

ОБРАЗОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ В БЕЛКАХ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

©2024 г. О. В. КОСМАЧЕВСКАЯ¹,
Н. Н. НОВИКОВА², С. Н. ЯКУНИН²,
А. Ф. ТОПУНОВ^{1*}

¹ *Институт биохимии им. А.Н.Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва*

² *Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт», Москва*

I. Введение. II. Связывание железа и цинка гемоглобином и альбумином. III. Изучение дополнительных металлсвязывающих центров в гемоглобине и альбумине с помощью рентгеновской спектроскопии поглощения. IV. «Архетипические» сайты связывания металлов в белках. V. Металлы как участники процесса самоорганизации белков. VI. Универсальная белковая реакция, активность цистеинов и связывание металлов. VII. Аберрантное связывание металлов и патологии. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Более четверти всех белков, включенных в Protein Data Bank, содержат в своем составе металлы. Чаще всего белки содержат ионы цинка, за которыми следуют железо, кальций, марганец, магний. Роль переходных металлов в биохимии белков разнообразна. Они входят в состав активного центра, способствуют формированию правильной прост-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; АФА – активные формы азота; Hb – гемоглобин; Mb – миоглобин; Lb – левоглобин; ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа; БА – болезнь Альцгеймера; БАС – боковой амиотрофический склероз; БП – болезнь Паркинсона; APP (Amyloid-Beta Precursor Protein) – белки-предшественники амилоида; PHF (Paired Helical Filaments) – парные спиральные филаменты; NFT (Neurofibrillary Tangles) – нейрофибрилярные клубки; LLPS (Liquid-liquid phase separation) – фазовое разделение типа жидкость-жидкость; МТ3 – металлотионеин 3; ADAM10 – дезинтегрин и металлопептидаза 10; RAGE – иммуноглобулин-подобный рецептор клеточной поверхности; SOD1 – медно-цинковая супероксиддисмутаза; α -Syn – альфа-синуклеин; LB – тельца Леви; LN – нейрит Леви.

*Адрес для корреспонденции: aftorunov@yandex.ru

ранственной укладки, участвуют в образовании сложных белковых комплексов типа липопротеидов и нуклеопротеидов, а также стабилизируют структуру мультисубъединичных белков [1]. Также металлы участвуют в катализе, транспорте газов, переносе электронов, детекции редокс-условий. Во всех перечисленных случаях связывание металлов с белком осуществляется по строго определенным местам (сайтам), которые генетически запрограммированы. При этом многие белки в стрессовых условиях формируют дополнительные центры связывания металлов. В литературе их также называют абберантными (aberrant sites) или нетипичными (abnormal sites) [2, 3]. Такое связывание металлов влияет на физико-химические свойства и реакционную способность белков и может способствовать формированию трудно-обмениваемых белковых агрегатов, в которых металлы действуют как «кросс-линкинг» агенты, способствующие образованию перекрестных связей. Накопление стабильных нефункциональных белковых агрегатов в клетках провоцирует развитие болезней аномальной полимеризации (Diseases of Abnormal Polymerization), к которым относятся болезни Альцгеймера и Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, прионные заболевания и некоторые виды рака. К настоящему времени накоплено много данных, свидетельствующих о роли абберантного взаимодействия белков с металлами в развитии диабета, атеросклероза, хронической почечной недостаточности, хронической обструктивной болезни легких, а также в нарушении обмена веществ. У всех этих патологий есть общая составляющая – повышенное образование реакционно-активных соединений: активных форм кислорода (АФК), активных форм азота (АФА), активных карбонильных соединений (АКС). «Активные формы» спонтанно реагируют с белками, способствуя образованию посттрансляционных модификаций [4]. Образовавшиеся в результате таких посттрансляционных модификаций новые химические группы могут выступать в качестве лигандов для связывания ионов металлов. Таким образом формируются дополнительные металлсвязывающие центры в белках.

Окислительный стресс сопровождает течение многих заболеваний. В частности, образование активных форм кислорода, азота и галогенов в кровотоке было замечено у больных хронической почечной недостаточностью [5]. У таких пациентов длительное присутствие уремических токсинов в сочетании с АФК приводит к нарушению физико-химических свойств плазменных белков [5, 6], что сказывается на ряде их физико-химических свойств, в том числе и на способности связывать ионы металлов.

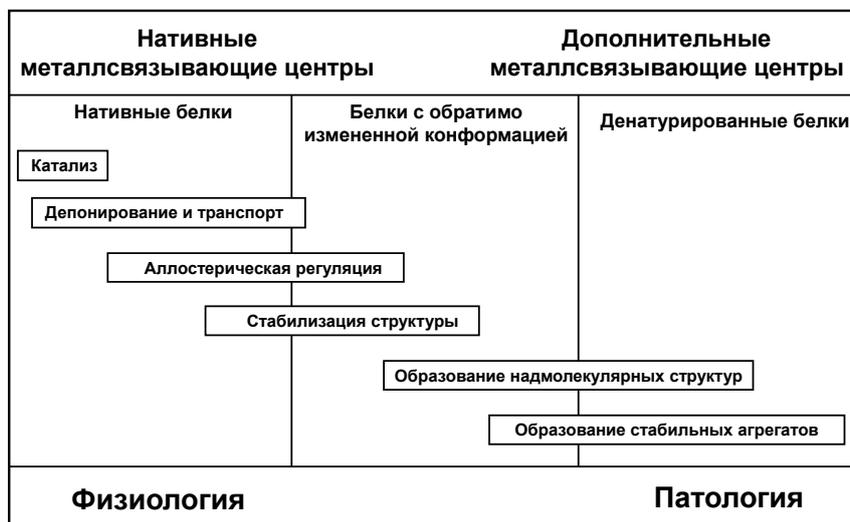


Рис. 1. Роль специфических и дополнительных металлсвязывающих центров в функционировании белков.

Дополнительные центры связывания металлов возникают и вследствие демаскировки аминокислотных остатков в случае неправильного процессинга или фолдинга, а также при изменении конформации белка [7]. В условиях слабого и обратимого повреждения белка, его структура может переходить в состояние «расплавленной глобулы», в котором становятся доступными дополнительные центры связывания металлов (рис. 1).

Цель настоящего обзора – сформулировать общие представления о молекулярных механизмах накопления ионов металлов в белках, модифицированных «активными формами». Это позволит лучше понять механизмы изменения белков при нарушении обменных процессов в организме, а также объяснить давно известный феномен накопления металлов при старении [8–11].

II. СВЯЗЫВАНИЕ ЖЕЛЕЗА И ЦИНКА ГЕМОГЛОБИНОМ И АЛЬБУМИНОМ

Одними из наиболее интересных и важных белков в отношении неспецифического связывания ионов металлов являются гемоглобин (Hb) и альбумин. Рассмотрим способность этих белков образовывать комплексы с ионами железа и цинка. Оба металла являются эссенциальными макроэлементами и в больших количествах накапливаются в крови и эритроцитах. Как правило, высокое содержание железа и цинка наблюдается в крови больных хронической почечной недостаточностью и сахарным диабетом [9, 12, 13].

ГЕМОГЛОБИН

Гемоглобин эритроцитов, как и многие белки, способен связывать ионы металлов по белковой части. В частности, для этого белка показана способность формировать комплексы с ионами железа и цинка.

Как ни странно, связывание гемоглобином дополнительных ионов железа изучено очень слабо. Интерес для биологии представляют тройные комплексы Hb с двухвалентным железом и оксидом азота (NO) – динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (RS-ДНКЖ) описываются формулой $\{(RS^-)_2-Fe^+-NO^+\}_2$, и могут быть связаны как с низкомолекулярными соединениями, так и с белками. Нами было показано образование ДНКЖ, связанных с SH-группой остатка цистеина β -цепи гемоглобина (β Cys93) [14–16]. Формирование подобных комплексов мы также зарегистрировали у растительного гемоглобина – леоглобина (Lb), а поскольку у Lb отсутствуют поверхностные реакционноспособные цистеины, мы предположили, что ДНКЖ здесь могут связываться с имидазолом остатка гистидина [17]. В условиях индуцированного окислительного стресса ДНКЖ защищали тиоловые группы Hb от окисления [14], а также препятствовали образованию оксоферрильной формы гема (Hb-Fe^{IV}=O) под действием перекисей [16–20].

В последнее время активно разрабатывается гипотеза, что Hb в составе эритроцитов является одним из важнейших элементов системы метаболизма оксида азота (NO) и его доноров внутри организма [21]. Немаловажная роль в этой функции Hb отводится связанными с ним ДНКЖ. Поскольку реакционная способность SH-групп β Cys93 Hb зависит от конформации четвертичной структуры белка, то образование и распад железонитрозильных комплексов также может модулироваться конформационными R-T-переходами молекулы Hb. Моноядерные ДНКЖ, связанные с тиоловой группой белка, парамагнитны и детектируются с помощью ЭПР-спектроскопии по характерному значению g-фактора 2,034 [14, 15, 22, 23].

Связанные с белками ДНКЖ, с одной стороны, находятся в равновесии с низкомолекулярными комплексами (глутатионовыми и цистеиновыми), а, с другой, с диамагнитной биядерной формой ДНКЖ. Это равновесие (низкомолекулярные ДНКЖ \leftrightarrow белковые ДНКЖ \leftrightarrow биядерные ДНКЖ) зависит от доступности SH-групп и от редокс-условий [22]. По мере усиления окислительного стресса равновесие смещается от низкомолекулярных комплексов к белковым, а затем к биядерным, формирующимся с участием двух молекул белка. В конечном итоге ДНКЖ распадается с образованием окисленного глутатиона, нитрит-ионов и Fe^{2+} .

Разнообразная биологическая активность RS-ДНКЖ обусловлена их способностью выступать в качестве доноров NO и NO^+ , которые являются универсальными регуляторами различных метаболических процессов [22]. Также ДНКЖ позволяют избирательно передавать NO, NO^+ и $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ -группу на гем- и тиолсодержащие белки. Кроме этого, ДНКЖ поддерживают прооксидантно-антиоксидантное равновесие в клетке благодаря антирадикальным и хелатирующим свойствам, исследованным в работах [14–20, 24–26].

Несмотря на многочисленные доказательства участия ДНКЖ в различных биологических процессах, подробно описанных в монографии [27], остается еще много нерешенных вопросов, связанных с их ролью в регуляции физико-химических свойств белковой молекулы. Пока еще не выяснено влияние ДНКЖ на стабильность Hb. Плохо изучено влияние редокс-активных соединений на динамику ДНКЖ. До сих пор обсуждается природа второго белкового лиганда (помимо βCys93) в гемоглобине. Нельзя исключить возможность образования ДНКЖ с участием в качестве лигандов продуктов неферментативного гликирования аминокислотных остатков [28–30]. Поиск ответов на все эти вопросы может привести к раскрытию новых аспектов функционирования Hb в качестве сигнального белка в эритроцитах.

В настоящее время в нашей лаборатории проводятся исследования роли ДНКЖ как молекулярных переключателей для управления структурой и функцией белка. Мы предположили, что ДНКЖ, связанные с Hb, могут выступать в роли регуляторов реакционной способности его βCys93 . Включение остатков цистеина в состав ДНКЖ защищает их от окисления гидропероксидами [14, 20, 31]. Однако в случае распада комплексов при высоких концентрациях окислителей тиол высвобождается в виде тиолят-аниона (R-S^-), который проявляет повышенную реакционную активность по отношению к электрофильным соединениям, что приводит к формированию ста-

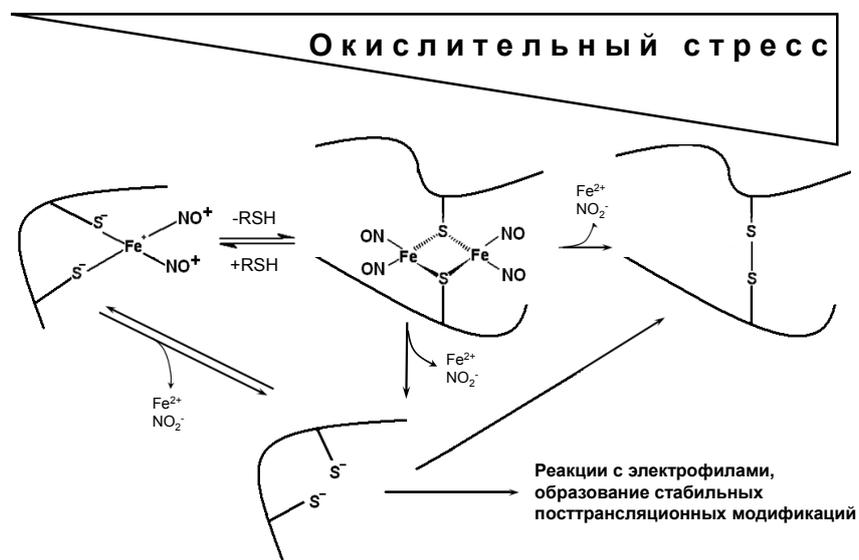


Рис. 2. Формирование динитрозильных комплексов железа как способ настройки реакционной способности белковых SH-групп.

бильной модификации тиола. Таким образом, включение SH-групп в ДНКЖ позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов в условиях слабого стресса и, наоборот, ускорить их при высоком уровне стресса [31] (рис. 2).

Способность Hb связывать ионы цинка была обнаружена еще в 70-х годах прошлого столетия. В то время были выполнены исследования по влиянию ионов цинка на функциональные характеристики белка и определены кинетические константы связывания этого металла [32, 33]. Наиболее активные цинк-связывающие аминокислотные остатки – цистеин, гистидин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Однако константа связывания ионов цинка с атомом серы на 4–5 порядков выше, чем с атомом азота. Поэтому при доступности всех возможных связующих центров цинк предпочтительнее будет связываться по остаткам цистеина.

В Hb были выявлены центры связывания ионов цинка со средней и высокой аффинностью. Среднеаффинные центры являются внутримолекулярными. В качестве потенциальных лигандов для ионов цинка рассматривали Cys93 и His143 β -цепи [34]; в другой работе [33] – His116, His117 и His146 β -цепи. В работе [35] постулируется участие следующих аминокислот: His146 и Cys93 одной β -цепи и His2 другой

β -цепи, а также делается вывод, что таких цинк-связывающих сайтов, в молекуле Hb два – один для охуHb ($K = 1,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $\text{pH} = 7,11-6,83$), другой для деохуHb ($K = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $\text{pH} = 7,42-7,10$).

Ионы цинка предпочтительнее связываются с лигандированными формами Hb (R-конформерами) [33, 34, 36]. Константа ассоциации для охуHb примерно в 20 раз выше, чем для деохуHb. При этом блокирование βCys93 снижало сродство к цинку как для оху-, так и для деоху-формы Hb ($K = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) [34, 35]. Это служит доказательством участия βCys93 в связывании цинка. Концентрация ионов водорода не влияла на способность Hb связывать цинк [35, 36].

Изучение механизма модуляции ионами металлов сродства гемоглобина к кислороду показало, что связывание цинка с Hb в 3,7 раз увеличивает сродство к кислороду [34]. Это происходит за счет стабилизации R-конформации. Эти цинк-связывающие центры в Hb получили название – *oxygen-linked binding sites*.

