].

WEWNĄTRZKOMÓRKOWY METABOLIZM MIEDZI

Jak wspomniano wcześniej, miedź jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego rozwoju wszystkich żywych organizmów, jednak nadmiar miedzi jest toksyczny, dlatego też organizmy jedno- i wielokomórkowe wykształciły precyzyjne i podlegające kontroli genetycznej mechanizmy pozwalające na zachowanie homeostazy tego pierwiastka. Pobieranie miedzi przez komórkę, jej transport w obrębie komórki, jak również usuwanie jej nadmiaru podlega ścisłej regulacji i zachodzi przy udziale specyficznych białek. Zredukowane jony miedzi (Cu^+) pobierane są przez komórkę przy udziale białka CTR1 [18, 37, 42]. W cytoplazmie jony miedzi wiązane są przez cząsteczki metalotioneiny lub przez białka opiekuńcze (chaperony) i w połączeniu z nimi transportowane do różnych organelli komórkowych. Po połączeniu z białkiem chaperonowym ATOX1 kationy miedziowe transportowane są do aparatu Golgiego, gdzie wiązane są przez białka ATP7A i ATP7B, które pośredniczą w przyłączaniu kationów miedziowych do cząsteczek apoenzymów. Przy udziale białka ATP7B jony Cu^+ przyłączane są do ceruloplazminy. Za pośrednictwem białka ATP7A jony miedzi wbudowywane są do cząsteczek tyrozynazy, oksydazy lizylowej, monoooksygenazy-peptydylo-glicylo-alfa-amidowej (PAM) czy β -monoooksygenazy dopaminy (DBH). Nadmiar jonów miedzi usuwany jest z komórki na drodze egzocytozy przy udziale białka ATP7A (ryc. 1). Kationy miedziowe usuwane są z komórki przy udziale białek ATP7A i ATP7B, natomiast pobieranie miedzi przez komórki organizmów eukariotycznych odbywa się za pomocą białek CTR, tworzących rodzinę transporterów miedziowych. [11, 20, 50, 51].

TRANSPORTERY BŁONOWE Z RODZINY CTR

Podstawową biologiczną funkcją białek z rodziny CTR jest transport miedzi przez błonę komórkową i związanie kationów tego pierwiastka, a następnie udostępnienie go następnej grupie białek – metalochaperonom (ATOX1, COX17, CCS) i innym nośnikom, takim jak np. glutation czy metalotioneina. W przypadku zbyt wysokiego stężenia jonów miedzi w środowisku zewnątrzkomórkowym, następuje internalizacja białka CTR1 do wnętrza komórki na drodze endocytozy, a następnie jego przemieszczenie w błonie pęcherzyków w głębsze partie cytoplazmy [18, 21, 40]. Poprzez wiązanie jonów miedzi, udostępnienie jej innym grupom białek opiekuńczych oraz przez zmianę lokalizacji w przypadku zbyt wysokiego stężenia tego pierwiastka, białko CTR1 już na etapie transportu błonowego wpływa na wewnątrzkomórkowe utrzymanie homeostazy miedzi i przeciwdziała wzrostowi zawartości miedzi w komórce do poziomu toksycznego [18, 40, 60, 61]. Niewiele wiadomo na temat funkcji białka CTR2. Prawdopodobnie bierze ono udział w magazynowaniu miedzi w pęcherzykach cytoplazmatycznych, a także pomaga w transporcie jonów miedzi z tych organelli do cytoplazmy [60, 61, 80].



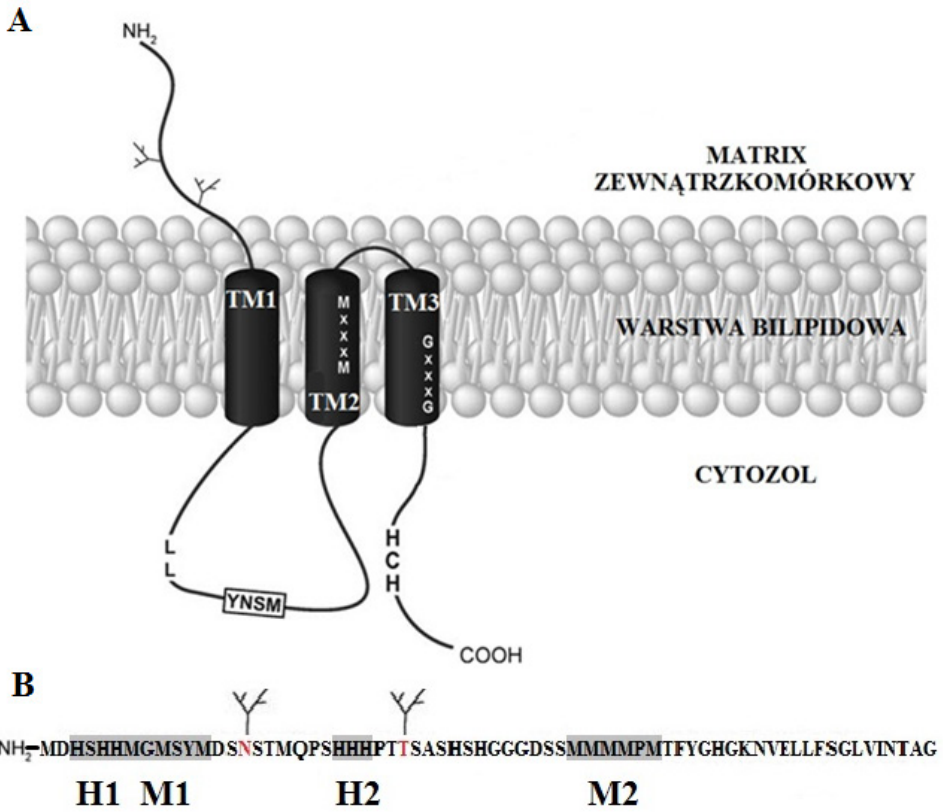
RYCINA 1. Wewnątrzkomórkowy metabolizm miedzi ssaków. Zredukowane jony Cu^+ są pobierane przez komórkę poprzez białka CTR1. W cytoplazmie jony Cu^+ są wiązane przez cząsteczki metalotio-
neiny (MT) lub metalochaperony (ATOX1, COX17, CCS). Poszczególne białka opiekuńcze transportują atomy miedzi do różnych organelli komórkowych: COX17 do mitochondrium, ATOX1 do aparatu Golgiego i jądra komórkowego (gdzie działa on również jako czynnik transkrypcyjny), a CCS do dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1). W aparacie Golgiego miedź jest przyłączana do białek ATP7A i ATP7B, które pośredniczą w przyłączaniu atomów Cu do apoenzymów. Białko ATP7A wbudowuje Cu do cząsteczek oksydazy lizylowej (LOX), tyrozynazy (TYR), monoooksygenazy peptydylo-glicylo-
-alfa-amidowej (PAM) czy β -monoooksygenazy dopaminy (DBH). Białko ATP7B przyłącza miedź do ceruloplazminy (CP), która jest następnie transportowana do krwi. Nadmiar jonów miedzi usuwany jest z komórki przez białko ATP7A, a w wątrobie przez białko ATP7B, do żółci.

FIGURE 1. Intracellular copper metabolism in mammals. Copper uptake, in the form of cuprous ions (Cu^+), is mediated by the CTR1 protein. In the cytoplasm Cu^+ ions are bound to metallothionein (MT) or to the cytosolic copper chaperones (ATOX1, COX17, CCS) and transported to different cellular compartments. COX17 delivers copper to mitochondria, ATOX1 to Golgi apparatus or nucleus and CCS to the site of SOD1 synthesis in the cytoplasm. ATOX1 participates in copper delivery to ATP7A and ATP7B proteins localized in the Golgi apparatus. Both ATP7A and ATP7B transfer copper to the lumen of secretory pathway of copper-dependent enzymes. ATP7A delivers copper to tyrosinase (TYR), lysyl oxidase (LOX), peptidyl-alpha-amidating monooxygenase (PAM) and dopamine β -hydroxylase (DBH). ATP7B is a mediator in binding Cu^+ ions to ceruloplasmin (CP), which is next secreted to the blood. Excess copper is removed from the most cells *via* ATP7A. In hepatocytes this function is fulfilled by ATP7B, which is involved in copper excretion to the bile