Высокоаффинные (межмолекулярные) цинк-связывающие сайты (константа ассоциации $K = 1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) формируются на границе контакта тетрамеров в области, где His116, His117 и Glu26 в $\beta 1$ -цепи одного тетрамера находятся в непосредственной близости от Lys16 и Glu116 в $\alpha 2$ -цепи соседнего тетрамера [32]. Высокоаффинный межмолекулярный сайт связывания цинка обнаружен в концентрированных растворах Hb и, вероятно, такие цинк-связывающие центры могут возникать внутри эритроцита [34]. В работе [37] в качестве наиболее вероятных центров связывания ионов цинка рассматриваются атомы серы βCys93 , а остаткам гистидина отводится роль альтернативных лигандов.

Способность связывать ионы цинка была показана также и для миоглобинов (Mb) – белков, структурно и функционально подобных гемоглобину [38–41]. Цинк увеличивает сродство Mb к кислороду примерно в два раза за счет индукции конформационных изменений [38, 41]. В миоглобине, так же, как и в гемоглобине, в регуляции кислородсвязывающих свойств задействованы сайты средней аффинности (константа ассоциации $K = 6,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$). Обсуждается следующий механизм: связывание цинка приводит к увеличению популяции белка в «открытой» конформации, в которой дистальный гистидин (His64) экспонируется из гемового кармана в сторону растворителя. Открытие так называемых «гистидиновых ворот» обеспечивает быструю диффузию лигандов между растворителем и гемовым карманом. В молекуле Mb кашалота было идентифицировано семь цинк-связывающих центров, причем один из них высокоаффинный. С помощью рентгеноструктурного анализа была определена его локализация в области His119, Asn122 и Lys16 [40].

Представляет интерес тот факт, что аминокислотные остатки, формирующие высокоаффинный цинк-связывающий центр, консервативны у всех изученных гемоглобинов млекопитающих, что служит указанием на роль этих центров в обеспечении какой-то важной физиологической функции. Для среднеаффинных центров такая функция известна, это – аллостерическая регуляция.

Существует точка зрения, что Hb может регулировать внутриклеточный гомеостаз цинка за счет связывания и изоляции металла. Это подтверждает тот факт, что в эритроцитах Hb является основным компонентом буферизации избытка Zn^{2+} (константа диссоциации $K = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) [42].

Интерес исследователей к взаимодействию Hb с цинком прежде всего был вызван тем фактом, что ионы этого металла улучшают сродство Hb к кислороду [36, 43]. Добавление цинка к эритроцитам больных серповидноклеточной анемией препятствовало эритроцитарной трансформации [44]. Основываясь на способности ионов цинка повышать сродство Hb к кислороду и влиять на морфологию эритроцитов, было предложено использовать низкие концентрации этого металла для ингибирования полимеризации дезоксигемоглобина в серповидных эритроцитах [33]. В связи с этим была исследована способность ряда гетероциклических хелаторов металлов доставлять цинк в эритроциты и высвободить его для связывания с Hb [45]. Ионы цинка также используют для концентрирования/разделения гликированного Hb (HbA1C) с целью последующего измерения его концентрации с помощью циклической вольтамперометрии [46].

АЛЬБУМИН

Альбумин является важным транспортным белком плазмы крови, в том числе переносящим и ионы металлов. Способность альбумина связывать ионы железа неоднократно наблюдалась в экспериментах, хотя считается, что этот белок не имеет специфичных сайтов связывания этого металла [47]. Обсуждается участие в координации ионов железа карбоксильных групп остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также имидазольной группы гистидина. Отсутствие специфических сайтов связывания железа в альбумине человека связано с тем, что в крови есть специальные белки (ферритин) для транспорта и депонирования этого металла. Исследована способность альбумина при участии Cu^{2+} образовывать ДНКЖ [48]. Связанные с альбумином ДНКЖ являются формой депонирования и транспорта оксида азота в кровотоке [27].

Сывороточный альбумин является главным переносчиком ионов цинка, связывая 75–80% этого металла в крови. Альбумин выпол-

няет функцию «буфера цинка», контролируя концентрацию свободных ионов Zn^{2+} и, следовательно, их доступность для других белков плазмы или для клеток (эндотелиоцитов и эритроцитов) [49]. В альбумине было обнаружено несколько цинк-связывающих центров разного сродства: высокоаффинные и дополнительные низкоаффинные со сродством, в 20–50 раз более низким [50]. Изучение кристаллических структур комплекса альбумина с Zn^{2+} позволило определить локализацию и структуру этих центров.

Было идентифицировано два высокоаффинных центра в альбумине. Первый и основной – центр А, локализуется в междоменной области и участвует в связывании многих металлов (multi-metal binding site) [51]. Структура этого центра была охарактеризована с помощью рентгеновской абсорбционной спектроскопии [52]. Показано, что в связывании Zn^{2+} участвуют гистидиновые и соседние с ними остатки, расположенные между доменами I и II, – His67 и Asn99 из домена I, а также His247 и Asp249 из домена II. Координационная сфера цинка является искаженной октаэдрической при включении в качестве шестого лиганда карбоксильного кислорода остатка His247. Структура этого центра подобна классическому каталитическому участку, обнаруженному во многих гидролитических ферментах. Предположительно, связывание цинка усиливает контакт между двумя доменами и стабилизирует их определенную взаимную ориентацию. Сродство этого центра к Zn^{2+} во многом зависит от концентрации жирных кислот в крови. Междоменный остаток His247 играет ключевую роль в регуляции связывания цинка по центру А. Состояние протонирования этого гистидина вызывает тонкое конформационное изменение в интерфейсе I/II доменов, так называемый нейтрально-основной переход (neutral-to-basic (N-to-B) transition). Было показано, что связывание лекарственных препаратов и жирных кислот с альбумином зависит от конформационного состояния белка: нейтрального или основного (neutral or basic). Связывание альбумином жирных кислот приводит к разрушению центра А. В этих условиях, а также при высокой концентрации цинка приобретают особое значение вторичные цинк-связывающие центры [51, 52].

Второй дополнительный – центр В, участвует в связывании Zn^{2+} или Ca^{2+} . Координационная сфера Zn^{2+} в этом центре состоит из одного атома азота His9 и двух атомов кислорода Asp13 и Asp255 [50, 53].

В альбумине также идентифицировано 17 центров низкого сродства к Zn^{2+} , во многих из них Zn^{2+} координируется только одним или двумя аминокислотными остатками. Предполагается, что они участвуют в транспорте и адресной передаче цинка на белки-мишени [52, 53]. Подробный анализ локализации, геометрии и аминокислотных

остатков, участвующие в координации Zn^{2+} в центре В и других низкоаффинных центрах приводится в статье [53].

Несмотря на то, что в белках наиболее предпочтительными для связывания цинка являются остатки цистеина, в кристаллических препаратах альбумина не было выявлено связывания цинка с Cys34, который является единственным доступным тиолом [53]. Объясняется этот факт отсутствием вблизи Cys34 других остатков, способных координировать металл. Также связывание цинка не происходило по N-концевому мотиву ATCUN (Amino-Terminal Copper-And Nickel).

Следует обратить внимание, что аминокислотные остатки, образующие высокоаффинные центры, высококонсервативны для всех изученных альбуминов млекопитающих, что служит указанием на возможную роль этих центров связывания цинка в обеспечении какой-то важной биологической функции [52]. Для среднеаффинных центров такая функция известна – это аллостерическая регуляция свойств белка, а именно способность переносить гормоны, лекарственные препараты [54] и жирные кислоты [55].

III. ИЗУЧЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ В ГЕМОГЛОБИНЕ И АЛЬБУМИНЕ С ПОМОЩЬЮ

РЕНТГЕНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ПОГЛОЩЕНИЯ

В рамках совместного проекта ФИЦ Биотехнологии РАН, НИЦ «Курчатовский институт» и Южного федерального университета на Курчатовском источнике синхротронного излучения (экспериментальная станция «Ленгмюр» Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований, г. Москва, Россия) нами были проведены исследования изменения элементного состава белковых пленок на основе гемоглобина и альбумина в условиях воздействия различных повреждающих факторов в умеренных неденатурирующих дозах, моделирующих эндогенную интоксикацию. Локальное атомное окружение ионов металлов в белках изучали с помощью метода рентгеновской спектроскопии поглощения в геометрии полного внешнего отражения. Водный раствор белка заливали в ленгмюровскую ванну (тефлоновую кювету, заполняемую жидкостью), установленную на рентгеновском дифрактометре станции «Ленгмюр» (рис. 3). Молекулы белка, растворенные в водной субфазе, концентрировались у поверхности водной субфазы в виде монослоя у границы раздела воздух/вода [56, 57]. Формирование белкового монослоя на

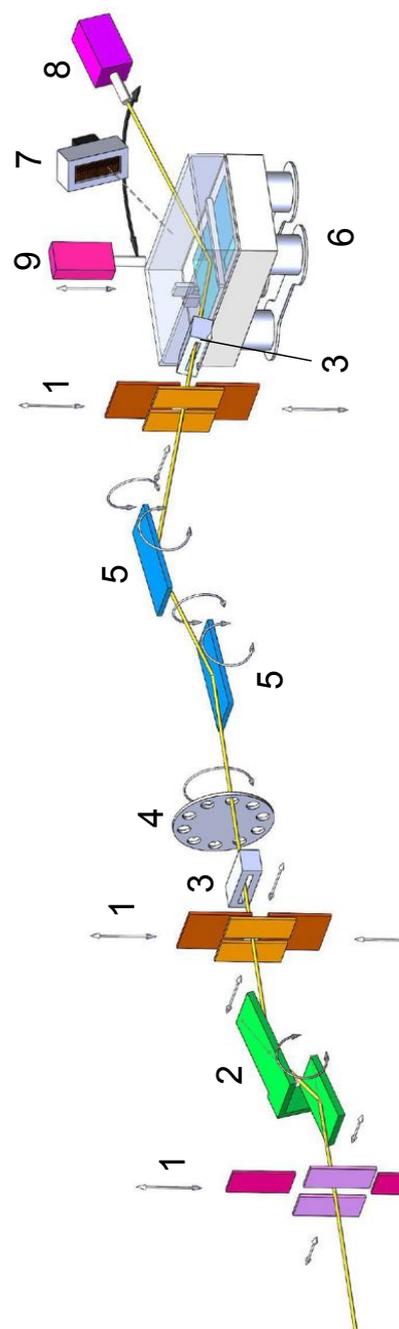


Рис. 3. Принципиальная схема станции «Ленгмир» Курчатовского источника синхротронного излучения.

1 – рентгеновские щели, 2 – кристалл монохроматор прорезного типа, 3 – мониторы пучка, 4 – attenuатор пучка, 5 – рентгеновские зеркала полного внешнего отражения, 6 – блок образца с лентгеновской ванной – тефлоновой кюветой, заполненной жидкостью, на поверхности которой формируется молекулярная пленка, 7 – щели Соллера (ряд близко расположенных параллельных пластин для уменьшения расходимости рентгеновского пучка) с линейным детектором, 8 – точечный рентгеновский детектор, 9 – энергодисперсионный рентгеновский детектор.

поверхности водной субфазы в ленгмюровской ванне было подтверждено в серии дополнительных измерений с помощью метода стоячих рентгеновских волн [57].

Отметим, что главным преимуществом измерений с помощью рентгеновской спектроскопии поглощения в геометрии полного внешнего отражения является возможность регистрировать сигналы с крайне низкой интенсивностью. Это позволяет проводить исследования таких слабо рассеивающих объектов, как мономолекулярные белковые пленки. С точки зрения биомедицинской науки, рентгеновские измерения для некристаллических белковых систем в условиях, приближенных к физиологическим, имеют важное значение для изучения биофизических свойств белков и выявления принципов их функционирования в сложных клеточных системах.

В экспериментах, проведенных на монослоях гемоглобина, была продемонстрирована способность эритроцитарного Hb, обработанного низкими неденатурирующими концентрациями мочевины, адсорбировать цинк из воды высокой степени очистки [56, 57]. Следует подчеркнуть, что по результатам дополнительного тестирования использованной воды в аналитическом сертификационном испытательном центре Всероссийского НИИ минерального сырья им. Н.М.Федоровского (АСИЦ ВИМС), содержание в ней ионов металлов не превышало предела определения (10^{-7} – 10^{-8} М).

Анализ кинетики изменения элементного состава белковых пленок на основе Hb и альбумина позволил сделать следующие выводы: при контакте белка с воздухом происходит значительное увеличение во времени количества ионов цинка, адсорбированных на белке. Это было отмечено даже на белках, не подверженных какой-либо обработке. Однако в случае предварительного воздействия на белок повреждающих факторов (мочевина, нагрев, соли металлов) процесс присоединения ионов цинка к белку значительно интенсифицировался. Это позволило нам высказать следующую гипотезу: для появления дополнительных центров связывания металлов необходимо сочетание двух факторов: 1) действие умеренных доз повреждающего фактора и 2) нахождение молекул белка на поверхности водной субфазы, у границы раздела воздух/жидкость. Оба фактора благоприятствуют включению остатка цистеина в координационную сферу ионов металлов, поскольку изменяют конформацию белка и активируют тиол [56, 57]. Поэтому дальнейшие рассуждения основываются на предположении, что в условиях эксперимента белки претерпевают структурные изменения, сказывающиеся на доступности и активности SH-групп. Активация SH-групп может происходить под действием активных форм кислорода (O_2^- , HO^* , HO_2^* , H_2O_2), которые неизбежно

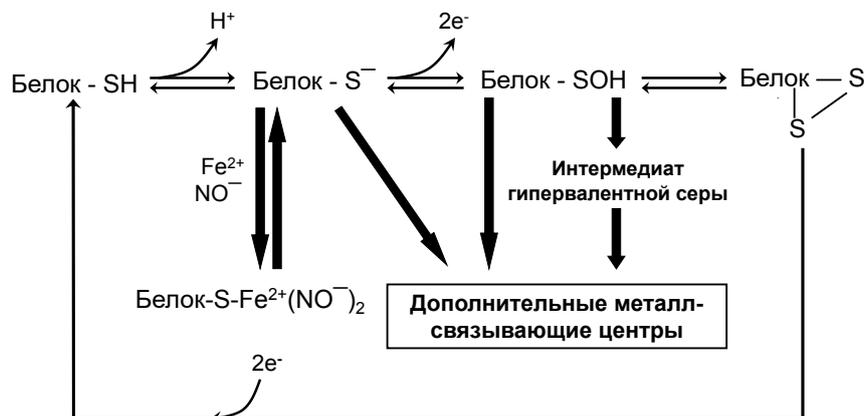


Рис. 4. Изменение состояния SH-групп остатков цистеина в белке в ходе окисления, образование дополнительных металлсвязывающих центров.

образуются в экспериментальной системе в результате радиолиза воды, вызванного рентгеновским излучением.