STRUKTURA BIAŁKA CTR1

U różnych grup *Eucaryota* stwierdzono od jednego do sześciu białek z rodziny CTR. U drożdży zidentyfikowano 3 takie białka (yCTR1, yCTR2 i yCTR3), u rzodkiewnika pospolitego występuje 5 takich białek, natomiast u myszy i człowieka – dwa (CTR1 i CTR2). U poszczególnych gatunków białka CTR różnią się liczbą aminokwasów, która waha się od 140 do 500, jednak ich plan budowy pozostaje bardzo podobny. Transportery CTR są białkami błonowymi, które w postaci monomeru zbudowane są z sześciu domen: domeny N-końcowej, trzech domen transbłonowych, cytoplazmatycznej domeny łączącej pierwszą i drugą domenę transmembranową oraz domeny C-końcowej. Koniec karboksylowy łańcucha znajduje się w cytozolu, natomiast koniec aminowy zlokalizowany jest na zewnętrznej powierzchni komórki [4, 14, 22]. Budowa białek CTR zostanie przedstawiona na przykładzie białka CTR1. Białko to w formie monomeru zbudowane jest ze 190 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 35 kDa [61]. CTR1 jest białkiem o wysokim powinowactwie do zredukowanej formy jonów miedzi (Cu^+) [32]. Przyjmuje się, że N-końcowa domena zbudowana z 67 aminokwasów, zlokalizowana na zewnętrznej stronie błony komórkowej odgrywa najważniejszą rolę w wiązaniu jednowartościowych jonów miedzi (ryc. 2). U człowieka domena N-końcowa białka CTR1 zawiera kilka konserwatywnych reszt metioninowych i histydynowych tworzących tak zwane motywy Mets (ang. *Mets motifs*) [67]. W skład motywów Mets wchodzi dwa bogate w metioninę klaster w pozycjach 7-12 (MGMSYM) i 40-45 (MMMMPM) oraz dwa klaster bogate w histydynę w pozycjach 3-6 (HSHH) i 22-24 (HHH). Motywy Mets odgrywają ważną rolę w procesie przyłączania miedzi i transportu kationów Cu^+ do wnętrza komórki (ryc. 2). Okazało się, że obecność samych motywów bogatych w aminokwasy zawierające w swoim składzie atomy siarki znacznie zwiększa powinowactwo białka do metalu w procesie transportu [14, 17, 43, 60, 64].

Białko CTR1 ulega N- i O-glikozylacji w domenie N-końcowej łańcucha [52] (ryc. 2). Konsekwencje przyłączenia podstawnika – N-oligosacharydu, nie zostały jeszcze wyjaśnione. Wiadomo jednak, że usunięcie reszty cukrowej białka CTR1 w pozycji 15 w domenie N-końcowej skutkuje znacznym obniżeniem wydajności transportu miedzi, nie prowadzi jednak do relokalizacji samego białka do cytoplazmy [52]. Natomiast dołączane O-glikany są najprawdopodobniej zaangażowane w stabilizację CTR1. O-glikozylacja Thr27 białka CTR1 chroni 30-aminokwasowy fragment łańcucha N-końcowego przed cięciem proteolitycznym [52]. Konsekwencje tej modyfikacji potranslacyjnej nie są jednak dobrze poznane. Zewnątrzkomórkowa domena N-końcowa przechodzi w pierwszą z trzech domen transmembranowych TM1-TM3 kotwiczących monomer białka w warstwie bilipidowej komórki [3, 47, 79]. Domena TM1 nie zawiera charakterystycznych, wysoce konserwatywnych, kluczowych dla transportu jonów sekwencji aminokwasów, a bierze tylko udział w stabilizacji struktury wewnątrzłonowej białka CTR1.



RYCINA 2. Schemat przedstawia budowę monomeru białka CTR1. A) Na schemacie uwzględniono domenę N-kończącą, znajdującą się na zewnątrz komórki, trzy domeny transmembranowe (oznaczone TM1-3) wraz z leżącymi w nich motywami M-xxx-M oraz G-xxx-G, pętlę monomeru z charakterystycznym motywem dileucynowym i motywem YNSM oraz końcową domenę z motywem HCH, znajdującą się w cytozolu. B) W domenie N-kończącej oznaczono motywy Mets (szare tło, klaster bogate w metioninę: M1 i M2, klaster bogate w histydynę: H1 i H2) oraz miejsca N- i O-glikozylacji (szary kolor czcionki, oznaczone znakiem: Y)

FIGURE 2. Schematic structure of the monomer of CTR1 protein. A) The scheme includes: N-terminus domain of CTR1 protein located at the extracytoplasmic side of the membrane, three transmembrane helices (TM1-3) containing M-xxx-M and G-xxx-G motifs, cytoplasmic loop with characteristic dileucine and YNSM motifs and C-terminus domain containing HCH motif. B) The N-terminus domain of hCTR1 contains: Mets motifs (gray boxes), motifs rich in methionine (M1 and M2) and histidine (H1 and H2), residues and sites of N- and O-glycosylation (marked as Y)

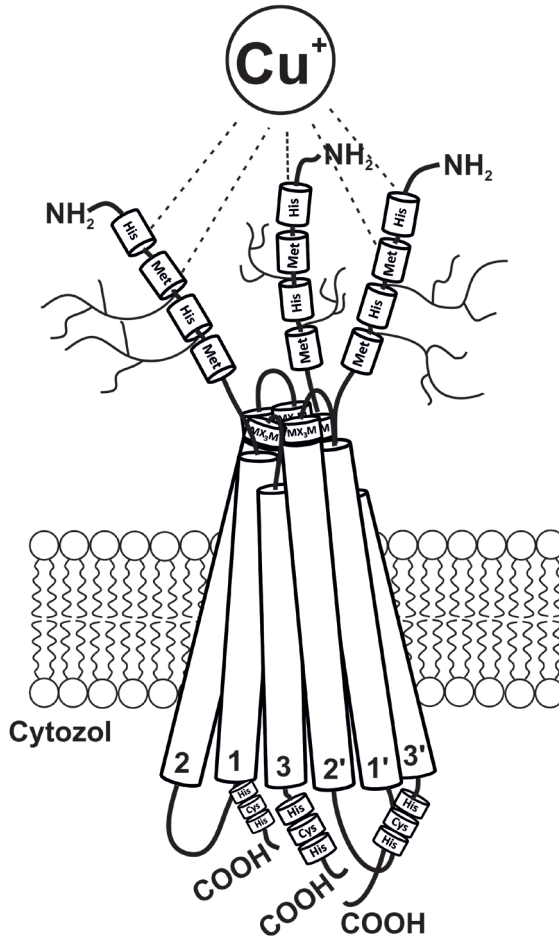
Pomiędzy pierwszą a drugą transmembranową domeną białka CTR1 znajduje się cytoplazmatyczna pętla z wysoce konserwatywnymi dwiema leucynami oraz motywem YNSM odpowiadającym prawdopodobnie za internalizację białka [78]. W obrębie drugiej helisy transmembranowej znajduje się konserwatywny motyw

M-xxx-M – kolejny bogaty w metioninę klastery [16, 67] (ryc. 2). Badania z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenезy przeprowadzonej na kulturach komórkowych *in vitro* wykazały, że motyw ten (a dokładnie dwie metioniny położone w pozycji Met-150 i Met-154) jest kluczowy dla aktywności CTR1 jako transportera, a tym samym dla importu miedzi do wnętrza komórki [21]. Jak się okazało motyw M-xxx-M bierze dodatkowo udział w procesie stymulacji endocytozy i degradacji białka CTR1 [14, 16, 21, 67]. Z kolei w trzeciej helisie transmembranowej znajduje się motyw G-xxx-G, który jest związany z interakcjami zachodzącymi w procesie łączenia monomerów białka w homo-trimer, czyli funkcjonalną postać transportera [3, 4]. Pod wpływem jonów miedzi dochodzi do zmian konformacyjnych białka i odsłonięcia tych motywów elementom biorącym udział w procesie endocytozy, co następnie prowadzi do internalizacji CTR1 i ewentualnie jego późniejszej degradacji [82]. W domenie C-końcowej białka CTR1 znajduje się konserwatywny, bogaty w histydynę motyw H-C-H, wiążący jony Cu^+ , a tym samym chroniący komórkę przed niekontrolowanym wnikaniem wolnych jonów do cytozolu (ryc. 2) [18, 21, 40].

FORMOWANIE OLIGOMERU I TRANSPORT JONÓW Cu^+

Białka CTR podlegają homo-oligomeryzacji formując struktury wbudowanych w błonę oligomerów i tworząc kanały, przez które następuje transport jonów miedzi do wnętrza komórki [3, 18, 39, 45, 67, 87]. Zgodnie z powyższym białko CTR1 w postaci monomeru nie może formować kanału potrzebnego dla transportu kationów miedziowych przez błonę [3, 18, 39, 45]. Białko to tworzy homo-trimer zbudowany z trzech podjednostek i 9 helis transbłonowych. Występujące w postaci trimery, wbudowane w błonę białka CTR1 ma kształt skręconego stożka, zwężonego od strony zewnątrzkomórkowej i poszerzającego się w kierunku do wnętrza komórki tworząc kanał, który w swoim najwęższym miejscu posiada średnicę 9 Å [16] (ryc. 3). Jest to konstrukcja przestrzenna charakterystyczna dla klasycznych kanałów jonowych jak np. kanały potasowe [5]. W formowaniu homo-trimerów ważną rolę odgrywają wzajemne interakcje domen transmembranowych, jak również końców aminowych podjednostek białkowych.

W przypadku białka CTR1 w proces oligomeryzacji zaangażowane są także: cysteina znajdująca się w końcu C łańcucha oraz sekwencja G-xxx-G z trzeciej domeny transmembranowej [3, 18, 39]. Dzięki zastosowaniu technik o wysokiej rozdzielczości do analizy strukturalnej białka, udało się opisać topografię helis w homo-trimerze CTR1. W każdym z trzech monomerów białka CTR1, pierwsza domena transbłonowa (TM1) zostaje przeciągnięta do środka, pomiędzy domeny transbłonowe 2 i 3 (TM2 i TM3). Tworzy się tym samym specyficzna architektura trój-helisowej wiązki (ang. *3-helix bundle*) charakterystyczna dla rodziny transporterów CTR [1, 26] (ryc. 3). Stwierdzono, że od strony wewnątrzkomórkowej białka podjednostki CTR1



RYCINA 3. Rycina przedstawia homo-trimer utworzony przez białka CTR1 w błonie komórkowej. Na rysunku wyszczególniono domeny N-końcowe wraz z motywami Mets i miejscami glikozylacji, domeny C-końcowe z charakterystycznymi motywami Histydyna-Cysteina-Histydyna oraz motywy M-xxx-M (MX3M) znajdujące się w drugiej domenie transmembranowej. Miejsca wiązania Cu^+ oznaczono liniami przerywanymi

FIGURE 3. Scheme depicts the homotrimer of CTR1 protein in cellular membrane. N-terminus domain with Mets motifs and glycosylation sites, C-terminus domain with characteristic Histidine-Cysteine-Histidine motif and M-xxx-M (MX3M) motifs in the second transmembrane domain are shown. Positions of Cu^+ binding sites are marked by dashed lines

łączą się ze sobą za pośrednictwem domen TM2 i TM3 sąsiadujących monomerów. Jednak najważniejszą rolę w formowaniu kanału odgrywają domeny TM2 składowych monomerów, a dokładniej wchodzące w ich skład motywy M-xxx-M. W homo-trimerze domeny TM2 poszczególnych monomerów kierując się w stronę zwężenia

poru do centrum wysuwają się, tak, że w najwęższym miejscu kanału TM2 są jedynymi domenami wchodzącymi w interakcje pomiędzy monomerami CTR1 [18, 21, 67] (ryc. 3). Motyw G-xxx-G znajdujący się w domenie TM3 odpowiada za mocne przyciąganie do siebie domen TM1 i TM3 w obrębie homo-trimeru. Taka struktura kanałów umożliwia transport jonów miedzi przez ich wiązanie do kolejnych sześciu metionin znajdujących się w helisach transmembranowych trimeru CTR [3, 15]. Wiadomo bowiem, że białka z rodziny CTR w swojej budowie nie zawierają domeny wiążącej ATP, pozwalającej na wykorzystanie energii pochodzącej z hydrolizy tego związku, dlatego też proces transportu jonów przez błonę białkowo-lipidową zależny od CTR nie wymaga nakładu energii. Potwierdziły to badania na komórkach linii HEK293, które traktowano substancjami obniżającymi poziom ATP w komórce (antymycyna A, oligomycyna oraz azydek sodu). Wyniki wykazały, że zastosowanie tych związków nie zmniejszało aktywności białek CTR w analizowanych hodowlach komórkowych [45].

Mechanizm samego transportu miedzi przez błonę nie jest dokładnie poznany, jednak istnieje kilka hipotez tłumaczących ten proces. Wiadomo, że białka CTR wykazują powinowactwo do jednowartościowych jonów miedzi, dlatego też kationy dwuwartościowe (Cu^{2+}) muszą najpierw zostać zredukowane. Proces ten jest prowadzony przez oksydoreduktazy znajdujące się na powierzchni komórek. Białka prowadzące proces redukcji Cu^{2+} do Cu^+ zostały dobrze scharakteryzowane u drożdży [63], natomiast w komórkach ssaków rolę oksydoreduktaz pełni prawdopodobnie białka należące do rodziny STEAP (ang. *Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*) [59]. Zredukowane jony miedzi są wiązane przez reszty metioninowe znajdujące się w motywach Mets domeny N-końcowej. Następnie jony te wiązane są przez kolejne reszty metioninowe znajdujące się w domenach transbłonowych, a w końcowym efekcie przez znajdujące się w domenie C-końcowej reszty histydynowe. Przypuszcza się, że dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym na N-końcu białka wytwarzany jest ładunek ujemny, co ma na celu ułatwienie wychwytu dodatnio naładowanych jonów Cu^+ . Z kolei wewnątrz poru – kanału trimeru białka CTR, występuje „środowisko” neutralne, a w domenie C-końcowej powstaje ładunek dodatni. W ten sposób cała struktura homo-trimeru formuje się na kształt dipolu, co ułatwia kolejno zewnątrzkomórkowy wychwyt jonów miedzi, ich transport przez wnętrze poru i zakotwiczenie, a następnie przekazywanie jonów do metalochaperonów lub cząsteczek metalotioneiny po stronie cytoplazmatycznej [62].

W C-końcowej domenie białka CTR1 znaleziono sekwencję H-C-H, która, jak się uważa, odpowiada za wiązanie jonów miedzi i przekazywanie ich do innych białek w obrębie komórki [16]. Bezpośrednią interakcję pomiędzy C-końcową domeną białka γCtr1 a metalochaperonem Atx1 stwierdzono u drożdży [22, 83]. W komórkach ssaków nie stwierdzono takich interakcji i do tej pory nie wiadomo w jaki sposób jony miedzi przekazywane są z białka CTR1 do metalochaperonów czy metalotioneiny [61].

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA BIAŁKA CTR1

W zależności od stężenia miedzi w otoczeniu komórki, jak również w samej komórce białko CTR1 zlokalizowane może być w błonie cytoplazmatycznej oraz/lub w strukturach pęcherzykowych w obrębie cytoplazmy. Lokalizacja tego białka oraz stosunek ilości białka zlokalizowanego na błonie do białka w cytoplazmie zależą też od rodzaju komórki [21, 22, 42, 56]. Analiza immunohistochemiczna wykazała lokalizację białka CTR1 w błonie komórkowej komórek linii HEK293, CaCo-2 czy A2780; natomiast komórki Hela, HepG2, A549, H441 wykazywały znacznie większą ekspresję białka CTR1 w wewnątrzkomórkowych strukturach pęcherzykowych niż w błonie komórkowej [37, 40]. Powód różnic lokalizacji tego białka w zależności od rodzaju komórki nie jest do końca poznany, ale przypuszcza się, że lokalizacja zależy od zapotrzebowania różnych typów komórek na jony tego pierwiastka, jak również od różnego poziomu ekspresji innych białek związanych z metabolizmem Cu w różnych typach komórek [40, 61]. Jednak głównym czynnikiem regulującym ilość białka CTR1 w błonie komórkowej jest stężenie jonów miedzi w matriks zewnątrzkomórkowym. W stałych warunkach białko CTR1 cyrkuluje pomiędzy błoną a organellami wewnątrzkomórkowymi [40]. Proces sprawnej regulacji stężenia białka CTR1 w błonie komórkowej zależy od motywów Mets położonych w N-końcowej domenie białka [21]. Jeżeli stężenie jonów miedzi jest wysokie ($200\mu\text{M CuCl}_2$) dochodzi do nagłej internalizacji CTR1, endocytozy i jego degradacji [65], co chroni komórkę przed toksycznym działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi. Zdarza się także, że białko CTR1 ulega procesowi endocytozy również w sytuacji, gdy poziom zewnątrzkomórkowych jonów miedzi jest niski, gdyż jak wykazano CTR1 bierze również udział w uwalnianiu miedzi zlokalizowanej w wewnątrzkomórkowej frakcji edosomalnej/lizosomalnej [60]. Z tym zjawiskiem związany jest konserwatywny motyw MMMMPM znajdujący się w pobliżu pierwszej domeny transbłonowej [21].