Наиболее вероятен следующий механизм действия АФК на белок. При умеренном окислительном стрессе окисление остатков цистеина происходит через образование тиолят-аниона (Cys-S⁻), который окисляется до сульфеновой кислоты (Cys-SOH). Такой процесс был ранее описан [58]. Цистеинсульфеновая кислота очень быстро претерпевает дальнейшее необратимое окисление до дисульфидов (Cys-SS-Cys), сульфиновых (Cys-SO₂H) и сульфоновых кислот (Cys-SO₃H) [59]. При этом высокореакционный Cys-SOH в белке может стабилизироваться гидрофобным микроокружением и водородными связями. Как известно, активные формы тиолов (Cys-S⁻, Cys-SOH) являются наиболее предпочтительными лигандами для связывания металлов (рис. 4). Тиолят-анион обладает высокой металлсвязывающей способностью, примерно в 20 раз превышающей протонированную форму тиола (Cys-SH) [60]. Цистеинсульфеновая кислота также может связывать металлы с образованием металл-сульфенатных центров (metal-sulfenate centers) [61–65]. Однако из-за высокой реактивности и нестабильности металл-сульфенатные центры не получили широкого распространения в биологии. В то же время цистеинсульфенат участвует в координации железа в нитрилгидратазе [66] и в N-синтазе изопенициллина [62]. Считается, что окисленные формы цистеина (сульфеновая и сульфиновая кислоты) стабилизируют окисленные формы редокс-активных металлов в металлсвязывающем центре, тем самым подавляя их потенциальную токсичность [64].

Описанная последовательность событий, укладывающаяся в несколько часов в экспериментальной системе, в организме человека может происходить в течении многих лет и даже на протяжении всей жизни. Полученные результаты могут объяснить давно известный феномен накопления металлов при старении и нарушении обменных процессов в организме [9–11].

В молекуле Hb содержится шесть цистеинов: по два в каждой β -цепи (Cys93 и Cys112) и по одному в каждой α -цепи (Cys104). В интактном Hb всего два поверхностных реакционноспособных цистеина (β Cys93), остальные находятся в области субъединичных контактов. Высвобождение «скрытых» цистеинов также может происходить при диссоциации Hb на димеры. Наибольшую склонность к диссоциации проявляет метформа (Hb-Fe³⁺) гемоглобина. В наших экспериментах использовался раствор metHb в концентрации ($\sim 1,4 \times 10^{-4}$ М), существенно более низкой, чем в эритроцитах. Поэтому нельзя исключить возможность распада Hb на димеры $\alpha 1\beta 2$ и $\alpha 2\beta 1$. Дополнительным фактором, стимулирующим распад, является действие повреждающих веществ (мочевина, нагрев, соли металлов). Впоследствии, вероятно, происходила активация доступных SH-групп, что усиливало металлсвязывающую способность белка.

У альбумина имеется только один свободный редокс-активный цистеин (Cys34), который расположен в углублении на 9,5 Å в непосредственной близости от трех полярных остатков Asp38, His39 и Tyr84 [68]. Альбумин является достаточно долгоживущим белком, продолжительность его нахождения в кровотоке составляет примерно 27 дней. Хотя это и существенно меньше, чем у Hb, время жизни которого достигает 120 дней, этого времени вполне достаточно для накопления окислительно-модифицированных форм этого белка при действии АФК и/или токсических молекул. Доля окисленного альбумина коррелирует со многими патологическими состояниями [69]. Его уровень увеличивается при заболеваниях почек [70–73], печени [74], сахарном диабете [75], старческой катаракте [76], хирургическом вмешательстве [77]. Также доля окисленного альбумина возрастает при старении человека [78, 79] и в результате интенсивных упражнений [80].

Известно, что скорость окисления цистеина в составе белков на несколько порядков превышает скорость окисления других аминокислот. Альбуминовый тиол реагирует с перекисью водорода (H₂O₂) и пероксинитритом (ONOO⁻) с константами скорости $2,2\text{--}2,7 \times 10^3$ М⁻¹с⁻¹ и $3,8 \times 10^3$ М⁻¹с⁻¹ соответственно при pH 7,4 и 37 °С [68]. В этих реакциях в результате двухэлектронного окисления Cys34 образуется сульфеновая кислота, которая находится в относительно

стабильном состоянии [68]. Это может происходить как за счет реакции с близкорасположенной амидной группой с образованием сульфенамида [81] или за счет реакции с гистидином с образованием соединения гипервалентной серы [82]. Вполне вероятно, что в связывании металлов принимают участие оба интермедиата окисления цистеина: сульфеновая кислота и соединение гипервалентной серы.

Следует отметить, что активность Cys34 зависит от конформационного состояния альбумина и состояния близкорасположенных остатков His39 и Tyr84 [68]. Также доступность тиола по отношению к действию модифицирующих агентов зависит от его состояния окисления: в восстановленном состоянии он погружен в складки белковой глобулы, в окисленном – экспонирован.

Отметим, что предложенные пути участия тиолов гемоглобина и альбумина в связывании металлов являются гипотетическими и требуют дальнейшей экспериментальной проверки. В настоящее время мы не можем дать однозначную оценку наблюдаемому явлению – появлению дополнительных металлсвязывающих центров в белках. Мы пока не знаем, является ли этот процесс простым следствием повреждения белка и увеличения доступности тиолов, которые в силу своих химических свойств являются наиболее предпочтительными лигандами для связывания металлов, или это определенный физиологический механизм снижения последствий окислительного стресса за счет увеличения стабильности и снижения реакционной способности белка. Также неизвестно, являются ли обнаруженные в наших исследованиях дополнительные центры адсорбции ионов цинка и железа в Hb специфическими для этих ионов металлов.

IV. «АРХЕТИПИЧЕСКИЕ» САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТАЛЛОВ В БЕЛКАХ

На основе структурного анализа последовательностей различных белков была прослежена эволюция металлсвязывающих мотивов. В работе [83] было показано, что центры связывания переходных металлов имеют сходную структурную геометрию и одинаковые лигандсвязывающие аминокислотные остатки для всех проанализированных белков. На основе этого наблюдения было сделано предположение, что эти небольшие структурные мотивы происходят от нескольких элементарных мотивов связывания металлов в пептидных предках, которые облегчали реакции переноса электронов, т.е. осуществляли окислительно-восстановительный катализ. Эти структурные мотивы можно отнести к так называемым «архетипическим» металлсвязывающим

сайтам («archetypal» metal binding sites) [84]. Причем самые первые биологически функциональные пептиды, вероятно, были доступны еще до сборки полнофункциональных белковых доменов более 3,8 миллиардов лет назад. На начальных этапах зарождения жизни небольшое количество древних мотивов (архетипических сайтов) постоянно использовалось для решения различных биологических задач, в первую очередь для катализа окислительно-восстановительных реакций [85]. Простые структурные металлсодержащие мотивы, обнаруженные в существующих оксидоредуктазах, могли быть включены в ферменты, принадлежащие к различным семействам. Поэтому можно сказать, что эти архетипические сайты лежат в основе зарождения жизни [83]. Эти факты подтверждают концепцию А.П.Руденко о саморазвитии открытых каталитических систем [86]. В соответствии с этой концепцией при неизменной или мало меняющейся катализируемой (базисной) реакции, происходит усложнение строения катализаторов и повышение эффективности катализа.

В белках чаще всего (~ в 90% случаев) в связывании цинка принимают участие остатки цистеина, гистидина, аспартата и глутамата [87, 88]. Выделяют пять классов структурных сайтов связывания цинка: каталитический, структурный, кластерный, транспортный и меж-белковый [88–90]. Структурные сайты обычно включают четыре аминокислотных остатка, как правило, это цистеин и гистидин (Cys/His сайты) в тетраэдрическом расположении [87]. Цистеин является предпочтительным лигандом в таких сайтах. В каталитических сайтах цинк обычно образует комплексы с водой и тремя аминокислотными остатками: гистидином, цистеином, аспарагином или глутаматом, причем гистидин является предпочтительной аминокислотой [87, 90]. Оба эти класса имеют высокое пикомолярное или фемтомолярное сродство к Zn^{2+} , что позволяет им связывать металл при концентрации от 10^{-8} до 10^{-11} М. Некоторые сайты связывания цинка являются кластерными для того, чтобы высвободить металл при окислении. Эти сайты имеют умеренное сродство и служат донорами металла для других цинксодержащих белков [88].

Цинк используется в качестве кофактора в белках гораздо чаще, чем другие ионы переходных металлов. Более 10% белков человека содержат цинк [87, 91]. К числу цинксодержащих белков относится и белок паркин, в состав которого входит цинк-связывающий мотив – цинковый палец в конфигурации RING-between-RING (RBR). Паркин состоит из четырех доменов RING0, RING1, IBR и RING2, каждый из которых содержит два иона Zn^{2+} [92, 93]. Паркин функционирует как убиквитинлигаза (E3) и участвует в

протеосом-опосредованной деградации склонных к агрегации белков, таких, как Pael-R и синфилин-1 (synphillin-1) [92, 93]. Хотя паркин традиционно называют убиквитинлигазой, его официальное название — убиквитин трансфераза RING-типа (Really Interesting New Gene) (КФ 2.3.2.27). Этот белок катализирует последний этап полиубиквитинирования белков-мишеней – перенос убиквитина на аминокгруппу остатка лизина. Далее активированные молекулы убиквитина присоединяются к предыдущему убиквитину, формируя полиубиквитиновую цепь. Таким образом, происходит мечение белков для узнавания их протеасомой. Нарушение структуры паркина в случае мутаций в гене или посттрансляционных модификаций приводит к накоплению в цитоплазме нейронов белковых агрегатов, в основном состоящих из пресинаптического белка альфа-синуклеина. Таким образом, нарушение структуры паркина приводит к развитию нейродегенеративного заболевания – болезни Паркинсона.

Если влияние мутаций на структуру и функцию паркина изучено достаточно хорошо, то последствия посттрансляционных модификаций на его функционирование изучено плохо, при том, что это особенно важно в условиях окислительного стресса, поскольку именно этот стресс является одной из основных причин болезни Паркинсона на молекулярном уровне [94]. Известно, что АФК могут модифицировать паркин. Особенно уязвимы цинк-связывающие мотивы (цинковые кластеры), удаление из которых металла приводит к полному разворачиванию белка. Белок с нарушенной структурой склонен к формированию агрегатов.

В наших экспериментах было зарегистрировано появление в поврежденном олигомерном паркине необычных (abnormal) центров связывания цинка [95]. Причем по структуре спектров XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure – околороговая тонкая структура рентгеновского спектра поглощения) металло-центры в паркине были идентичны центрам в Hb, возникающим в присутствии низких неденатурирующих концентраций (0,09 M) мочевины, солей металлов и умеренного нагрева [56]. Эти центры имеют четырехкоординатное окружение, в котором двумя лигандами являются аминокислотные остатки цистеина и гистидина. Следует отметить, что в паркине цинк-связывающие сайты, подобные гемоглобиновым, образовывались при проведении измерений в щадящих по дозе радиационного облучения условиях. В экспериментах с сильной радиационной нагрузкой возникали цинк-связывающие сайты, подобные таковым в щелочной фосфатазе [96]. Этот феномен можно объяснить существованием структурно консервативных «архетипических» цинк-связывающих сайтов в белках [84].

С помощью метода структурных шаблонов (Template-Based Methods), был произведен поиск в Protein Data Bank [97] случаев наличия в неродственных белках «архетипических» сайтов [84]. Было замечено, что структура цинк-связывающих сайтов может сильно отличаться у родственных белков и быть похожей в неродственных белках, имеющих разную конформацию. В более поздней работе была предложена концепция о минимальных функциональных сайтах связывания металлов, которые представляют собой 3D шаблоны, описывающие локальное окружение металла, не зависящее от макромолекулярной структуры белка [98]. В работе [84] было использовано четыре таких шаблона, включающих следующие лиганд-связывающие аминокислотные остатки: 1-ый – четыре цистеина, 2-ой – три гистидина и один глутамат и два шаблона, включающих три цистеина и один гистидин. Было выявлено два «архетипических» сайта связывания Zn^{2+} , которые независимо эволюционировали у многих рассмотренных белков. Результаты этих исследований указывают на то, что неродственные белки могут использовать одни и те же аминокислотные остатки в схожей геометрии для связывания металлов.

Возникает естественный вопрос: почему у разнородных белков возникают однотипные сайты связывания металлов. Причина в том, что с точки зрения физической химии существует ограниченное количество центров связывания металлов с наиболее благоприятной геометрией определенных аминокислотных остатков. Именно ограничения, налагаемые физико-химическими законами, приводят к возникновению похожих сайтов у совсем непохожих белков.

В нашем случае структура белка паркина изменялась таким образом, что возникало расположение аминокислотных остатков, благоприятное для связывания Zn^{2+} , отличное от цинковых пальцев [95]. Обнаружение в неродственных белках: паркине, Hb и щелочной фосфатазе однотипных центров связывания цинка при действии повреждающих (денатурирующих) агентов расширяет наше представление об эволюции металлсвязывающих центров в белках. Можно даже говорить о конвергентной эволюции однотипных центров связывания цинка. Считается, что конвергентные признаки формируются в сходных условиях и служат для выполнения аналогичных функций, например, для стабилизации полипептидной цепи. При изменении конформации белка могут возникать новые сайты связывания металлов, которые, возможно, обеспечивают структурную стабилизацию белка в изменившихся условиях. Иными словами, такие, на первый взгляд, «случайные» сайты связывания металлов могут оказаться функциональными, нацеленными на сохранение белка в стрессовых условиях.

Известно, что цинк, так же, как и кальций, часто служит для поддержания (стабилизации) структуры белковых макромолекул. Причем эффект стабилизации проявляется на всех уровнях организации структуры белка: четвертичной, третичной, вторичной [99]. Существует множество работ, демонстрирующих защитное антиоксидантное действие цинка на тиоловые группы белков [100]. Наиболее хорошо изучена способность цинка предотвращать окисление тиола и образование дисульфида под действием кислорода в δ -аминолевулинатдегидратазе [101]. Также показано, что цинк ингибирует окисление белков в ишемизированном сердце [102, 103]. Связывание цинка с сульфгидрильными группами защищает сигнально-регуляторные белки от окисления. Таким образом, цинк может влиять на АФК-опосредованную передачу сигналов в клетке [104]. Цинк не взаимодействует с окислителями напрямую, а оказывает свое защитное действие посредством двух механизмов. Согласно первому, замещение железа и меди в белках цинком может предотвратить образование высокорекреационноспособных радикалов, поскольку цинк, в отличие от железа и меди, не катализирует перекисного окисления липидов [105, 106]. Другой механизм связан с защитой цинком белковых сульфгидрильных групп или снижением их реакционной способности. Это происходит либо за счет прямого связывания цинка с сульфгидрилом, либо за счет создания стерического препятствия цинком, связанным вблизи сульфгидрильной группы [107, 108].

V. МЕТАЛЛЫ КАК УЧАСТНИКИ ПРОЦЕССА САМООРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ

Современная биохимия клетки как наука сформировалась, основываясь на исследованиях белков в разбавленных растворах. Однако клеточная среда сильно отличается от разбавленных систем, белки составляют около 40% объема клетки и при этом остаются растворенными [109]. Такой макромолекулярный краудинг (скученность) способствует спонтанному образованию белковых структур более высокого уровня организации, удерживаемых нековалентными взаимодействиями [109, 110]. Эти структуры получили название биомолекулярных конденсатов, которые включают безмембранные органеллы, жидкие конденсаты и твердые конгломераты [111, 112]. Внутри клетки образование и растворение конденсата жестко регулируется. Нарушение этой регуляции является причиной заболеваний, вызванных патологической агрегацией белков.

Показано, что многие белки обладают способностью к самоорганизации [113]. Внутри клетки в условиях стресса, когда происходит истощение источников энергии, цитоплазматические белки могут самопроизвольно собираться в высокоупорядоченные макромолекулярные комплексы [114-118]. В составе комплексов белки остаются защищенными за счет физической изоляции в механически более стабильных структурах, для сохранения которых не требуется энергия [117, 118]. Такая сборка белков обратима, при нормализации условий комплексы распадаются, и клетка переходит в состояние активного метаболизма [115, 118, 119].

До сих пор непонятно, что заставляет изначально растворимые белки самоорганизовываться в фибриллы, пленки, слои, кристаллы. Поэтому стоит задача понять молекулярные механизмы изменения физико-химических свойств белков, которые приводят к появлению в белках распознающих элементов – «липких» участков. Такие участки «сообщают» белкам, в каком именно месте образовать связь, чтобы произошел переход от белковой молекулы к макромолекулярному комплексу.

В последнее время появились работы, в которых доказывается роль металлов в качестве связующих агентов (скрепок) между белковыми макромолекулами, что помогает им собираться в ансамбли [120-122]. Кроме того, ионы металлов позволяют обратимо осуществлять сборку-разборку таких надмолекулярных структур [123, 124].

Белки связывают металлы за счет координационных связей, которые по прочности занимают промежуточное положение между ковалентными и нековалентными химическими взаимодействиями. Благодаря этим связям белки за счет металлов собираются в структуры, обладающие такими уникальными свойствами, как адгезия, прочность, устойчивость к истиранию, твердость и самовосстановление [121, 125]. Примерами белковых полимеров с необычными свойствами, созданных с помощью металлических «скрепок», являются биссусные нити морских мидий, клеи червей, слизи, улиток, морских огурцов, режущие и колющие приспособления членистоногих [121].

Можно привести следующие примеры индуцируемой металлами конденсации белков. В растворах бычьего сывороточного альбумина и β -лактоглобулина Y^{3+} приводит к разделению фаз типа жидкость-жидкость [126]. В работе [127] показано индуцированное ионами многовалентных металлов метастабильное разделение фаз типа жидкость-жидкость в водном растворе белков. В системах *in vitro* Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} вызывают образование жидких белковых конденсатов. Показано индуцированное Zn^{2+} разделение фаз белка в клетках [128].

Zn²⁺ и Cu²⁺ регулируют динамику разделения фаз в биомолекулярных конденсатах пан-ретровирусных нуклеокапсидов [129]. Также эти металлы индуцируют фазовое разделение жидкость-жидкость ядерных рецепторов экистероидов комара *Aedes aegypti* [130].

Ионы металлов, стабилизирующие постоянные или временные межбелковые взаимодействия, позволяют белковым комплексам, участвующим в передаче сигналов в клетке, принимать различные конформации в ответ на стимулы окружающей среды и катализировать сложные химические реакции [131].

Природные белковые полимеры, образованные при участии металлов, послужили в качестве прототипов для конструирования биомиметических металлопротеинов *de novo* с новыми свойствами, отличающихся от природных, возникших в результате биологической эволюции [132]. Стратегии получения искусственных металлопротеинов описаны в работах [133, 134]. Существует две стратегии, позволяющие осуществлять самосборку белка в супрамолекулярные ансамбли с помощью металла: металл-направленный дизайн (Metal-Directed Protein Self-Assembly – MDPSA) и редизайн интерфейса с металлическим шаблоном (Metal-Templated Interface Redesign – MeTIR) [133]. В качестве примера можно привести встраивание в белок дигистиридиновых сайтов, хелатирующих металл [133]. Используя в качестве строительного блока цитохром *cb*₅₆₂, с помощью этих стратегий были созданы функциональные супрамолекулярные комплексы с разнообразной архитектурой, — как структурно настраиваемые олигомеры, так и металлопротеиновые комплексы, способные к самосборке в живых клетках в новые металлоферменты [133]. Металло-супрамолекулярные полимеры на основе белков могут использоваться для разработки функциональных биомиметических материалов: платформы доставки лекарств и биомедицинской диагностики, а также терапевтические платформы, включая вакцины [132]. Также для получения металлопротеинов используют миниатюрные искусственные белковые каркасы (Miniature Artificial Protein Scaffolds), воспроизводящие нативные металлсвязывающие центры [135, 136]. Таким способом были сконструированы белки с новыми или улучшенными функциями, например, O₂-зависимые оксидазы, «быстрые» гидролазы и многопротонные/многоэлектронные редуктазы [134].

VI. УНИВЕРСАЛЬНАЯ БЕЛКОВАЯ РЕАКЦИЯ, АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНОВ И СВЯЗЫВАНИЕ МЕТАЛЛОВ

Образование новых металлсвязывающих центров в белках является одним из проявлений общих неспецифических изменений, происходящих при повреждении белков. Основоположниками учения о неспецифических реакциях белков являются Д.Н.Насонов и В.Я.Александров, сформулировавшие денатурационную теорию повреждения и возбуждения [137]. Сопоставив изменения белков на начальных стадиях денатурации и физиологические конформационные изменения, они пришли к выводу, что при действии на клетки повреждающих агентов различной природы белки цитоплазмы претерпевают изменения, сходные с теми, которые происходят при их переходе в денатурированное или частично денатурированное состояние. Происходит разрыхление макромолекулы, активация аминных, карбоксильных и сульфгидрильных групп, экспонирование неполярных участков, увеличение объема молекулы и снижение гидратированности [137–139]. Следствием этих изменений может быть коагуляция, снижение дисперсности раствора, усиление сорбции красителей и образование дополнительных центров связывания металлов.

Схожесть изменений различных белков при действии физиологических и повреждающих агентов объясняется тем, что изменение структуры макромолекулы на начальных стадиях происходит по одним и тем же траекториям, через одни и те же конформационные интермедиаты. Одним из таких интермедиатов является «расплавленная глобула», образование которой показано для многих глобулярных белков при переходе из нативного в денатурированное состояние, а также при фолдинге [140–143]. Белки в состоянии расплавленной глобулы характеризуются выраженной вторичной и флуктуирующей третичной структурой, а также увеличенной гидрофобной поверхностью. Переход в это состояние происходит под действием низких и высоких значений рН, умеренных концентраций денатурирующих агентов и некоторых солей, а также при нагревании.

Существует точка зрения, что расплавленная глобула – это второе нативное состояние белка [141–143], следовательно, оно может быть необходимо для выполнения белком определенных функций [144]. Не исключено, что это один из способов переключения белка для выполнения альтернативной функции (protein moonlighting) [145]. В настоящее время рассматривается роль частично развернутых конформаций в белок-белковых взаимодействиях, которые могут быть как функционально значимы, так и токсичны для клетки [146,

147]. Развернутые белки с подвижным остовом и боковыми цепями значительно более предрасположены к формированию стабильных полидентатных комплексов металлов, чем нативные белки с их четко определенной трехмерной структурой.

Показано, что Hb образует расплавленную глобулу под действием активного карбонильного соединения глиоксаля [148] и органического растворителя 2,2,2-трифтораэтанол [148, 149]. Аналогичные конформационные изменения происходят и в миоглобине, модифицированном метилглиоксалем [150]. Индуцировать разворачивание белка могут и ионы металлов. Например, переход Mb в состояние расплавленной глобулы запускается связыванием Co^{3+} с гистидиновыми остатками [151]. Индуцировать переход белков в это состояние также может связывание с наночастицами металлов [152]. В некоторых случаях взаимодействие с наночастицами вызывает образование фибрилл [152]. Например, нативный гемоглобин (HbA0) при взаимодействии с наночастицами меди образует расплавленную глобулу, что вызывает агрегацию белка [153].

Переход альбумина в состояние расплавленной глобулы (состояние A) исследован достаточно хорошо. В качестве индуцирующих такой переход факторов было показано действие низких [154, 155] и высоких [156] значений pH, умеренное нагревание [157], микрогравитация [158], действие алкилсодержащих спиртов [155], гликирующих агентов [159], кетоновых тел [160], мочевины [161]. В работе [161] подчеркивается, что именно низкие концентрации мочевины (< 2 М) способствуют переходу альбумина в состояние расплавленной глобулы, при концентрациях выше 2 М белок начинает разворачиваться.

В условиях нашего эксперимента, учитывая низкие концентрации мочевины (0,09 М) и продолжительное время инкубации с денатурирующим агентом (12 часов), переход альбумина в состояние, подобное состоянию расплавленной глобулы (molten globule-like state), вполне вероятен. Альбумин в этом состоянии принимает уникальную конформацию, в которой могут возникать благоприятные для связывания ионов цинка и железа комбинации аминокислотных остатков вблизи тиола Cys34.

Следует отметить и тот факт, что в восстановительных условиях при действии денатурирующих агентов альбумин образует структурный интермедиат I(SH) – дисульфид-восстановленное состояние (urea-denatured disulfide-reduced protein), по физико-химическим характеристикам подобное расплавленной глобуле: $\text{N(S-S)} \leftrightarrow \text{I(SH)} \leftrightarrow \text{D(SH)}$ [162].

VII. АБЕРРАНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ МЕТАЛЛОВ И ПАТОЛОГИИ

Аберрантное связывание металлов белками приводит к их патологической агрегации, являющейся причиной многих заболеваний. Наиболее исследована роль металлов в прогрессировании нейродегенеративных заболеваний: болезни Альцгеймера (бета-амилоид и гиперфосфорилированный тау-белок), болезни Гентингтона (мутантный гентингтин), болезнь Паркинсона (альфа-синуклеин без цинка), болезнь Крейтцфельда-Якоба (патогенный изомер прионного белка), боковой амиотрофический склероз (неправильно свернутая медно-цинковая супероксиддисмутаза) и др. [9, 163]. Это так называемые болезни аномальной полимеризации. К ним также можно причислить и серповидно-клеточную анемию (мутантный гемоглобин HbS). В научной литературе также используется термин «болезни белковой конденсации» (protein condensation diseases) [164]. К конденсированным состояниям белков относят жидкоподобные безмембранные органеллы и твердые агрегаты [164].

Известно, что цинк, медь и железо содержатся в белковых включениях пациентов с болезнью Альцгеймера [9, 165]. Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся снижением когнитивных функций пациента. Ее основной патологический признак – образование нерастворимых белковых отложений бета-амилоида во внеклеточных бляшках и гиперфосфорилированного тау-белка во внутриклеточных нейрофибриллярных клубках. Накопление агрегатов белков нарушает работу синапсов и в конечном итоге приводит к потере нейронов в мозге. По этой причине БА относят одновременно к металлопатиям и протеинопатиям [163].

Патологическую агрегацию провоцируют многие факторы, в том числе окислительный стресс и нарушение гомеостаза металлов [9–11, 165–168] (рис. 5). Причем лабильные ионы металлов в клеточной среде играют ключевую роль.

Изменения в гомеостазе белков и ионов металлов – отличительная черта нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся образованием амилоидов [169]. В некоторых случаях ионы металлов принимают непосредственное участие в качестве модуляторов путей агрегации белков [169]. В настоящее время имеется достаточно свидетельств накопление железа в отложениях альфа-синуклеина и тау-белка при болезни Паркинсона [170], а также меди, цинка и железа в амилоидных бляшках при болезни Альцгеймера [171, 172]. Ионы переходных металлов вызывают изменения структуры

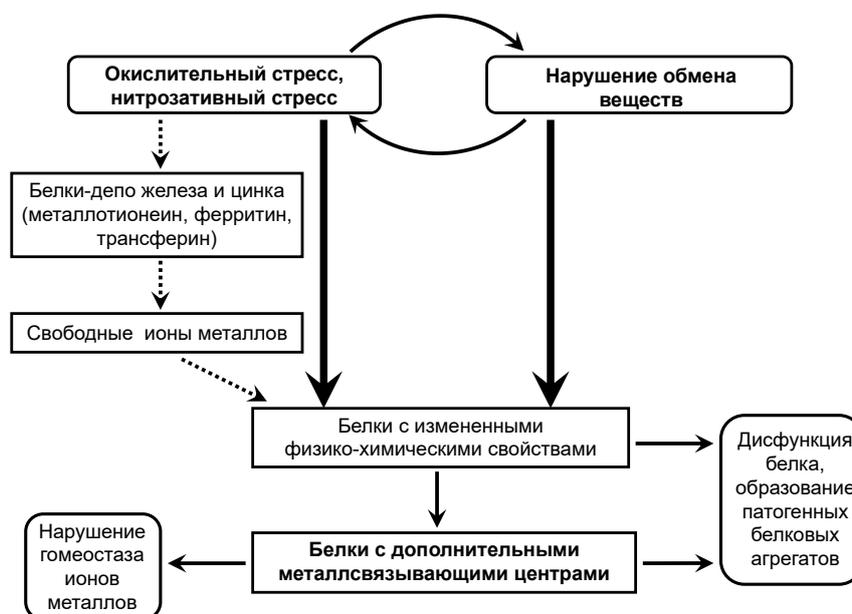


Рис. 5. Появление в белках дополнительных (абберантных) центров связывания металлов при окислительном и нитрозативном стрессах и нарушении обмена веществ.

прионного белка, что приводит к конформационному превращению физиологической изоформы в инфекционную [169, 173]. Рассмотрим вкратце основные белки нейронов, абберантное связывание металлов с которыми приводит к их агрегации и развитию нейродегенеративных заболеваний.

БЕТА-АМИЛОИД

Бета-амилоид (amyloid beta – A β) представляет собой пептид из 42 аминокислотных остатков, образуется из белка – предшественника бета-амилоида. Ионы металлов Cu²⁺, Zn²⁺ и Fe²⁺ связываются с A β , вызывая его сборку в аморфные агрегаты или в амилоидные волокна [174]. Высокие уровни Zn²⁺ и Cu²⁺ направляют агрегацию по пути формирования олигомеров, а не организованных фибрилл. Это имеет негативные последствия для функционирования мозга, поскольку эти олигомерные предшественники запускают цепные реакции образования амилоидных бляшек по прионному механизму. Избыток железа вызывает образование кольцеобразных протофибрилл [175] и направляет агрегацию по пути формирования более коротких и

менее упорядоченных агрегатов, которые потенциально более токсичны [176]. С другой стороны, редокс-активные металлы Cu^{2+} и Fe^{2+} катализируют продукцию АФК, вызывая окислительный стресс, который усиливает токсичность А β и, соответственно, повреждение нейронов [177].

БЕЛОК-ПРЕДШЕСТВЕННИК БЕТА-АМИЛОИДА

Предшественник бета-амилоида (amyloid-beta precursor protein – APP) – трансмембранный белок, концентрирующийся в синапсах нейронов. Нарушенный процессинг APP приводит к продукции бета-амилоида. На процессинг APP, в частности, влияют ионы металлов. В APP в домене E2 был обнаружен высокоаффинный сайт связывания металлов, который конкурентно связывает Cu^{2+} и Zn^{2+} в физиологических концентрациях [178], что приводит к значительным конформационным изменениям и появлению различных структурных состояний белка [179]. APP обладает ферроксидазной активностью, опосредованной консервативным Н-ферритиноподобным активным центром, который специфически ингибируется Zn^{2+} [172]. APP каталитически окисляет Fe^{2+} , загружает Fe^{3+} в трансферрин и в основном взаимодействует с ферропортином, что способствует экспорту железа. Вследствие ингибирования ферроксидазной активности APP в нейронах коры головного мозга при БА накапливается Fe^{2+} и развивается окислительный стресс [172].