Istnieją pewne kontrowersje w kwestii lokalizacji białka CTR1 w komórkach spolaryzowanych. Badania prowadzone na liniach komórkowych Caco-2 (linia komórkowa spolaryzowanych, ludzkich komórek nabłonkowych jelita) wykazały, że białko CTR1 zlokalizowane jest w komórkach spolaryzowanych tylko i wyłącznie w błonie bazolateralnej. Wyniki te potwierdziły eksperymenty na komórkach epitelialnych jelita myszy [88]. Jednak wyniki szeroko zakrojonych badań przeprowadzonych na komórkach epitelialnych jelita mysiego i szczurzego [6, 42, 58] oraz na enterocytach jelita szczura, myszy i świni [56] wskazują na ekspresję białka CTR1 w błonie apikalnej jelita. Kontrowersje wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań dotyczących lokalizacji białka CTR1 w komórkach spolaryzowanych, gdyż, jak się wydaje, jego lokalizacja bazolateralna i apikalna w komórkach spolaryzowanych może zależeć od stanu fizjologicznego, bądź od dostępności jonów miedzi.

BUDOWA I FUNKCJA BIAŁKA CTR2 – PODOBIENSTWA I RÓŻNICE DO BIAŁKA CTR1

CTR2 to drugie białko z rodziny CTR, jednak jego funkcja poznana jest w mniejszym stopniu niż białka CTR1. Pomimo, że białka CTR1 i CTR2 wykazują jedynie 33% homologii na poziomie sekwencji aminokwasów, to jednak ich plan budowy jest bardzo podobny [37, 61]. W formie monomeru CTR2 zbudowane jest ze 143 aminokwasów i podobnie jak CTR1 jest białkiem błonowym. Jednak domena N-końcowa, jak i cytoplazmatyczna domena C-końcowa białka CTR2 są znacznie krótsze niż w białku CTR1 [14, 17, 32, 62, 78]. W domenie N-końcowej białka CTR2 nie występują motywy Mets, a obecność pojedynczego bogatego w metioninę motywu pozwala na wiązanie kationów miedziowych. Przypuszcza się, że to właśnie brak motywów Mets tłumaczy mniejsze powinowactwo białka CTR2 do jonów miedzi w porównaniu do białka CTR1 [7, 22, 78]. W transmembranowych domenach TM2 i TM3 CTR2 zachowane są konserwatywne motywy warunkujące wiązanie jonów miedzi oraz odpowiedzialne za proces oligomeryzacji, występujące również w białku CTR1. Podobnie jak przypadku białka CTR1 w cytoplazmatycznej pętli łączącej TM1 i TM2 CTR2 występuje motyw dileucynowy. Dodatkowo sekwencję tę znaleziono w C-terminalnej domenie białka CTR2, co prawdopodobnie zwiększa jego właściwości internalizacyjne. Motyw ten jest charakterystyczny dla wielu innych białek, w tym białka ATP7A i może wyjaśniać wewnątrzkomórkowe położenie CTR2. Co istotne, C-końcowa domena CTR2 nie zawiera sekwencji H-C-H, która w białku CTR1 pozwalała na związanie jonów miedzi i ewentualną interakcję z metalochaperonem ATOX1 [61]. Białko CTR2 nie ulega też procesowi glikozylacji [53, 60, 61]. Podobnie jak CTR1, białko CTR2 również ulega procesowi oligomeryzacji i tworzy trimer o budowie podobnej do białka CTR1 [4, 14, 78]. Obecne badania wykazały, że tylko 5% białka CTR2 zlokalizowane jest w błonie plazmatycznej, zaś pozostałe 95% ma lokalizację wewnątrzkomórkową [7]. W komórce białko CTR2 zlokalizowane jest w endosomach i lizosomach, gdzie odpowiada za eksport miedzi z tych organelli do cytoplazmy [70]. Przypuszcza się, że białko to może brać udział w uwalnianiu jonów miedzi, pozostałych po rozpadzie miedziозależnych białek, z lizosomów do cytoplazmy, gdzie kationy miedziowe mogą być ponownie wykorzystane w procesach metabolicznych [22]. Wyniki najnowszych badań wykazały również, że białko CTR2 reguluje aktywność białka CTR1 [60].

GENY KODUJĄCE BIAŁKA CTR1 I CTR2

U człowieka geny kodujące białka CTR1 (*hCTR1 SLC31A1*) i CTR2 (*hCTR2, SLC31A2*) zlokalizowane są na jednym autosomie, w ramieniu długim chromosomu 9 (9q32) [86]. Gen *hCTR1* składa się z 4744 nukleotydów uorganizowanych w pięć

eksonów, natomiast gen *hCTR2* posiada cztery eksony o łącznej długości 1785 nukleotydów [54, 86] (tab. 1). Odkrycie genów *hCTR* u człowieka poprzedzone było odkryciem dwóch genów *yCtr1* i *yCtr3* kodujących odpowiednio białka Ctr1 i Ctr3 u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) [12, 31, 41]. Geny *hCTR1* i *hCTR2* odkryto w 1997 roku, wykorzystując zmutowane szczepy drożdży, u których pobieranie miedzi było zaburzone na skutek wyłączenia genu *yCtr1*. Bing Zhou i Jane Gitschier przeprowadzili test komplementacji polegający na zastąpieniu zmutowanego genu ludzkim genem *hCTR1* [86]. Okazało się, że wprowadzony gen koduje białko, które funkcjonalnie zastępuje brakujący transporter u drożdży, mimo iż struktura genu *hCTR1* oraz jego homologu u drożdży – genu *yCtr1* jest podobna tylko w 29%.

TABELA 1. W tabeli przedstawiono różnice pomiędzy *hCTR1* i *hCTR2* u *Homo sapiens* i ich homologów *mCtr1* oraz *mCtr2* u *Mus musculus* na poziomie genu, transkryptu i białka. Geny *hCTR1* i *mCtr1* oraz produkty ich translacji wykazują 90,96% homologii na poziomie nukleotydów oraz 93,09% podobieństwa na poziomie aminokwasów. Natomiast geny *hCTR2* i *mCtr2* wykazują 81,32% homologii na poziomie nukleotydów oraz 78,01% podobieństwa na poziomie aminokwasów. Opracowano w oparciu o bazę danych <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

TABLE 1. Comparison between human (*Homo sapiens*) *hCTR1* and *hCTR2* genes and their mouse (*Mus musculus*) homologues *mCtr1* and *mCtr2* at the level of gene, transcript and protein. There is 90,96% homology at the level of the nucleotide sequence between *hCTR1* and *mCtr1* and 93,09% homology at the level of the amino acid sequence in the protein. Human *hCTR2* exhibits 81,32% similarity to *mCtr2* mouse gene at the level of the nucleotide sequence and 78,01% homology was found at the level of the amino acid sequence in the protein <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Organizm	Nazwa genu	Numer referencyjny	Długość Genu	Liczba eksonów	Lokalizacja	Długość mrna	Długość białka	Produkt genu
<i>Homo sapiens</i>	<i>hCTR1</i> <i>SLC31A1</i>	NM_001859.3	55855 bp	5	9q32	4744 bp	190 aa	<i>hCTR1</i> , CTR1
<i>Homo sapiens</i>	<i>hCTR2</i> <i>SLC31A2</i>	NM_001860.2	35850 bp	6	9q32	1791 bp	143 aa	<i>hCTR2</i> , CTR2
<i>Mus musculus</i>	<i>mCtr1</i> <i>Slc31a1</i>	NP_780299.2	40544 bp	6	4 C1-2	3727 bp	196 aa	<i>mCtr1</i> , Ctr1
<i>Mus musculus</i>	<i>mCtr2</i> <i>Slc31a2</i>	NP_001851.1	23426 bp	6	4 B3	1803 bp	143 aa	<i>mCtr2</i> , Ctr2

Zmutowane komórki drożdży ponownie mogły absorbować miedź ze środowiska, co potwierdzono oznaczając wysokie, wewnątrzkomórkowe stężenie tego pierwiastka. Odnotowano również wzrost wrażliwości tych komórek na wzrost zawartości miedzi w środowisku. Ponadto produkt ludzkiego genu pozwolił na przywrócenie transportu żelaza do komórek, a także prawidłowe działanie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1), enzymu, którego cząsteczka zawiera atom miedzi. Gen *hCTR2* odkryto

przez porównanie sekwencji do genu *hCTR1*, gdyż na etapie sekwencji nukleotydów geny te są podobne w 50% [86] (tab. 1). Warto jednak zauważyć, że próby wprowadzenia genu *hCTR2* do komórek drożdży z delecją genu *yCtr2* nie przywróciły im prawidłowych funkcji życiowych [86].

U człowieka na chromosomie 3 (3q26.31) znaleziono również sekwencję *CTRΨ* (*CTRIP*, *SLC31A1P*) zidentyfikowaną jako pseudogen. Okazało się, że sekwencja ta ulega procesowi transkrypcji jednak dotychczas nie znaleziono produktu translacji tego pseudogenu [22, 54].