ТАУ-БЕЛОК

Тау-белок преимущественно синтезируется в нейронах центральной нервной системы, в которых он ассоциирован с микротрубочками. Он играет важную роль в развитии болезни Альцгеймера и других так называемых тауопатий. Агрегацию и токсическое отложение тау-белка вызывает избыточное фосфорилирование, которое модулируется металлами. Ионы металлов способствуют образованию внутриклеточных парных спиральных филаментов тау-белка (Paired Helical Filaments – PHF), которые затем собираются в нейрофибриллярные клубки (Neurofibrillary Tangles – NFT) [180]. Ионы Zn^{2+} в низких концентрациях вызывают образование фибрилл, тогда как его высокие концентрации способствуют формированию зернистых агрегатов [181]. Ионы Fe^{3+} вызывают агрегацию тау-белка преимущественно в PHF [182]. Влияние Cu^{2+} на агрегацию тау-белка противоречиво. По результатам одних исследований [183], связывание Cu^{2+} с тау-белком способствует его гиперфосфорилированию в нейронах гиппокампа. Согласно другим данным, Cu^{2+} ингибирует фосфорилирование тау-белка и его агрегацию [184].

Тау-белок имеет высокую склонность к конденсации посредством механизма фазового разделения типа жидкость-жидкость (Liquid-liquid phase separation – LLPS) [185]. Цинк усиливает конденсацию тау-белка, сдвигая равновесную фазовую границу в сторону более низких концентраций белка [186, 187], причем другие двухвалентные ионы металлов (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) не оказывают такого действия [186].

БЕЛКИ S100

Белки S100 представляют собой семейство белков, содержащих два Ca^{2+} -связывающих домена типа «EF-руки» (EF-hand) и в некоторых случаях дополнительные центры связывания Zn^{2+} и Cu^{2+} [188]. Белки S100 также обладают амилоидогенными свойствами [189]. Высокое содержание этих белков в амилоидных бляшках в сочетании с их способностью связывать металлы и высокими уровнями Cu^{2+} и Zn^{2+} в белковых отложениях указывает на их участие в развитии БА.

Белок S100B синтезируется преимущественно в астроцитах. Он запускает пролиферацию глиальных клеток посредством взаимодействия с рецепторами RAGE (receptor for advanced glycation end products) [190]. RAGE – иммуноглобулин-подобный рецептор клеточной поверхности, который активируется при БА и запускает экспрессию провоспалительных цитокинов и опосредует транспорт бета-амилоида через гематоэнцефалический барьер [191]. В нейронах S100B в высоких микромолярных концентрациях вызывает воспалительные процессы и апоптоз [192]. В астроцитах повышенная экспрессия S100B способствует появлению дистрофических нейритов, сверхэкспрессирующих APP в диффузных амилоидных отложениях [193].

Cu-Zn-СУПЕРОКСИДИСМУТАЗА

Агрегация медно-цинковой супероксиддисмутазы (SOD1) (КФ 1.15.1.1) в нервных клетках приводит к прогрессированию бокового амиотрофического склероза (БАС). Отличительной чертой патологии БАС является образование включений SOD1 и TAR-ДНК-связывающего белка 43 (transactive response DNA binding protein 43 kDa – TDP-43) в двигательных нейронах и окружающей глии. Ключевую роль в патологической агрегации белка играет aberrantное связывание металлов SOD1 [194]. Фибриллообразование SOD1 также может запускать перекись водорода, которая окисляет Cys-111 до сульфеновой кислоты (Cys-SOH) [195, 196]. Сформированные олигомеры SOD1 размножаются прионоподобным образом, запуская апоптоз [195, 197, 190, 192]. Токсичные агрегаты SOD1 также вызывают непра-

вильную локализацию TDP-43, что характерно для нейрональных цитоплазматических включений (NCI), обнаруживаемых при БАС [196]. Отсутствие ионов Cu^+ и Zn^{2+} снижает стабильность SOD1 и повышает вероятность неправильного сворачивания фермента [197]. Такая внеклеточная неправильно свернутая не содержащая металлов дисульфид-окисленная форма SOD1 (апо-SOD1S-S) передает внутриклеточно и межклеточно в клетки-реципиенты неправильную укладку SOD1.

SOD1 может накапливаться в стрессовых гранулах (SGs), которые представляют собой безмембранные органеллы, образующиеся посредством фазового разделения типа жидкость-жидкость [198]. Отсутствие Zn^{2+} приводит к структурным нарушениям в двух петлевых областях SOD1, индуцируя фазовое разделение SOD1 и образование амилоида [198]. Кроме того, конденсаты SOD1, сформированные в условиях истощения цинка, проявляют большую токсичность, по сравнению с агрегатами, сформированными при длительной инкубации в условиях агрегации.

АЛЬФА-СИНУКЛЕИН

Альфа-синуклеины (α -Syn) – семейство белков, экспрессирующихся в клетках нервной ткани и в некоторых видах опухолей. Аберрантная агрегация неправильно свернутого пресинаптического белка α -Syn в белковые отложения – тельца Леви (LB) и нейриты (аномальные невриты) Леви (LN), является основным патологическим признаком болезни Паркинсона (БП) и других синуклеинопатий [199]. Однако молекулярные механизмы агрегации α -Syn, особенно на ранних стадиях, остаются неясными. Разделение фаз α -Syn типа жидкость-жидкость происходит на стадии зародышеобразования агрегации α -Syn, что предлагает альтернативный неканонический путь агрегации в переполненной микросреде [199]. Жидкоподобные капли α -Syn постепенно претерпевают необратимый фазовый переход из жидкого состояния в твердое и/или в амилоидоподобный гидрогель, захватывая олигомеры и фибриллы [200]. Ca^{2+} модулирует фазовое разделение α -Syn типа жидкость-жидкость, ускоряя агрегацию амилоида [200]. Образовавшиеся капли α -Syn способны в дальнейшем сливаться. Mn^{2+} ускоряет агрегацию амилоида α -Syn за счет индукции фазового перехода белка в твердоподобные конденсаты [201]. Такие конденсаты могут поглощать растворимые мономеры α -Syn. Фазовое разделение белков типа жидкость-жидкость связано с нарушенным метаболизмом железа и является ключевым фактором, вызывающим ферроптоз при развитии болезни Паркинсона [170].

ПРИОНЫ

Прионы (PrP) – представляют собой высококонсервативные гликопротеиды, преимущественно экспрессирующиеся в нейронах и глиальных клетках центральной нервной системы. Конформационное преобразование физиологической изоформы PrP^C, богатой α -спиралями, в патогенную форму «скреипи» (PrP^{Sc}), богатую β -листами, вызывает развитие прионных заболеваний (трансмиссивные губчатые энцефалопатии, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстмана-Штреусслера-Шейнкера и др.) [169, 173]. PrP^{Sc} способны превращать нормальный белок PrP^C в инфекционную изоформу, что приводит к экспоненциальному саморазмножению PrP^{Sc}. PrP^{Sc} объединяются в амилоидные волокна, которые затем формируют бляшки. Прионные заболевания сопровождаются нарушенным гомеостазом металлов и повышенным окислительным стрессом [169]. Однако пока неизвестно, дисбаланс металлов является причиной или следствием прионных заболеваний.

Белок PrP^C участвует в таких важных физиологических функциях, как клеточная дифференцировка, пролиферация, клеточная адгезия, миелинизация нервов, регуляция циркадного ритма, ангиогенез, транспорт ионов металлов [173, 202]. Некоторые из функций связаны со способностью PrP^C связывать ионы переходных металлов [169, 173].

Некоторые металлы с различной аффинностью связываются с PrP^C, влияя на превращение PrP^C в PrP^{Sc}. Основным сайтом связывания Cu²⁺, Zn²⁺ и Mn²⁺ является OR-область – N-концевой домен, содержащий пять высококонсервативных богатых пролином и глицином октапептидных повторов [203, 204].

Связывание меди вызывает конформационные изменения PrP^C, а также способствует его перемещению внутрь клетки. Роль Cu²⁺ в развитии прионных заболеваний неоднозначна. С одной стороны, в работах Canello с соавт. было показано, что в экспериментах *in vivo* и *in vitro* связывание Cu²⁺ индуцирует превращение PrP^C в PrP^{Sc}, что повышает инфекционность и протеолитическую устойчивость белка [205]. В то же время, в аналогичных экспериментах Mitteregger'a с соавт. присутствие Cu²⁺ ингибировало превращение PrP^C в PrP^{Sc} [206]. Одно из возможных объяснений этих противоречивых результатов основывается на том, что влияние Cu²⁺ на конверсию PrP^C в PrP^{Sc} зависит от того, состоит ли матрица из растворимых рекомбинантных/очищенных белков PrP или из предварительно сформированных фибрилл [207]. Рассматривается роль PrP^C в качестве рецептора для регулирования переноса ионов меди клетками [208]. PrP^C может функционировать как хелатирующий агент меди, когда концентрация

внеклеточной меди достигает высоких значений (15–300 мкМ), как, например, при синаптической передаче и деполяризации [209]. Также нельзя исключить, что связывание Cu^{2+} с прионом может наделять его СОД-подобной активностью [210].

Белок PrP^C способен связывать Mn^{2+} по His96 и в С-концевой области между остатками 91 и 230, что вызывает спонтанную конверсию в PrP^{Sc} [211]. Кроме этого, связывание Mn^{2+} с PrP^C защищает клетки от Mn^{2+} -индуцированного окислительного стресса [212].

PrP^C также связывает Zn^{2+} с меньшим сродством и в более низких концентрациях, чем Cu^{2+} . Существует точка зрения, что PrP^C функционирует в качестве сенсора, определяя уровни внеклеточного Zn^{2+} [213]. Кроме того, PrP^C может влиять на поглощение Zn^{2+} посредством ионотропных AMPA-рецепторов глутамата [214]. Связывание Zn^{2+} снижает превращение полноразмерного PrP^C в PrP^{Sc} [215].

В работе [166] показано, что PrP^C связывает ионы железа при воздействии FeCl_2 на клетки нейробластомы человека и трансформируется в PrP^{Sc}-подобную форму (*PrP^{Sc}). Образованный таким образом *PrP^{Sc} индуцирует трансформацию дополнительного PrP^C, моделируя размножение *PrP^{Sc} даже при отсутствии PrP^{Sc}. В головном мозге пациентов со спорадической болезнью Крейтцфельда-Якоба железо накапливается в стабильных белковых комплексах ферритин-PrP^{Sc} [186], что приводит к функциональному дефициту железа.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Окислительный стресс влияет на многие аспекты метаболизма, включая и гомеостаз металлов, особенно цинка, железа и меди. Имеются данные, что в условиях избыточного образования АФК происходит окислительное высвобождение ионов цинка и железа из специализированных белков-депо (таких, как металлотионеин, ферритин, трансферрин) [60]. С другой стороны, появляются окислительно модифицированные белки с нарушенными физико-химическими свойствами, у которых появляются дополнительные центры связывания металлов (рис. 6). Связывание ионов железа и меди модифицированными белками может быть механизмом как снижения реакционных свойств белковых цистеинов, так и удаления свободных металлов, предотвращая их участие в неконтролируемых окислительно-восстановительных реакциях типа Фентона, в которых образуется гидроксильный радикал [177]. Например, в присутствии Zn^{2+} скорость окисления HbO_2 лошади ионами меди значительно уменьшается за счет того, что Zn^{2+} конкурируют с Cu^{2+} за связывание с остатком гистидина [216]. Связывание гемоглобином Fe^{2+} и Fe^{3+} инги-

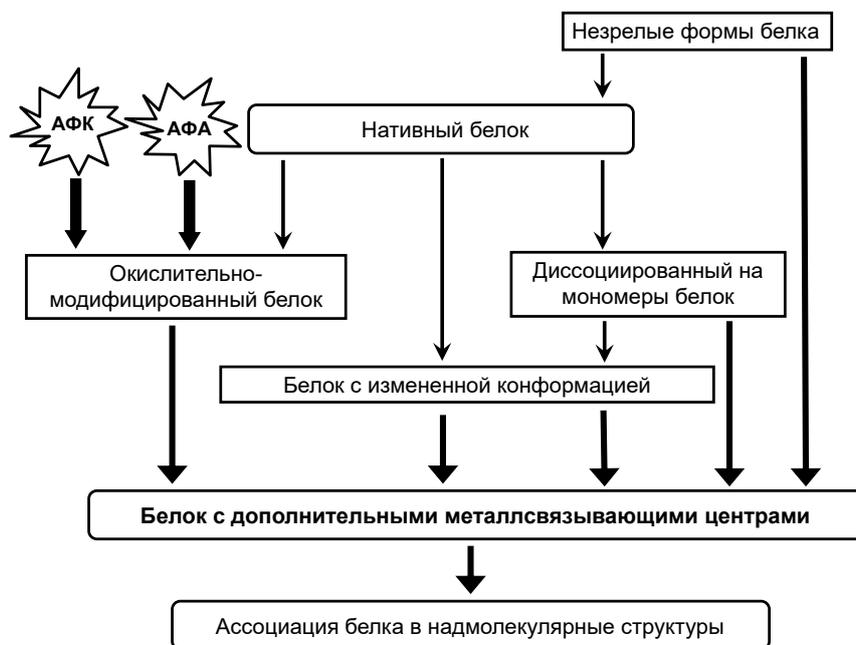


Рис. 6. Образование дополнительных центров связывания металлов в белках в результате нарушения их нативного состояния при неправильном процессинге, нарушении конформации и посттрансляционных модификациях.

АФК – активные формы кислорода, АФА – активные формы азота.

бирует его термическую агрегацию [217], в то время как связывание Zn^{2+} , наоборот, приводит к его коагуляции [37, 218].

Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, можно ли считать появление дополнительных центров связывания металлов в белках при действии АФК и АФА процессом, регулирующим стабильность и реакционную способность белковой молекулы, или это всего лишь следствие повреждения белка. Мы придерживаемся точки зрения, что в условиях слабого и обратимого повреждения белка, его структура переходит в состояние с доступными дополнительными центрами связывания металлов. Связывание металлов с этими центрами стабилизирует измененную конформацию белка, и, возможно, наделяет его новыми функциональными возможностями. При таком сценарии связывание металлов является биологически целесообразной реакцией белка на изменившиеся окислительно-восстановительные условия. Однако этот процесс может иметь и негативные последствия для клетки.

Негативные последствия комплексообразования белков с металлами многообразны. Прежде всего, это изменение третичной структуры, приводящее к снижению каталитической и других видов активности. Модифицированный белок может формировать стабильные агрегаты, а также вызывать специфические иммунные реакции. Дополнительные неспецифические центры могут конкурировать с нативными центрами за связывание металлов и, тем самым, нарушать нормальное функционирование ферментов и транскрипционных факторов, вызывая помехи в метаболических и сигнальных путях. В частности, избыточная адсорбция ионов цинка на белках может стать причиной дефицита пула лабильного цинка в организме, что ведет к серьезным последствиям для здоровья: задержке роста и развития, нарушениям функционирования репродуктивной, иммунной и нейро-сенсорной систем [219].

Обсуждаемые в статье данные могут быть полезны для понимания биологического значения феномена увеличения связывания металлов белками при окислительном и нитрозативном стрессах и различных интоксикациях, сопровождающих такие заболевания, как сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность, а также онкологические заболевания.

Изучение появления дополнительных металлсвязывающих центров в белках может найти применение в биомедицинской практике и биотехнологии. Например, искусственное хелатирование металлов повышает механическую и термодинамическую стабильность белков, а также уменьшает их протеолитическую деградацию [122, 220, 221]. Это важно для разработки эффективных белковых препаратов с заданными наномеханическими свойствами в фармацевтической промышленности. Настраиваемое с помощью металлов фазовое разделение белковых растворов может быть использовано для оптимизации условий получения высококачественных монокристаллов белка и для конструирования биомиметических металлополимеров [122, 133].

Изучение влияния связывания металлов в гемоглобине на его стабильность важно и для разработки безопасных и эффективных кровезаменителей на основе Hb (за счет полимеризации Hb через металлческие «скрепки»). Также это может быть использовано для повышения окислительной стабильности Hb при биоконсервации эритроцитов (за счет воздействия металлов на чувствительные к окислению белковые тиолы). Специфическое связывание металлов с аминокислотным остатком β Cys93 является дополнительным регулятором реакционной способности тиола и кислородсвязывающих свойств гемоглобина [16, 31], поэтому комплексообразование

металлов с $\beta\text{Cys}93$ может найти применение в разработке способов повышения сродства Hb к кислороду. Перед биохимией стоит задача перейти к новому уровню изучения белков в системах, наиболее приближенных к естественным условиям их функционирования в живых клетках.

Окислительный стресс, сопряженный с изменением редокс-условий, как правило, возникает при внешнем повреждающем воздействии (физическое, химическое, биологическое). Поэтому появление в белках дополнительных металлсвязывающих центров можно считать явлением универсальным. Это подтверждают факты обнаружения белковых агрегатов, содержащих металлы, при различных патологиях. Содержание таких агрегатов возрастает и при старении. Основными стратегиями замедления процесса неспецифического связывания металлов белками в организме являются снижение уровня окислительного и нитрозативного стрессов и связывание металлов путем введения в кровоток хелатирующих агентов. Геропротекторное действие хелатирующих агентов, таких, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), было показано еще в 70-х годах прошлого столетия, однако в настоящее время этот вид лечения не является общепризнанным, его иногда применяют в качестве альтернативной медицины. Более эффективным является применение антиоксидантов для борьбы с окислительным стрессом. Мы полагаем, что дальнейшие исследования в данной области прежде всего должны быть сфокусированы на определении роли белковых редокс-активных сульфгидрильных групп в формировании новых металлсвязывающих центров, поскольку SH-группы играют важнейшую роль в настройке стабильности и реакционной способности белков, а также в осуществлении их сигнальных функций. Поэтому изучение таких металлокомплексов, возникающих в белках при изменении окислительно-восстановительных условий, поможет понять молекулярные механизмы адаптации белков.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dutta, A., Bahar, I. (2010) Metal-binding sites are designed to achieve optimal mechanical and signaling properties, *Structure*, **18**, 1140–1148.
2. Wong, B.S., Chen, S.G., Colucci, M., Xie, Z., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M.S., Brown, D.R. (2001) Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease, *Journal of Neurochemistry*, **78**, 1400–1408.
3. Leal, S.S., Cristóvão, J.S., Biesemeier, A., Cardoso, I., Gomes, C.M. (2015) Aberrant zinc binding to immature conformers of metal-free copper-zinc superoxide dismutase triggers amorphous aggregation, *Metallomics*, **7**, 333–346.
4. Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F. (2018) Alternate and additional functions of erythrocyte hemoglobin, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1575–1593.
5. Pieniazek A., Gwozdziński K. (2015) Changes in the conformational state of hemoglobin in hemodialysed patients with chronic renal failure, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2015**, e783073.
6. Pieniazek, A., Gwozdziński, L., Zbrog, Z., Gwozdziński, K. (2018) Alterations in conformational state of albumin in plasma in chronic hemodialyzed patients, *PLoS One*, **13**, e0192268.
7. Harding, M.M. (2004) The architecture of metal coordination groups in proteins, *Acta crystallographica. Section D, biological crystallography*, **60**, Pt 5, 849–859.
8. Schipper, H.M. (2009) Metal accumulation during aging, *Encyclopedia of Neuroscience*, **5**, 811–818.
9. Mezzaroba L., Alfieri D.F., Simão A.N.C., Reiche E.M.V. (2019) The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases, *Neurotoxicology*, **74**, 230–241.
10. Kothapalli, C.R. (2021) Differential impact of heavy metals on neurotoxicity during development and in aging central nervous system, *Current Opinion in Toxicology*, **26**, 33–38.
11. Vielee, S.T., Wise, J.P., Jr (2023) Among gerontogens, heavy metals are a class of their own: a review of the evidence for cellular senescence, *Brain Sciences*, **13**, e500.
12. Гарипова М.И., Ильина О.С., Буторина О.Л., Веселов С.Ю., Шигапова А.И., Новоселова Е.И., Гарипов О.С., Зинатуллина Л.Г., Цветков В.О. (2013) Повышение общей концентрации катионов цинка и снижение концентрации лабильного цинка в крови больных сахарным диабетом типа I, *Фундаментальные исследования*, № 4–2, 368–370.
13. Wang, R., Long, T., He, J., Xu, Y., Wei, Y., Zhang, Y., He, X., He, M. (2022) Associations of multiple plasma metals with chronic kidney disease in patients with diabetes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **244**, e114048.
14. Shumaev, K.B., Kosmachevskaya, O.V., Timoshin, A.A., Vanin, A.F., Topunov, A.F. (2008) Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress, *Methods in Enzymology*, **436**, 445–461.
15. Shumaev, K.B., Gubkin, A.A., Serezhnikov, V.A., Lobysheva, I.I., Kosmachevskaya, O.V., Ruuge, E.K., Lankin, V.Z., Topunov, A.F., Vanin, A.F. (2008) Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin - and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes, *Nitric Oxide*, **18**, 37–46.
16. Kosmachevskaya, O.V., Nasybullina, E.I., Shumaev, K.B., Novikova, N.N., Topunov, A.F. (2021) Protective ef-

- fect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, e13649.
17. Kosmachevskaya, O.V., Nasybullina, E.I., Shumaev, K.B., Topunov, A.F. (2021) Expressed soybean leghemoglobin: effect on *Escherichia coli* at oxidative and nitrosative stress, *Molecules*, **26**, e7207.
 18. Shumaev, K.B., Petrova, N.E., Zabarova, I.V., Vanin, A.F., Topunov, A.F., Lankin, V.Z., Ruuge, E.K. (2004) Interaction of oxoferrylmyoglobin and dinitrosyl-iron complexes, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 569–574.
 19. Shumaev, K.B., Kosmachevskaya, O.V., Grachev, D.I., Timoshin, A.A., Topunov, A.F., Lankin, V.Z., Ruuge, E.K. (2021) A possible mechanism of the antioxidant action of dinitrosyl iron complexes, *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **15**, 313–319.
 20. Kosmachevskaya, O.B., Nasybullina, E.I., Shumaev, K.B., Chumikina, L.V., Arabova, L.I., Yaglova, N.V., Obernikhin, S.S., Topunov, A.F. (2021) Dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands intercept peroxynitrite and protect hemoglobin from oxidative modification, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **57**, 411–420.
 21. Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F. (2021) Nonenzymatic reactions in metabolism: Their role in evolution and adaptation, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **57**, 543–555.
 22. Vanin, A.F. (2016) Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide, *Nitric Oxide*, **54**, 15–29.
 23. Hsiao, H.Y., Chung, C.W., Santos, J.H., Villaflores, O.B., Lu, T.T. (2019) Fe in biosynthesis, translocation, and signal transduction of NO: toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO-delivery scaffolds for tissue engineering, *Dalton Transactions*, **48**, 9431–9453.
 24. Лобышева И.И., Сереженков В.А., Ванин А.Ф. (1999) Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и перекисью водорода *in vivo*, *Биохимия*, **64**, 194–200.
 25. Shumaev, K.B., Gorudko, I.V., Kosmachevskaya, O.V., Grigoryeva, D.V., Panasenko, O.M., Vanin, A.F., Topunov, A.F., Terekhova, M.S., Sokolov, A.V., Cherenkevich, S.N., Ruuge, E.K. (2019) Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2019**, e2798154.
 26. Dudylyna, A.L., Ivanova, M.V., Shumaev, K.B., Ruuge, E.K. (2016) The generation of superoxide radicals by complex III in heart mitochondria and the antioxidant effect of dinitrosyl iron complexes at different partial pressures of oxygen, *Biophysics*, **61**, 257–261.
 27. Ванин А.Ф. (2015) Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина. М.: Ин-т комп. исследований. 219 с.
 28. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Бурбаев Д.Ш., Мох В.П., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. (2013) Образование нового типа динитрозильных комплексов железа, связанных с цистеином, модифицированным метилглиоксалем, *Биофизика*, **58**, 239–245.
 29. Shumaev, K.B., Kosmachevskaya, O.V., Nasybullina, E.I., Gromov, S.V., Novikov, A.A., Topunov, A.F. (2017) New dinitrosyl iron complexes bound with physiologically active dipeptide carnosine, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **22**, 153–160.

30. Shumaev, K.B., Kosmachevskaya, O.V., Nasybullina, E.I., Ruuge, E.K., Topunov, A.F. (2023) Role of nitric oxide-derived metabolites in reactions of methylglyoxal with lysine and lysine-rich protein leghemoglobin, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, e168.
31. Kosmachevskaya, O.V., Nasybullina, E.I., Shumaev, K.B., Novikova, N.N., Topunov, A.F. (2020) Effect of iron–nitric oxide complexes on the reactivity of hemoglobin cysteines, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **56**, 512–520.
32. Brewer, G.J., Prasad, A.S. (1977) *Zinc Metabolism, Current Aspects in Health and Disease*. New York: Alan R. Liss Publ., 378 p.
33. Rifkind, J.M. (1983) Zinc and its role in biology and nutrition. *Metal ions in biological systems*, **15**, 275–309.
34. Rifkind, J.M., Heim, J.M. (1977) Interaction of zinc and hemoglobin: binding of zinc and the oxygen affinity, *Biochemistry*, **16**, 4438–4443.
35. Gilman, J.G., Brewer, G.J. (1978) The oxygen-linked zinc-binding site of human haemoglobin, *Biochemical Journal*, **169**, 625–632.
36. Oelshlegel, Jr.F.J., Brewer, G.J., Knutson, C., Prasad, A.S., Schoemaker, E.B. (1974) Studies on the interaction of zinc with human hemoglobin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **163**, 742–748.
37. Хромова В.С., Мышкин А.Е. (2002) Коагуляция цинк-модифицированного гемоглобина, *Журнал общей химии*, **72**, 1645–1649.
38. Cann J.R. (1964) Kinetics of the reversible reaction of sperm whale myoglobin with zinc, *Biochemistry*, **3**, 714–722.
39. Hunter, C.L., Maurus, R., Mauk, M.R., Lee, H., Raver, E.L., Tong, H., Nguyen, N., Smith, M., Brayer, G.D., Mauk, A.G. (2003) Introduction and characterization of a functionally linked metal ion binding site at the exposed heme edge of myoglobin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 3647–3652.
40. Banaszak, L.J., Watson, H.C., Kendrew, J.C. (1965) The binding of cupric and zinc ions to crystalline sperm whale myoglobin, *Journal of Molecular Biology*, **12**, 130–137.
41. Lepeshkevich, S.V., Dzhagarov, B.M. (2009) Effect of zinc and cadmium ions on structure and function of myoglobin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **1794**, 103–109.
42. Simons, T.J. (1991) Intracellular free zinc and zinc buffering in human red blood cells, *The Journal of Membrane Biology*, **123**, 63–71.
43. Taylor, J.A., Acharya, J., Pearson, T.C., Thompson, R.P. (1991) Zinc improves the filterability of sickle erythrocytes at intermediate oxygen partial pressures, *Clinical Science (London)*, **81**, 433–438.
44. Kruckeber, W.C., Oelshlegel, F.J., Jr., Shore, S.H., Smouse, P.E., Brewer, G.J. (1977) The effects of zinc on the morphology of sickle red blood cell ghosts as observed by scanning electron microscopy, *Research in Experimental Medicine*, **170**, 149–159.
45. Hider, R.C., Ejim, L., Taylor, P.D., Gale, R., Huehns, E., Porter, J.B. (1990) Facilitated uptake of zinc into human erythrocytes. Relevance to the treatment of sickle-cell anaemia, *Biochemical Pharmacology*, **39**, 1005–1012.
46. Son, S.Y., Yoon, H.C. (2009) Zinc ion-mediated concentration of glycosylated hemoglobin for electrochemical biosensing, *Biochip Journal*, **3**, 164–170.
47. Silva, A.M.N., Rangel, M. (2022) The (bio)chemistry of non-transferrin-bound iron, *Molecules*, **27**, e1784.

48. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Лакомкин В.Л., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. (2007) Взаимодействие связанных с альбумином динитрозильных комплексов железа и активных форм кислорода, *Биофизика*, **52**, 534–538.
49. Bal, W., Sokołowska, M., Kurowska, E., Faller, P. (2013) Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, **1830**, 5444–5455.
50. Al-Harathi, S.; Chandra, K.; Jaremko, L. (2022) Lipoic acid restores binding of zinc ions to human serum albumin, *Frontiers in Chemistry*, **10**, 942585.
51. Bal, W., Christodoulou, J., Sadler, P.J., Tucker, A. (1998) Multi-metal binding site of serum albumin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **70**, 33–39.
52. Blindauer, C.A., Harvey, I., Bunyan, K.E., Stewart, A.J., Sleep, D., Harrison, D.J., Berezenko, S., Sadler, P.J. (2009) Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin, *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 23116–23124.
53. Handing, K.B., van Shabalin, G., Kassar, O., Khazaipoul, S., Blindauer, C.A., Stewart, A.J., Chruszcz, M., Minor, W. (2016) Circulatory zinc transport is controlled by distinct interdomain sites on mammalian albumins, *Chemical Science*, **7**, 6635–6648.
54. Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., Ascenzi, P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*, **57**, 787–796.
55. Blindauer, C.A., Khazaipoul, S., Yu, R., Stewart, A.J. (2016) Fatty acid-mediated inhibition of metal binding to the multi-metal site on serum albumin: implications for cardiovascular disease, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **16**, 3021–3032.
56. Novikova, N.N., Yakunin, S.N., Koval'chuk, M.V., Yur'eva, E.A., Stepina, N.D., Rogachev, A.V., Kremennaya, M. A., Yalovega, G.E., Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F. (2019) Possibilities of X-ray absorption spectroscopy in the total external reflection geometry for studying protein films on liquids, *Crytallography Reports*, **64**, 952–957.
57. Novikova, N.N., Kovalchuk, M.V., Yurieva, E.A., Kononov, O.V., Stepina, N.D., Rogachev, A.V., Yalovega, G.E., Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F., Yakunin, S.N. (2019) The enhancement of metal-binding properties in hemoglobin: the role of mild damaging factors, *The Journal of Physical Chemistry B*, **123**, 8370–8377.
58. Bui, V.-M., Weng, S.-L., Lu, C.-T., Chang, T.-H., Weng, J.T.-Y., Lee, T.-Y. (2016) SOHsite: incorporating evolutionary information and physicochemical properties to identify protein S-sulfenylation sites, *BMC Genomics*, **17**, Suppl. 1, e9.
59. Jia, P.W., Buehler, R.A., Boykins, R.M., Venable, R.M., Alayash, I. (2007) Structural basis of peroxide mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway, *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 4894–4907.
60. Giles, N.M., Watts, A.B., Giles, G.I., Fry, F.H., Littlechild, J.A., Jacob, C. (2003) Metal and redox modulation of cysteine protein function, *Chemical Biology*, **10**, 677–693.
61. Bonnet, D., Stevens, J.M., de Sousa, R.A., Sari, M.A., Mansuy, D., Artaud, I. (2001) New inhibitors of iron-containing nitrile important biological control mechanisms ranging from hydratases, *The Journal of Biochemistry*, **130**, 227–233.