Gen *hCTR1* jest ekspresjonowany we wszystkich tkankach organizmu. Szczególnie wysoką ekspresję *hCTR1* stwierdzono w wątrobie, trzustce, nerce, sercu, jajnikach, jądrach oraz w tkance łącznej w gałce ocznej [42]. Niższą ekspresję genu *hCTR1* wykazano w mózgu i mięśniach szkieletowych. W mózgu wysoki poziom transkryptu genu *Ctr1* odnotowano jedynie w splocie naczyniówkowym oraz w endotelialnych komórkach kapilar transportujących krew. Zwiększona ekspresja białka *hCTR1* w tych elementach tkanki mózgowej związana jest z podwyższonym zapotrzebowaniem na miedź, gdyż w komórkach nerwowych jest ona składową wielu enzymów miedziozależnych [22, 42, 86]. Ekspresję genu *hCTR2* również wykryto we wszystkich tkankach, jednak najwyższy poziom osiąga ona w mózgu, śledzionie, trzustce, jądrach oraz w łożysku. Natomiast niższą ekspresję *hCTR2* znaleziono w wątrobie, jelicie cienkim, śluzówce jelita grubego, jajnikach i leukocytach [60, 62, 86].

Ekspresja genów *hCTR1* i *hCTR2* regulowana jest zarówno poprzez zależne jak i niezależne od miedzi czynniki transkrypcyjne. Ekspresja genu *hCTR1* regulowana jest przez zależny od miedzi czynnik transkrypcyjny Sp1 (ang. *Specificity protein 1*) który w swojej strukturze zawiera motyw palców cynkowych, może łączyć się ze specjalnymi miejscami sekwencji promotorowej genu *hCTR1* i w zależności od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów miedzi, reguluje proces jego transkrypcji. Promotor genu *hCTR1* zawiera trzy miejsca wiążące czynnik transkrypcyjny Sp1 – są to sekwencje bogate w nukleotydy GC – tak zwane GC Boxes [75]. Innym czynnikiem regulującym transkrypcję genu *hCTR1* w komórkach jelita jest białko HIF2 α (ang. *Hypoxia-Inducible Factor 2 α*) [66]. HIF2 α jest jednym z czynników transkrypcyjnych odpowiadających na zmiany stężenia tlenu w środowisku zewnątrzkomórkowym, a dokładniej na spadek poziomu tlenu, czyli hipoksję. W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych Caco2 udowodniono, że w warunkach hipoksji komórki te wykazują zwiększoną ekspresję genu importera miedziowego na poziomie mRNA, a także podwyższony poziom samego białka CTR1 [66, 73]. Czynnikiem zwiększającym transkrypcję genu *hCTR1* w komórkach makrofagów jest z kolei interferon- γ (IFN- γ) [85]. Interferon- γ jest czynnikiem aktywującym makrofagi do walki z patogenami. Badania prowadzone na komórkach mysich makrofagów otrzewnowych oraz makrofagach linii RAW264.7 [73, 78] wykazały, że podczas działania mechanizmu obronnego IFN- γ współdziała z białkiem CTR1 zwiększając jego ekspresję, co przyczynia się to do wzrostu wewnątrzkomórkowe-

go stężenia miedzi, jej transportu do fagolizosomów, gdzie miedź pełni mikrobobó-
czą funkcję generując rodniki wodorotlenowe [85]. Innym czynnikiem transkryp-
cyjnym regulującym ekspresję *hCTR1* jest c-Myc.

W roku 2000 scharakteryzowano i opisano geny *mCtr1* i *mCtr2*, kodujące
białka CTR1 i CTR2 u myszy [45, 46] (tab.1). Okazało się, że pomiędzy ludzkim
genem *hCTR1* a mysim *mCtr1* istnieje 93% podobieństwa na poziomie sekwencji
nukleotydów. Myszy są więc doskonałymi zwierzętami modelowymi w badaniach
nad funkcją i ekspresją genów i białek z rodziny CTR.

FUNKCJA BIAŁEK CTR1 I CTR2

Badania przeprowadzone na myszach pozwoliły ustalić, że ekspresja genu
mCTR1 w rozwoju zaczyna się bardzo wcześnie, gdyż stwierdzono ją już u 7-dnio-
wych zarodków. Natomiast wykorzystanie myszy z knockoutem genu *mCTR1*
(*mCTR1*^{-/-}) pokazało, że brak ekspresji tego genu okazał się letalny i homozygo-
tyczne zarodki *mCTR1*^{-/-} zamierały już 9 dnia życia płodowego [42]. Morfologicz-
na i histologiczna analiza struktury zarodków embrionów myszy z knockoutem
genu *mCtr1* (myszy *Ctrl*^{-/-}) wykazała liczne zaburzenia rozwojowe. W 7 dniu ży-
cia płodowego (E7.5) zaobserwowano znaczną redukcję rozmiarów embrionów
Ctrl^{-/-} w porównaniu do embrionów kontrolnych (posiadających funkcjonalny gen
mCtr1). Pomimo iż embriony *Ctrl*^{-/-} zachowały część struktur charakterystycznych
dla rozwijającego się organizmu (np. zawiązki aorty, serca, jelita, worka owodnio-
wego, pęcherzyka żółtkowego, komórki neuroepitelialne czy komórki mezenchy-
malne), to jednak nie stwierdzono u nich struktur neuronalnej ektodermy, czy też
warstw mezodermy, które są konieczne do dalszego, prawidłowego rozwoju [42,
45, 46]. Heterozygoty *mCtr1*^{+/-} rozwijały się normalnie, jednak zawartość miedzi
w ich organach wewnętrznych jak również aktywność miedziozależnych enzymów
(SOD1 oraz oksydazy cytochromu c – CCO) była niższa niż u myszy kontrolnych,
posiadających dwa funkcjonalne allele genu *mCtr1* [42, 45].

Wyniki najnowszych badań wykazały, że na wczesnym etapie rozwoju zarodka
CTR1 transportuje jony Cu⁺ do wnętrza komórki, które są niezbędne do modu-
lowania różnych ścieżek sygnałowych w komórce [46]. W badanych embrionach
Xenopus, produkt genu *Xctrl* – białko *Ctrl*, aktywuje kaskadę kinaz Ras-MAP oraz
współdziała z czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF) i białkiem Laloo, przez co
indukuje proliferację komórek mezodermalnych w czasie rozwoju embrionalnego.
Ponadto wykazano, że embrionalne komórki macierzyste myszy (ES) z upośledzo-
ną ekspresją genu *mCtr1* zachowują cechy komórek pluripotentnych. W związku
z powyższym przypuszcza się, że CTR1 jest kluczowym regulatorem potrzebnym
do prawidłowej morfogenezy zarówno na poziomie komórek macierzystych, jak
i progenitorowych [80]. Ekspresję białka CTR1 stwierdzono również w błonie

bazolateralnej komórek łożyska, co wskazuje na jego rolę w transporcie nadmiaru miedzi z płodu do krwioobiegu matki, co z kolei może zapobiegać jego uszkodzeniu przez nadmiar tego pierwiastka [23]. Okazało się, że w komórkach łożyska stymulacja estrogenami zwiększa aktywność białka CTR1 [23]. Wzrost aktywności tego białka, jak wykazały badania przeprowadzone na myszach, następuje również w czasie ciąży i laktacji. U takich samic w komórkach gruczołu mlekowego wykazano wyższą ekspresję CTR1 na poziomie mRNA, co wskazuje na udział tego białka w procesie pobierania i magazynowania miedzi w gruczołach mlekowych matki, która w późniejszym okresie jest przekazywana wraz z mlekiem potomstwu [33, 42]. Wykazano również, że zarówno prolaktyna (w procesie laktacji u szczurów) jak i insulina (w liniach komórkowych łożyska) reguluje transport miedzi przez relokalizację białka CTR1 w komórce. W komórkach łożyska traktowanych insuliną białko CTR1 zmienia lokalizację bazolateralną na apikalną [23, 33].