62. Ge, W., Clifton, I.J., Stok, J.E., Adlington, R.M., Baldwin, J.E., Rutledge, P.J. (2008) Isopenicillin N-synthase mediates thiolate oxidation to sulfenate in a depsipeptide substrate analogue: Implications for oxygen binding and a link to nitrile hydratase? *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 10096–10102.
63. Arakawa, T., Kawano, Y., Katayama, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., Yohda, M., Odaka, M. (2009) Structural basis for catalytic activation of thiocyanate hydrolase involving metal-ligated cysteine modification, *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 14838–14843.
64. Sieracki, N.A., Tian, S., Hadt, R.G., Zhang, J.-L., Woertink, J.S., Nilges, M.J., Sun, F., Solomon, E.I., Lu, Y. (2014) Copper-sulfenate complex from oxidation of a cavity mutant of *Pseudomonas aeruginosa* azurin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 924–929.
65. Poole, L.B., Karplus, P.A., Clairborne, A. (2004) Sulfenic acids in redox signaling, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44**, 325–347.
66. Martinez, S., Wu, R., Sanishvili, R., Liu, D., Holz, R. (2014) The active site sulfenic acid ligand in nitrile hydratases can function as a nucleophile, *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 1186–1189.
67. Vielee, S.T., Wise, J.P.Jr. (2023) Gerontogens, heavy metals are a class of their own: a review of the evidence for cellular senescence, *Brain Sciences*, **13**, e500.
68. Turell, L., Carballal, S., Botti, H., Radi, R., Alvarez, B. (2009) Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment, *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **42**, 305–311.
69. Nagumo, K., Tanaka, M., Chuang, V.T., Setoyama, H., Watanabe, H., Yamada, N., Kubota, K., Tanaka, M., Matsushita, K., Yoshida, A., Jinnouchi, H., Anraku, M., Kadowaki, D., Ishima, Y., Sasaki, Y., Otagiri, M., Maruyama, T. (2014) Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases, *PLoS One*, **9**, e85216.
70. Musante, L., Bruschi, M., Candiano, G., Petretto, A., Dimasi, N., Del Boccio, P., Urbani, A., Rialdi, G., Ghiggeri, G.M. (2006) Characterization of oxidation end product of plasma albumin *in vivo*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **349**, 668–673.
71. Terawaki, H., Yoshimura, K., Hasegawa, T., Matsuyama, Y., Negawa, T., Yamada, K., Matsushima, M., Nakayama, M., Hosoya, T., Era, S. (2004) Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin, *Kidney International*, **66**, 1988–1993.
72. Musante, L., Candiano, G., Petretto, A., Bruschi, M., Dimasi, N., Caridi, G., Pavone, B., Del Boccio, P., Galliano, M., Urbani, A., Scolari, F., Vincenti, F., Ghiggeri, G.M. (2007) Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin, *Journal of the American Society of Nephrology*, **8**, 799–810.
73. Oettl, K., Stadlbauer, V., Petter, F., Greilberger, J., Putz-Bankuti, C., Hallstrom, S., Lackner, C., Stauber, R.E. (2008) Oxidative damage of albumin in advanced liver disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1782**, 469–473.
74. Spinella, R., Sawhney, R., Jalan, R. (2016) Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications, *Hepatology International*, **10**, 124–132.

75. Suzuki, E., Yasuda, K., Takeda, N., Sakata, S., Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., Miura, K. (1992) Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **18**, 153–158.
76. Hayashi, T., Era, S., Kawai, K., Imai, H., Nakamura, K., Onda, E. (2000) Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract, *Pathophysiology*, **6**, 237–243.
77. Hayakawa, A., Kuwata, K., Era, S., Sogami, M., Shimonaka, H., Yamamoto, M., Dohi, S., Hirose, H. (1997) Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **698**, 27–33.
78. Era, S., Hamaguchi, T., Sogami, M., Kuwata, K., Suzuki, E., Miura, K., Kawai, K., Kitazawa, Y., Okabe, H., Noma, A., Miyata, S. (1988) Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography, *International Journal of Peptide and Protein Research*, **31**, 435–442.
79. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Lorenzini, S., Milzani, A., Rossi, R. (2006) Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma, *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, **61**, 1030–1038.
80. Imai, H., Hayashi, T., Negawa, T., Nakamura, K., Tomida, M., Koda, K., Suda, K., Era, S. (2002) Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training, *Japanese Journal of Physiology*, **52**, 135–140.
81. Salmeen, A., Andersen, J.N., Myers, M.P., Meng, T.C., Hinks, J.A., Tonks, N.K., Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate, *Nature*, **423**, 769–773.
82. Nakamura, T., Yamamoto, T., Abe, M., Matsumura, H., Hagihara, Y., Goto, T., Yamaguchi, T., Inoue, T. (2008) Oxidation of archaeal peroxiredoxin involves a hypervalent sulfur intermediate, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 6238–6242.
83. Bromberg, Y., Aptekmann, A.A., Mahlich, Y., Cook, L., Senn, S., Miller, M., Nanda, V., Ferreira, D.U., Falkowski, P.G. (2022) Quantifying structural relationships of metal-binding sites suggests origins of biological electron transfer, *Science Advances*, **8**, eabj3984.
84. Torrance, J.W., Macarthur, M.W., Thornton, J.M. (2008) Evolution of binding sites for zinc and calcium ions playing structural roles, *Protein*, **71**, 813–830.
85. Van der Gulik, P., Massar, S., Gilis, D., Buhrman, H., Rooman, M. (2009) The first peptides: The evolutionary transition between prebiotic amino acids and early proteins, *The Journal of Theoretical Biology*, **261**, 531–539.
86. Руденко А.П. (1995) Самоорганизация и прогрессивная эволюция в природных процессах в аспекте концепции эволюционного катализа, *Российский химический журнал*, **39**, № 2, 55–71.
87. Ireland S.M., Martin A.C.R. (2019) ZincBind—the database of zinc binding sites, *Database (Oxford)*, **2019**, baz006.
88. Padjasek M., Kocyla A., Kluska K., Kerber O., BaTran J., Kręzel A. (2020) Structural zinc binding sites shaped for greater works: Structure-function relations in classical zinc finger, hook and clasp domains, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **204**, e110955.

89. Vallee, B.L., Auld, D.S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, *Biochemistry*, **29**, 5647–5659.
90. Auld, D.S. (2009) The ins and outs of biological zinc sites, *Biometals*, **22**, 141–148.
91. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. (2006) Zinc through the three domains of life, *Journal of Proteome Research*, **5**, 3173–3178.
92. Parkin, G. (2004) Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes, *Chemical Reviews*, **104**, 699–767.
93. Hristova, V.A., Beasley, S.A., Rylett, R.J., Shaw, G.S. (2009) Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile parkinson-related E3 ligase Parkin, *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 14978–14986.
94. Saini, N., Schaffner, W. (2010) Short Communication Zinc supplement greatly improves the condition of parkin mutant *Drosophila*, *The Journal of Biological Chemistry*, **391**, 513–518.
95. Konovalov, O.V., Novikova, N.N., Kovalchuk, M.V., Yalovega, G.E., Topunov, A.F., Kosmachevskaya, O.V., Yurieva, E.A., Rogachev, A.V., Trigub A.L., Kremennaya, M.A., Borshchevskiy, V.I., Vakhrameev, D.D., Yakunin, S.N. (2020) XANES measurements for studies of adsorbed protein layers at liquid interfaces, *Materials*, **13**, e4635.
96. Novikova, N., Kovalchuk, M., Stepina, N., Gaynutdinov, R., Chukhraic, E., Yurieva, E. (2015) Distinct effect of xenobiotics on the metal-binding properties of protein molecules, *Journal of Synchrotron Radiation*, **22**, 1001–1007.
97. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000) The protein data bank, *Nucleic Acids Research*, **28**, 235–242.
98. Rosato, A., Valasatava, Y., Andreini, C. (2016) Minimal functional sites in metalloproteins and their usage in structural bioinformatics, *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, e671.
99. Kocyla, A., Ba, J., Tran, Krężel A. (2021) Galvanization of protein–protein interactions in a dynamic zinc interactome, *Trends in Biochemical Sciences*, **46**, 64–79.
100. Bray, T.M., Bettger, W.J. (1990) The physiological role of zinc as an antioxidant, *Free Radical Biology and Medicine*, **8**, 281–291.
101. Gibbs, P.N.B., Gore, M.G., Jordan, P.M. (1985) Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in humans: aminolevulinic dehydratase, *Biochemical Journal*, **225**, 573–580.
102. Powell, S.R. (1994) Salicylate trapping of OH as a tool for studying post-ischemic oxidative injury in the isolated rat heart, *Free Radical Research Communications*, **21**, 355–370.
103. Powell, S.R., Gurzenda, E.M., Wingertzohan, M.A., Wapnir, R.A. (1999) Promotion of copper excretion from the isolated perfused rat heart attenuates postischemic cardiac oxidative injury, *American Journal of Physiology*, **277**, 956–962.
104. Marreiro, D.D., Cruz, K.J., Morais, J.B., Beserra, J.B., Severo, J.S., de Oliveira, A.R. (2017) Zinc and oxidative stress: current mechanisms, *Antioxidants*, **6**, e24.
105. Oteiza, P.I. (2012) Zinc and the modulation of redox homeostasis, *Free Radical Biology and Medicine*, **53**, 1748–1759.
106. Mammadova-Bach, E., Braun, A. (2019) Zinc homeostasis in platelet-related diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, e5258.

107. Bray, T.M., Bettger, W.J. (1990) The physiological role of zinc as an antioxidant, *Free Radical Biology and Medicine*, **8**, 281–291.
108. Powell, S.R. (2000) The antioxidant properties of zinc, *Journal of Nutrition*, **130**, Suppl 5S, 1447S–1454S.
109. Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 597–604.
110. Kuriyan, J., Eisenberg, D. (2007) The origin of protein interactions and allostery in colocalization, *Nature*, **450**, 983–990.
111. Alberti, S., Hyman, A.A. (2021) Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **22**, 196–213.
112. Vazquez, D.S., Toledo, P.L., Giannotti, A.R., Ermácora, M.R. (2022) Protein conformation and biomolecular condensates, *Current Research in Structural Biology*, **4**, 285–307.
113. Garcia-Seisdedos, H., Villegas, J.A., Levy, E.D. (2019) Infinite assembly of folded proteins in evolution, disease, and engineering, *Angewandte Chemie*, **58**, 5514–5531.
114. O'Connell, J.D., Zhao, A., Ellington, A.D., Marcotte, E.M. (2012) Dynamic reorganization of metabolic enzymes into intracellular bodies, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **28**, 89–111.
115. Petrovska I., Nüske E., Munder M.C., Kulasegaran G., Malinowska L., Kroschwald S., Richter D., Fahmy K., Gibson K., Verbavatz J.-M. (2014) Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation, *eLife*, **3**, e02409.
116. Munder, M.C., Midtvedt, D., Franzmann, T., Nüske, E., Otto, O., Herbig, M., Ulbricht, E., Müller, P., Taubenberger, A., Maharana, S., Malinowska L., Richter D., Guck J., Zaburdaev V., Alberti S. (2016) A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid- to a solid-like state promotes entry into dormancy, *eLife*, **5**, e09347.
117. Minsky, A., Shimoni, E., Frenkiel-Krispin, D. (2002) Stress, order and survival, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 50–60.
118. Rabouille, C., Alberti, S. (2017) Cell adaptation upon stress: the emerging role of membrane-less compartments, *Current Opinion in Cell Biology*, **47**, 34–42.
119. Parry, B.R., Surovtsev, I.V., Caabeen, M.T., O'Hern, C.S., Dufresne, E.R., Jacobs-Wagner, C. (2014) The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity, *Cell*, **156**, 183–194.
120. Salgado, E.N., Ambroggio, X.I., Brodin, J.D., Lewis, R.A., Kuhlman, B., Tezcan, F.A. (2010) Metal templated design of protein interfaces, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 1827–1832.
121. Degtyar, E., Harrington, M.J., Politi, Y., Fratzl, P. (2014) The mechanical role of metal ions in biogenic protein based materials, *Angewandte Chemie*, **53**, 12026–12044.
122. Yang, Y.J., Holmberg, A.L., Olsen, B.D. (2017) Artificially engineered protein Polymers, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, **8**, 549–575.
123. Soraruf, D., Roosen-Runge, F., Grimaldo, M., Zanini, F. (2014) Protein cluster formation in aqueous solution in the presence of multivalent metal ions – a light scattering study, *Soft Matter*, **10**, 894–902.