Wiele badań poświęcono roli białka CTR1 w utrzymaniu wewnątrzustrojowej homeostazy miedzi. W warunkach fizjologicznych miedź trafia do wszystkich organów. Większe ilości miedzi magazynowane są w wątrobie, a jej nadmiar usuwany jest z żółcią, a także w znacznie mniejszym stopniu z moczem. Jak wiadomo, głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm miedzi w organizmie jest wątroba, w której jak przypuszczano, pobieranie jonów Cu^+ przez hepatocyty zachodzi za pośrednictwem CTR1. Wyniki badań przeprowadzonych na myszach z warunkowym knockoutem CTR1 potwierdziły tę hipotezę, gdyż u zwierząt tych zawartość miedzi oraz aktywność enzymów miedziowych w wątrobie była obniżona, ale nie w stopniu wskazującym na to, że jest to jedyny transporter kationów miedziowych wykorzystywany przez hepatocyty. Ponadto u myszy z takim knockoutem stwierdzono obniżenie zawartości miedzi w żółci i wyższą zawartość miedzi w nerkach, natomiast w innych organach jej poziom nie zmieniał się [38]. U myszy z tkankowo swoistym knockoutem genu *mCtr1* w wątrobie wzrost wydalania miedzi przez nerki jest związany z działaniem mechanizmu kompensacyjnego, który ma za zadanie usunięcie nadwyżki miedzi podczas niedyspozycji wątroby [38]. U dorosłych myszy białko CTR1 wykazuje wysoką ekspresję w kanalikach proksymalnych i dystalnych kory nerki, jednak jego wewnątrzkomórkowa lokalizacja w błonie bazolateralnej lub apikalnej zależy prawdopodobnie od zawartości miedzi w surowicy krwi badanych myszy [38, 88].

Przypuszczano także, że CTR1 jest głównym transporterem jonów miedziowych w komórkach enterocytów. Jednak badania przeprowadzone na myszach z warunkowym knockoutem genu *mCTR1* w jelicie wykazały paradoksalnie, że u zwierząt tych miedź była akumulowana w komórkach enterocytów, co jednoznacznie wskazuje na to, że białko CTR1 nie pośredniczy w pobieraniu jonów miedzi z diety przez enterocyty [58, 88]. Badania nad wewnątrzkomórkową lokalizacją białka CTR1 w komórkach CaCo2 wskazywały na jego lokalizację w błonie bazo-

lateralnej [88]. W przeciwieństwie do tych wyników badacze z grupy Nose [56, 58] wykazali apikalną ekspresję tego białka w komórkach enterocytów. Jak się okazało, problem ten jest bardzo złożony, gdyż na ekspresję i lokalizację wewnątrzkomórkową białka CTR1 wpływają też inne czynniki takie jak wiek badanego osobnika czy rodzaj diety. Badania na myszach 16-dniowych (P16) i 10-tygodniowych wykazały różnice w poziomie ekspresji białka CTR1, a także w jego komórkowej lokalizacji. U myszy młodych (P16), które jeszcze pobierały pokarm od matki, białko CTR1 było obecne w części apikalnej błony komórkowej enterocytów. U myszy dorosłych natomiast, białko CTR1 rozmieszczone było w obrębie cytoplazmy komórek. Dodatkowo u młodych myszy, których matki spożywały pokarm wzbogacony w miedź, ekspresja CTR1 na poziomie białka w komórkach jelita była znacznie wyższa w porównaniu z komórkami pochodzącymi od myszy młodych, których matki dostawały w trakcie karmienia pokarm ubogi w ten pierwiastek [42].

Białko CTR1 bierze również udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu na infekcję bakteryjną. Potwierdzają to wyniki badań prowadzonych na makrofagach pochodzących ze szpiku kostnego myszy, które pod wpływem infekcji komórkami *Salmonella typhimurium* lub traktowane endotoksyną błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych (lipopolisacharydem, LPS) wykazywały wzrost ekspresji genów *mCTR1* i *mCTR2*, *Atp7a* oraz genu kodującego ceruloplazminę (*CP*). Zarówno infekcja bakteriami, jak i działanie LPS na komórki makrofagów, wywołuje akumulację jonów miedzi w komórce, co jest związane z działaniem białka ATP7A zlokalizowanego w tych komórkach w błonie aparatu Golgiego oraz w błonie pęcherzyków cytozolowych [2, 24]. W komórkach makrofagów pod wpływem czynników infekcyjnych następuje wzrost ekspresji CTR1 i podwyższony wychwyty jonów miedzi, które wraz z metalochaperonem ATOX1 trafiają do białka ATP7A. Białko ATP7A ulega relokalizacji w błonie pęcherzyka cytoplazmatycznego i trafia do błony fagolizosomu, do którego oddaje związaną wcześniej na terenie aparatu Golgiego miedź. W fagolizosomach znajduje się wieloskładnikowy błonowy enzym – oksydaza NADPH (NOX), która przeprowadza reakcję wybuchu tlenowego, polegającą na zwiększaniu poboru tlenu ze środowiska zewnętrznego przez komórki układu immunologicznego. W obrębie fagolizosomu oksydaza NADPH produkuje anionorodniki ponadtlenkowe, które zostają przekształcone przez dysmutazę ponadtlenkową do nadtlenku wodoru. Ten ostatni, wraz z jonami miedzi, które zostały dostarczone przez cząsteczki ATP7A, ulega reakcji chemicznej, znanej jako reakcja Fentona. Podczas tego procesu z nadtlenku wodoru zostają wytworzone rodniki hydroksylowe, które niszczą struktury lipidów, protein oraz kwasów nukleinowych bakterii [24]. Najnowsze analizy badań zakładają, że miedź prawdopodobnie odgrywa również dużą rolę w rozwoju choroby Alzheimerera. Podobnie jak w komórkach makrofagów, gen *SLC31A1*, pod wpływem aktywacji interferonu gamma (IFN- γ), ulega podwyższonej ekspresji w komórkach mikrogleju. Skutkuje to zwiększonym wychwytem miedzi w komórkach mózgu i jej magazynowaniem w płytkach amy-

loidowych charakterystycznych dla choroby Alzheimera, w których wiąże się ona z dużym powinowactwem do cząsteczki β -amyloidu, promując jego oligomeryzację i w końcowym efekcie jego neurotoksyczne działanie na komórki [85].

Zaskakujące wyniki uzyskano badając myszy z wyłączonym genem *mCTR2*. Długość życia osobników o genotypie *mCTR2*^{-/-} była podobna jak u myszy o genotypie dzikim, ale w wybranych tkankach tych zwierząt dochodziło do akumulacji miedzi [60]. Podniesiony poziom miedzi stwierdzono w mózgu, nerkach, śledzionie, mięśniach i jadrach myszy *mCTR2*^{-/-} lecz nie w wątrobie. Podobnie wysoki poziom miedzi stwierdzono w hodowanych *in vitro* fibroblastach pochodzących od myszy *mCTR2*^{-/-}. Dalsze badania wykazały, że miedź akumulowana jest głównie we frakcji endosomalnej i lizosomalnej wyżej wymienionych komórek [60, 61], co potwierdza rolę tego białka w uwalnianiu jonów miedzi z frakcji lizosomalnej [22].

CTR1 I CTR2 JAKO TRANSPORTERY LEKÓW ANTYNOWOTWOROWYCH

W terapii nowotworów stosuje się leki zawierające w swoim składzie atomy platyny (Pt). Do leków takich można zaliczyć cisplatynę (DDP), karboplatinę (CBDCA) oraz oksaliplatinę (LOHP). W cisplatynie Pt występuje na drugim stopniu utlenienia i tworzy związek kompleksowy, w którym ligandami są dwa atomy chloru i dwie cząsteczki amoniaku. Lek ten w komórkach ulega hydrolizie, odłączeniu ulegają dwa atomy chloru, a powstały wysoce reaktywny kompleks przyłącza się do nici DNA, gdzie łączy się głównie z zasadami purynowymi [68]. Prowadzi to do wytworzenia wewnątrz- i międzylańcuchowych połączeń w DNA, uniemożliwia syntezę DNA, jak również hamuje procesy transkrypcji. W efekcie komórka kierowana jest na drogę apoptozy [22, 68]. Podobne działanie jak DDP mają pozostałe chemioterapeutyki: CBDCA oraz LOHP [44]. Leki te mają szerokie spektrum działania i wykorzystywane są w terapii nowotworów jądra, prostaty, jajnika, raka pęcherza moczowego, raka szyjki macicy, płaskokomórkowego raka głowy i szyi, drobnokomórkowego i niedrobnokomórkowego raka płuc, raka piersi oraz raka jelita grubego [25, 44, 68]. Biorąc pod uwagę szerokie spektrum działania i liczne zastosowania tych leków, bardzo ważnym problemem staje się poznanie mechanizmów ich transportu na poziomie komórki. Wiadomo, że leki mogą dostawać się do wnętrza komórki za pomocą transporterów błonowych formujących kanały jonowe błonowe białka transportujące, endocytozę, czy też makropinocytozę. Wyniki licznych badań nad kinetyką tego procesu dowiodły, że wychwyt platynowych leków jest bardzo podobny do tego, któremu podlegają jony miedzi, a tym samym sugerowały, że leki te transportowane są przez błonę komórkową z wykorzystaniem białek z rodziny CTR [8, 36, 44, 76]. Potwierdziły to badania przeprowadzone na komór-

kach drożdży oraz komórkach mysich z wyłączonym genem *yCtr1/mCtr1*. Okazało się, że komórki takie pobierają o wiele mniej cisplatyny niż komórki o genotypie dzikim [29]. Kolejne badania wykazały, że DDP ma bardzo wysokie powinowactwo do N-końca białka CTR1, a efekt ten jest silnie powiązany z występowaniem w tym obszarze konserwatywnych sekwencji metioninowych [25, 71]. Jednak w przeciwieństwie do jonów Cu^+ leki antynowotworowe nie są „przeciągane” przez kanał utworzony w błonie przez białko CTR1, a transportowane są do wnętrza komórki na drodze endocytozy [48, 62, 74]. Stwierdzono również, że wzrostowi transkrypcji genu *hCTR1* na poziomie mRNA towarzyszy również wzrost transportu dokomórkowego leków antynowotworowych [48, 71]. Dlatego też u pacjentów z wyższą ekspresją genu *hCTR1* terapia z zastosowaniem leków zawierających platynę daje lepsze efekty, niż u osób z niską ekspresją tego genu [48, 61, 80]. Potwierdziły to badania przeprowadzone wśród pacjentów z rakiem jajnika i niedrobnokomórkowym rakiem płuc [10, 80]. Ponadto wykazano, że jony miedzi i leki zawierające Pt konkurują między sobą w procesie addycji do białka CTR1 tak, że obniżenie poziomu miedzi może mieć pozytywny wpływ na przebieg terapii [80]. Jednak podobnie jak w przypadku zbyt wysokiego stężenia miedzi, wysokie stężenie takich leków prowadzi do szybkiej endocytozy i degradacji białka CTR1.

W przeciwieństwie do CTR1 wysoki poziom białka CTR2 wpływa niekorzystnie na przebieg procesu terapeutycznego. Komórki z wysoką ekspresją tego genu rozwijają proces lekooporności, którego mechanizm powstawania nie jest do tej pory poznany. W takim przypadku lepsze prognozy terapeutyczne są dla pacjentów z niską ekspresją genu *hCTR2* [48, 62, 80, 84].

PODZIĘKOWANIA

Artykuł jest finansowany z grantu NCN nr 2012/05/B/NZ4/02423

LITERATURA

- [1] ABRAMSON J, SMIRNOVA I, KASHO V, VERNER G, KABACK HG, IWATA S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 2003; **301**: 610-615.
- [2] ACHARD ME, STAFFORD SL, BOKIL NJ, CHARTRES J, BERNHARDT PV, SCHEMBRI MA, SWEET MJ, MCEWAN AG. Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J*. 2012; **444**: 51-57.
- [3] ALLER SG, ENG ET, DE FEO CJ, UNGER VM. Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 53435-53441.
- [4] ALLER SG, UNGER VM. 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 U S A*. 2006; **103**: 3627-3632.

- [5] BASS RB, STROP P, BARCLAY M, REES DC. Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 2002; **298**: 1582-1587.
- [6] BAUERLY KA, KELLEHER SL, LONNERDAL B. Functional and molecular responses of suckling rat pups and human intestinal Caco-2 cells to copper treatment. *J Nutr Biochem*. 2004; **15**: 155-162.
- [7] BERTINATO J, SWIST E, PLOUFFE LJ, BROOKS SP, L'ABBÉ MR. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochem J*. 2008; **409**: 731-740.
- [8] BLAIR BG, LARSON CA, SAFAEI R, HOWELL SB. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res*. 2009; **15**: 4312-4321.
- [9] BOCHAROVA OV, BREYDO L, SALNIKOV VV, BASKAKOV IV. Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry* 2005; **44**: 6776-6787.
- [10] CHEN HH, YAN JJ, CHEN WC, KUO MT, LAI YH, LAI WW, LIU HS, SU WC. Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCTR1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer*. 2012; **75**: 228-34.
- [11] COLLINS JF, PROHASKA JR, KNUTSON MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr Rev*. 2010; **68**: 133-147.
- [12] DANCIS A, HAILE D, YUAN DS, KLAUSNER RD. The Saccharomyces cerevisiae copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Bio IChem*1994; **269**: 25660-25667.
- [13] DE BIE P, MULLER P, WIJMENGA C, KLOMP LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet*. 2007; **44**: 673-688.
- [14] DE FEO CJ, ALLER SG, UNGER VM. A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals* 2007; **20**: 705-716.
- [15] DE FEO CJ, MOOTIEN S, UNGER VM. Tryptophan scanning analysis of the membrane domain of CTR-copper transporters. *J Membr Biol*. 2010; **234**: 113-123.
- [16] DE FEO CJ, ALLER SG, SILUVAI GS, BLACKBURN NJ, UNGER VM. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; **106**: 4237-4242.
- [17] DUMAY QC, DEBUT AJ, MANSOUR NM, SAIER MH. The copper transporter (Ctr) family of Cu²⁺ uptake systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2006; **11**: 10-19.
- [18] EISSES JF, KAPLAN JH. The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1: a mutational analysis. *J Biol Chem*. 2005; **280**: 37159-37168.
- [19] ESKICI G, AXELSEN PH. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 2012; **51**: 6289-6331
- [20] FESTA RA, THIELE DJ. Copper: an essential metal in biology. *Current biology* 2011; **21**: R877-R883.
- [21] GUO Y, SMITH K, LEE J, THIELE DJ, PETRIS MJ. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J Bio IChem* 2004; **279**: 17428-17433.
- [22] GUPTA A, LUTSENKO S. Human copper transporters: mechanism, role in human disease and therapeutic potential. *Future Med Chem* 2009; **1**: 1125-1142.
- [23] HARDMAN B, MANUELPIILLAI U, WALLACE EM, MONTY JF, KRAMER DR, KUO YM. Expression, localisation and hormone regulation of the human copper transporter hCTR1 in placenta and choriocarcinoma Jeg-3 cells. *Placenta* 2006; **27**: 968-977.
- [24] HODGKINSON V, PETRIS MJ. Copper Homeostasis at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem*. 2012; **287**: 13549-13555.
- [25] HOWELL SB, SAFAEI R, LARSON CA, SAILOR MJ. Coppertransporters and the cellularpharmacology of the platinum-containingcancerdrugs. *Mol Pharmacol*. 2010; **77**: 887-894.
- [26] HUANG Y, LEMIEUX MJ, SONG J, AUER M, WANG DN. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli. *Science* 2003; **301**: 616-620.
- [27] 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. *Mol Biosyst* 2007; **3**: 816-824.

- [28] HUSTER D, PURNAT TD, BURKHEAD JL, RALLE M, FIEHN O, STUCKERT F, OLSON NE, TEUPSER D, LUTSENKO S. High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *J Bio lChem* 2007; 282: 8343-8355.
- [29] ISHIDA S, LEE J, THIELE DJ, HERSKOWITZ I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 14298-14302.
- [30] JIANG L, GARRICK MD, GARRICK LM, ZHAO L, COLLINS JF. Divalent metal transporter 1 (Dmt1) mediates copper transport in the duodenum of iron-deficient rats and when overexpressed in iron-deprived HEK-293 cells. *J Nutr* 2013; **143**: 1927-1933.
- [31] KAMPFENKEL K, KUSHNIR S, BABIYCHUK E, INZE D, VAN MONTAGU M. Molecular characterization of a putative Arabidopsis thaliana copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* 1995; **270**: 28479-28486.
- [32] KAPLAN JH, LUTSENKO S. Copper transport in mammalian cells: Special care for metal with special needs. *J Biol Chem* 2009; **284**: 25461-25465.
- [33] KELLEHER SL, LONNERDAL B. Mammary gland copper transport is stimulated by prolactin through alterations in Ctr1 and Atp7A localization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; **291**: R1181-R1191.
- [34] KENNERSON ML, NICHOLSON GA, KALER SG, KOWALSKI B, MARCER JF, TANG J, LLANOS RM, CHU S, TAKATA RI, SPECK-MARTINS CE, BAETS J, ALMEIDA-SOUZA L, FISHER D, TIMMERMAN V, TAYLOR PE, SCHERER SS, FERGUSON TA, BIRD TD, DE JONGHE P, FEELY SM, SHY ME, GARBERN YI. Missense mutations in the copper transporter gene ATP7A cause X-linked distal hereditary motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 2010; **86**: 343-352.
- [35] KIM BE, PETRIS MJ. Phenotypic diversity of Menkes disease in mottled mice is associated with defects in localisation and trafficking of the ATP7A protein. *J Med Genet* 2007; **44**: 641-646.
- [36] KIM ES, TANG X, PETERSON DR, KILARI D, CHOW CW, FUJIMOTO J, KALHOR N, SWISHER SG, STEWART DJ, WISTUBA II, SIDDIK ZH. Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014; **85**: 88-93.
- [37] KIM H, WU X, LEE J. SLC31 (CTR) family of copper transporters in health and disease. *Mol Aspects Med* 2013; **34**: 561-570.
- [38] KIM H, SON HY, BAILEY SM, LEE J. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **296**: G356-64.
- [39] KLOMP AE, JUIJN JA, VAN DER GUN LT, VAN DEN BERG IE, BERGER R, KLOMP LW. The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized extracellularly, and interacts with itself. *Biochem J* 2003; **370**: 881-9.
- [40] KLOMP AE, TOPS BB, VAN DEN BERG IE, BERGER R, KLOMP LW. Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem J* 2002; **64**: 497-505.
- [41] KNIGHT SA, LABBE S, KWON LF, KOSMAN DJ, THIELE DJ. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* 1996; **10**: 1917-1929.
- [42] KUO YM, GYBINA AA, PYATSKOWIT JW, GITSCHIER J, PROHASKA JR. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J Nut.* 2006; **136**: 21-26.
- [43] LARSON CA, ADAMS PL, JANDIAL DD, BLAIR BG, SAFAEI R, HOWELL SB. The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochem Pharmacol* 2010; **80**: 448-454.
- [44] LARSON CA, BLAIR BG, SAFAEI R, HOWELL SB. The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol.* 2009; **75**: 324-30.
- [45] LEE J, PETRIS MJ, THIELE DJ. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J Biol Chem* 2002; **277**: 40253-9.
- [46] LEE J, PROHASKA JR, THIELE DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; **98**: 6842-6847.

- [47] LEE J, PEÑA MM, NOSE Y, THIELE DJ. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 4380-7
- [48] LEE YY, CHOI CH, DO IG, SONG SY, LEE W, PARK HS, SONG TJ, KIM MK, KIM TJ, LEE JW, BAE DS, KIM BG. Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2011; **122**: 361-5.
- [49] LENARTOWICZ M, KRZĘTOWSKI W. Budowa i funkcja białek ATP7A i ATP7B – ATPaz transportujących jony miedzi. Postępy Biochem 2010; **56**: 317-327.
- [50] LENARTOWICZ M. Badania nad ekspresją i funkcją genu i białka ATP7A (ATPazy transportującej kationy miedziowe) u myszy. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2011.
- [51] LUTSENKO S, BARNES NL, BARTEE MY, DYMITRIEV OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev.* 2007; **87**: 1011-1046.
- [52] MARYON EB, MOLLOY SA, KAPLAN JH. O-linked glycosylation at threonine 27 protects the copper transporter hCTR1 from proteolytic cleavage in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2007; **282**: 20376-20387.
- [53] MARYON EB, MOLLOY SA, ZIMNICKA AM, KAPLAN JH. Copper entry into human cells: Progress and unanswered questions. *Biometals* 2007; **20**: 355-364.
- [54] MØLLER LB, PETERSEN C, LUND C, HORN N. Characterization of the hCTR1 gene: genomic organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene. *Gene* 2000; **257**: 13-22.
- [55] NODA Y, ASADA M, KUBOTA M, MAESAKO M, WATANABE K, UEMURA M, KIHARA T, SHIMOHAMA S, TAKAHASHI R, KINOSHITA A, UEMURA K. Copper enhances APP dimerization and promotes Ab production. *Neurosci Lett* 2013; **547**: 10-15.
- [56] NOSE Y, WOOD LK, KIM BE, PROHASKA JR, FRY RS, SPEARS JW, THIELE DJ. Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability. *J Biol Chem* 2010; **285**: 32385-32392.
- [57] NOSE Y, REES EM, THIELE DJ. Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**: 604-607.
- [58] NOSE Y, KIM BE, THIELE DJ. Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab.* 2006; **4**: 235-244.
- [59] OHGAMI RS, CAMPAGNA DR, MCDONALD A, FLEMING MD. The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood* 2006; **108**: 1388-94.
- [60] ÖHRVIK H, NOSE Y, WOOD LK, KIM BE, GLEBER SC, RALLE M, THIELE DJ. Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ecto-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; **110**: E4279-288.
- [61] ÖHRVIK H, THIELE DJ. How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1, Ctr1. *Ann N Y Acad Sci* 2014; **1314**: 32-41.
- [62] ÖHRVIK H, THIELE DJ. The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *J Trace Elem Med Biol* 2014; doi: 10.1016/j.jtemb.2014.03.006.
- [63] PENA MMO, PUIG S, THIELE DJ. Characterization of the *Sacharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 33244-33251.
- [64] PETRIS MJ. The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Arch* 2004; **44**: 752-755.
- [65] PETRIS MJ, SMITH K, LEE J, THIELE DJ. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem* 2003; **14**: 9639-9646.
- [66] POURVALI K, MATAK P, LATUNDE-ADA GO, SOLOMOU S, MASTROGIANNAKI M, PEYSSONNAUX C. Basal expression of copper transporter 1 in intestinal epithelial cells is regulated by hypoxia-inducible factor 2a. *FEBS Lett* 2012; **586**: 2423-2427.
- [67] PUIG S, LEE J, LAU M, THIELE DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 26021-26030.
- [68] RABIK CA, DOLAN ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007; **33**: 9-23
- [69] RAVIA JJ, STEPHEN RM, GHISHAN FK, COLLINS JK. Menkes copper ATPase (ATP7A) is a novel metal-responsive gene in rat duodenum, and immunoreactive protein is present on the brush-border and basolateral membrane domains. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 36221-36227.

- [70] REES EM, LEE J, THIELE DJ. Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 54221-54229.
- [71] SAFAEI R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett*. 2006; **234**: 34-39.
- [72] SALIOZ M, ODERMATT A. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem*. 1995; **270**: 9217-9221.
- [73] SCHWEIGEL-RÖNTGEN M. The families of zinc (SLC30 and SLC39) and copper (SLC31) transporters. *Curr Top Membr* 2014; **73**: 321-355.
- [74] SINANI D, ADLE DJ, KIM H, LEE J. Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26775-85
- [75] SONG IS, CHEN HH, AIBA I, HOSSAIN A, LIANG ZD, KLOMP LW. Transcription factor Sp1 plays an important role in the regulation of copper homeostasis in mammalian cells. *Mol Pharmacol*. 2008; **74**: 705-713.
- [76] TSAI CY, LARSONCA, SAFAEI R, HOWELL SB. Molecular modulation of the copper and cisplatin transport function of CTR1 and its interaction with IRS-4. *Biochem Pharmacol*. 2014; **90**: 379-387.
- [77] TÜMER Z, MÖLLER LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet*. 2010; **18**: 511-518.
- [78] VAN DEN BERGHE PV, KLOMP LW. Posttranslational regulation of copper transporters. *J Biol Inorg Chem* 2010; **15**: 37-46
- [79] VAN DEN BERGHE PV, FOLMER DE, MALINGRÉ HE, VAN BEURDEN E, KLOMP AE, VAN DE SLUIS B, MERKX M, BERGER R, KLOMP LW. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J* 2007; **407**: 49-59.
- [80] WEE NK, WEINSTEIN DC, FRASER ST, ASSINDER SJ. The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; **45**: 960-3.
- [81] WIJMEGA C, KLOMP LW. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc Nutr Soc*. 2004; **63**: 31-39.
- [82] WILDE A, DEMPSEY C, BANTING G. The tyrosine-containing internalization motif in the cytoplasmic domain of TGN38/41 lies within a nascent helix. *J Biol Chem*. 1994; **269**: 7131-7136.
- [83] XIAO Z, WEDD AG. A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1. *Chem Commun (Camb)*. 2002; **6**: 588-589.
- [84] YOSHIDA H, TERAMAE M, YAMAUCHI M, FUKUDA T, YASUI T, SUMI T, HONDA K, ISHIKO O. Association of copper transporter expression with platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2013; **33**: 1409-1414.
- [85] ZHENG Z, WHITE C, LEE J, PETERSON TS, BUSH AI, SUN GY, WEISMAN GA, PETRIS MJ. Altered microglial copper homeostasis in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010; **114**: 1630-1638.
- [86] ZHOU B, GITSCHER J. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; **94**: 7481-7486.
- [87] ZHOU H, THIELE DJ. Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 20529-20535.
- [88] ZIMNICKA AM, MARYON EB, KAPLAN JH. Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes: implications for copper homeostasis. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26471-26480.

Redaktor prowadzący – Paweł Lipiński

Otrzymano: 31.03.2015

Przyjęto: 13.04.2015

Małgorzata Lenartowicz

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński

ul Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

tel. 12 664 50 84

e-mail: malgorzata.lenartowicz@gmail.com