124. Wolf, M. (2015) *Effective interactions in liquid-liquid phase separated protein solutions induced by multivalent ions*, Thesis for PhD. Tübingen, Germany: Eberhard Karls Universität, 176 p.
125. Lee, B.P., Messersmith, P.B., Israelachvili, J.N., Waite, J.H. (2011) Mussel-inspired adhesives and coatings, *Annual Review of Materials Research*, **41**, 99–132.
126. Zhang F., Zocher G., Sauter A., Stehle T., Schreiber F. (2011) Novel approach to controlled protein crystallization through ligandation of yttrium cations, *Journal of Applied Crystallography*, **44**, 755–762.
127. Zhang, F., Roth, R., Wolf, M., Roosen-Runge, F., Skoda, M.W.A., Jacobs, R.M.J., Sztucki, M., Schreiber, F. (2012) Charge-controlled metastable liquid–liquid phase separation in protein solutions as a universal pathway towards crystallization, *Soft Matter*, **8**, e1313.
128. Hong, K., Song, D., Jung, Y. (2020) Behavior control of membrane-less protein liquid condensates with metal ion-induced phase separation, *Nature Communications*, **11**, e5554.
129. Monette, A., Mouland, A.J. (2020) Zinc and copper ions differentially regulate prion-like phase separation dynamics of pan-virus nucleocapsid biomolecular condensates, *Viruses*, **12**, e1179.
130. Wiech, A., Tarczewska, A., O'zyha, A., Orłowski, M. (2021) Metal ions induce liquid condensate formation by the F domain of Aedes aegypti ecdysteroid receptor. New perspectives of nuclear receptor studies, *Cells*, **10**, e571.
131. Song, W.J., Pamela, A.S., Ambroggio, X.I., Tezcan, F.A. (2014) Metals in Protein–Protein Interfaces, *Annual Review of Biophysics*, **43**, 409–431.
132. Kim, N.H., Choi, H., Shahzad, Z.M., Ki, H., Lee, J., Chae, H., Kim, Y.H. (2022) Supramolecular assembly of protein building blocks: from folding to function, *Nano Convergence*, **9**, e4.
133. Bailey, J.B., Subramanian, R.H., Churchfield, L.A., Tezcan, F.A. (2016) Metal-directed design of supramolecular protein assemblies, *Methods in Enzymology*, **580**, 223–250.
134. Chalkley, M.J., Mann, S.I., DeGrado, W.F. (2022) De novo metalloprotein design, *Nature Reviews Chemistry*, **6**, 31–50.
135. Peacock, A.F.A. (2013) Incorporating metals into de novo proteins, *Current Opinion in Chemical Biology*, **17**, 934–939.
136. Slope, L.N., Peacock, A.F.A. (2016) De novo design of xenometallo coiled coils, *Chemistry: An Asian Journal*, **11**, 660–666.
137. Александров В.Я. (1985) *Реактивность клеток и белки*. Л.: Наука. 318 с.
138. Matveev, V.V. (2005) Protoreaction of protoplasm, *Cellular and Molecular Biology*, **51**, 715–723.
139. Agutter, P.S. (2007) Cell mechanics and stress: from molecular details to the 'universal cell reaction' and hormesis, *Bioessays*, **29**, 324–333.
140. Бычкова В.Е., Басова Л.В., Балобанов В.А. (2014) Как мембранная поверхность воздействует на структуру белков, *Успехи биологической химии*, **54**, 133–202.
141. Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Balobanov, V.A., Finkelstein, A.V. (2018) The molten globule concept: 45 years later, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, Suppl 1, S33–S47.
142. Bychkova, V.E., Dolgikh, D.A., Balobanov, V.A., Finkelstein, A.V. (2022) The molten globule state of a globular protein in a cell Is more

- or less frequent case rather than an exception, *Molecules*, **27**, e4361.
143. Gupta, M.N., Uversky, V.N. (2023) Pre-molten, wet, and dry molten globules en route to the functional state of proteins, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, e2424.
144. Bhowmick, J., Chandra, S., Varadarajan, R. (2023) Deep mutational scanning to probe specificity determinants in proteins. *Structure and Intrinsic Disorder in Enzymology*. Elsevier: Amsterdam, pp. 31–71.
145. Gupta, M., Pandey, S., Ehtesham, N.Z., Hasnain, S.E. (2019) Medical implications of protein moonlighting, *Indian Journal of Medical Research*, **149**, 322–325.
146. Es-haghi, A., Moghaddam, M.J., Shahpasand, K. (2019) Role of pre-molten globule structure in protein amyloid fibril formation, *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, **7**, 35–42.
147. Blundell, T.L., Gupta, M.N., Hasnain, S.E. (2020) Intrinsic disorder in proteins: Relevance to protein assemblies, drug design and host-pathogen interactions, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **156**, 34–42.
148. Iram, A., Alam, T., Khan, J.M., Khan, T.A., Khan, R.H., Naeem, A. (2013) Molten globule of hemoglobin proceeds into aggregates and advanced glycated end products, *PLoS One*, **8**, e72075.
149. Dave, S., Mahajan, S., Chandra, V., Gupta, P. (2011) Trifluoroethanol stabilizes the molten globule state and induces non-amyloidic turbidity in stem bromelain near its isoelectric point, *International Journal of Biological Macromolecules*, **49**, 536–542.
150. Banerjee, S. (2021) Long-term incubation of myoglobin with glyoxal induces amyloid like aggregation of the heme protein: Implications of advanced glycation end products in protein conformational disorders. *Journal of Molecular Liquids*, **326**, e115256.
151. Blum, O., Haiek, A., Cwikel, D., Gray, H.B. (1998) Isolation of a myoglobin molten globule by selective cobalt(III)-induced unfolding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6659–6662.
152. Mukhopadhyay, A., Basu, S., Singha, S., Patra, H.K. (2018) Inner-view of nanomaterial incited protein conformational changes: insights into designable interaction, *Research (Washington, DC)*, **2018**, e9712832.
153. Bhattacharya J., Choudhuri U., Siwach O., Sen P., Dasgupta A.K. (2006) Interaction of hemoglobin and copper nanoparticles: Implications in hemoglobinopathy, *Nanomedicine*, **2**, 191–199.
154. Muzammil, S., Kumar, Y., Tayyab, S. (1999) Molten globule-like state of human serum albumin at low pH, *European Journal of Biochemistry*, **266**, 26–32.
155. Kumar, Y., Tayyab, S., Muzammil, S. (2004) Molten-globule like partially folded states of human serum albumin induced by fluoro and alkyl alcohols at low pH, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **426**, 3–10.
156. Sen, P., Ahmad, B., Khan, R.H. (2008) Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH, *European Biophysics Journal*, **37**, 1303–1308.
157. Farruggia, B., Picó, G.A. (1999) Thermodynamic features of the chemical and thermal denaturations of human serum albumin, *International Journal of Biological Macromolecules*, **26**, 317–323.

158. Hekmat, A., Hajebrahimi, Z., Motamedzade, A. (2017) Structural changes of human serum albumin (HSA) in simulated microgravity, *Protein and Peptide Letters*, **24**, 1030–1039.
159. Sattarahmady N., Moosavi-Movahedi A.A., Ahmad F., Hakimelahi G.H., Habibi-Rezaei M., Saboury A.A., Sheibani N. (2007) Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1770**, 933–942.
160. Bohlooli, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Taghavi, F., Habibi-Rezaei, M., Seyedarabi, A., Saboury, A.A., Ahmad, F. (2013) Thermodynamics of a molten globule state of human serum albumin by 3- β -hydroxybutyrate as a ketone body, *International Journal of Biological Macromolecules*, **54**, 258–263.
161. Muralidhara, B.K., Prakash, V. (2002) Molten globule intermediates of human serum albumin in low concentration of urea, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **39**, 318–324.
162. Lee, J.Y., Hirose, M. (1992) Partially folded state of the disulfide-reduced form of human serum albumin as an intermediate for reversible denaturation, *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 14753–14758.
163. Islam, F., Shohag, S., Akhter, S., Islam, Md.R., Sultana, S., Mitra, S., Chandran, D., Khandaker, M.U., Ashraf, G., Idris, A.M., Emran, T.B., Cavalu, S. (2022) Exposure of metal toxicity in Alzheimer's disease: An extensive review, *Frontiers in Pharmacology*, **13**, e903099.
164. Vendruscolo, M., Fuxreiter, M. (2022) Protein condensation diseases: therapeutic opportunities, *Nature Communications*, **13**, e5550.
165. Cristóvão, J.S., Santos, R., Gomes, C.M. (2015) Metals and neuronal metal binding proteins implicated in Alzheimer's disease, *Neurodegeneration, Neurogenesis, and Oxidative Stress*, **2016**, e9812178.
166. Basu, S., Moha, M. L., Luo, X., Kundu, B., Kong, Q., Singh, N. (2007) Modulation of proteinase K-resistant prion protein in cells and infectious brain homogenate by redox iron: implications for prion replication and disease pathogenesis, *Molecular Biology of the Cell*, **18**, 3302–3312.
167. Caito, S., Aschner, M. (2015) Neurotoxicity of metals, *Handbook of Clinical Neurology*, **131**, 169–189.
168. Devi, S., Chaturvedi, M., Fatima, S., Priya, S. (2022) Environmental factors modulating protein conformations and their role in protein aggregation diseases, *Toxicology*, **465**, e153049.
169. Toni, M., Massimino, M.L., De Mario, A., Angiulli, E., Spisni, E. (2017) Metal dyshomeostasis and their pathological role in prion and prion-like diseases: the basis for a nutritional approach, *Frontiers in Neuroscience*, **11**, e3.
170. Li, M., Fan, Y., Li, Q., Wang, X., Zhao, L., Zhu, M. (2022) Liquid-liquid phase separation promotes protein aggregation and its implications in ferroptosis in Parkinson's disease dementia, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2022**, e7165387.
171. Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., Sensi, S.L. (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy, *Trends in Pharmacological Sciences*, **30**, 346–355.
172. Duce, J.A., Tsatsanis, A., Cater, M.A. James, S.A., Robb, E., Wikhe, K., Leong, S.L., Perez, K.,

- Johanssen, T., Greenough, M.A., Cho, H.-H., Galatis, D., Moir, R.D., Masters, C.L., McLean, C., Tanzi, R.E., Cappai, R., Barnham, K.J., Ciccotosto, G.D., Rogers, J.T., Bush, A.I. (2010) Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease, *Cell*, **142**, 857–867.
173. La Mendola, D., Rizzarelli, E. (2014) Evolutionary implications of metal binding features in different species' prion protein: an inorganic point of view, *Biomolecules*, **4**, 546–565.
174. Chen, W.-T., Liao, Y.-H., Yu, H.-M., Cheng, I.H., Chen, Y.-R. (2011) Distinct effects of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , and Al^{3+} on amyloid- β stability, oligomerization, and aggregation: amyloid- β destabilization promotes annular protofibril formation, *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 9646–9656.
175. Bolognin, S., Messori, L., Drago, D., Gabbiani, C., Cendron, L., Zatta, P. (2011) Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid-A β (1–42) aggregation and toxicity, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **43**, 877–885.
176. Liu, B., Moloney, A., Meehan, S., Morris, K., Thomas, S.E., Serpell, L.C., Hider, R., Marciniak, S.J., Lomas, D.A., Crowther, D.C. (2011) Iron promotes the toxicity of amyloid β peptide by impeding its ordered aggregation, *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 4248–4256.
177. Rival T., Page R.M., Chandraratna D.S., Sendall T.J., Ryder E., Liu B., Lewis H., Rosahl T., Hider R., Camargo L.M., Shearman M.S., Crowther D.C., Lomas D.A. (2009) Fenton chemistry and oxidative stress mediate the toxicity of the β -amyloid peptide in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease, *European Journal of Neuroscience*, **29**, 1335–1347.
178. Spuerri, L., Vella, L.J., Pham, C.L.L., Barnham, K.J., Cappai, R. (2012) The amyloid precursor protein copper binding domain histidine residues 149 and 151 mediate APP stability and metabolism, *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 26840–26853.
179. Dahms, S.O., Könnig, I., Roeser, D., Gührs, K.-H., Mayer, M.C., Kaden, D., Multhaup, G., Than, M.E. (2012) Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain, *Journal of Molecular Biology*, **416**, 438–452.
180. Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., Takashima, A. (2007) Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments, *Biochemistry*, **46**, 3856–3861.
181. Mo, Z.-Y., Zhu, Y.-Z., Zhu, H.-L., Fan, J.-B., Chen, J., Liang, Y. (2009) Low micromolar zinc accelerates the fibrillization of human Tau via bridging of Cys-291 and Cys-322, *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 34648–34657.
182. Yamamoto, A., Shin, R.-W., Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F., Kitamoto, T. (2002) Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Journal of Neurochemistry*, **82**, 1137–1147.
183. Kitazawa, M., Cheng, D., Laferla, F.M. (2009) Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively dysregulates cdk5 in a mouse model of AD., *Journal of Neurochemistry*, **108**, 1550–1560.

184. Crouch, P.J., Lin, W.H., Adlard, P.A., Barnham, K.J. (2009) Increasing Cu bioavailability inhibits A β oligomers and tau phosphorylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 381–386.
185. Boyko, S., Surewicz, W.K. (2022) Tau liquid-liquid phase separation in neurodegenerative diseases, *Trends in Cell Biology*, **32**, 611–623.
186. Singh, A., Isaac, A.O., Luo, X., Mohan, M.L., Cohen, M.L., Chen, F., Kong Q., Bartz, J., Singh, N. (2009) Abnormal brain iron homeostasis in human and animal prion disorders, *PLOS Pathogens*, **5**, e1000336.
187. Gao, Y.Y., Zhong, T., Wang, L.Q., Zhang, N., Zeng, Y., Hu, J.Y., Dang, H.B., Chen, J., Liang, Y. (2022) Zinc enhances liquid-liquid phase separation of Tau protein and aggravates mitochondrial damages in cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, **209**, Pt A, 703–715.
188. Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., Geczy, C.L. (2013) Functions of S100 proteins, *Current Molecular Medicine*, **13**, 24–57.
189. Vogl, T., Gharibyan, A. L., Morozova-Roche, L.A. (2012) Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: Self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes, *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 2893–2917.
190. Selinfreund, R.H., Barger, S.W., Pledger, W.J., Van Eldik, L.J. (1991) Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 3554–3558.
191. Cai, Z., Liu, N., Wang, C., Qin, B., Zhou, Y., Xiao, M., Chang, L., Yan, L.-J., Zhao, B. (2016) Role of RAGE in Alzheimer's disease, *Cellular and Molecular Neurobiology*, **36**, 483–495.
192. Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain, *Restorative Neurology and Neuroscience*, **21**, 97–108.
193. Wang, Y., Li, J., Sheng, J.G., Li, Y., Wang, J., Sheng, J.G., Liu, L., Barger, S.W., Jones, R.A., Van Eldik, L.J., Mrak, R.E., Griffin, W.S. (1998) S100 β increases levels of β -amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures, *Journal of Neurochemistry*, **71**, 1421–1428.
194. Sirangelo, I., Iannuzzi, C. (2017) The role of metal binding in the amyotrophic lateral sclerosis-related aggregation of copper-zinc superoxide dismutase, *Molecules*, **22**, e1429.
195. Xu, W.C., Liang, J.Z., Li, C., He, Z.X., Yuan, H.Y., Huang, B.Y., Liu, X.L., Tang, B., Pang, D.W., Du, H.N., Yang, Y., Chen, J., Wang, L., Zhang, M., Liang, Y. (2018) Pathological hydrogen peroxide triggers the fibrillization of wild-type SOD1 via sulfenic acid modification of Cys-111, *Cell Death and Disease*, **9**, e67.
196. Sanghai, N., Tranmer, G.K. (2021) Hydrogen peroxide and amyotrophic lateral sclerosis: from biochemistry to pathophysiology, *Antioxidants*, **11**, e52.
197. Takashima, C., Kosuge, Y., Inoue, M., Ono, S.I., Tokuda, E. (2021) A metal-free, disulfide oxidized form of superoxide dismutase 1 as a primary misfolded species with prion-like properties in the extracellular environments surrounding motor neuron-like cells, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, e4155.

198. Das, B., Roychowdhury, S., Mohanty, P., Rizuan, A., Chakraborty, J., Mittal, J., Chattopadhyay, K. (2022) A Zn-dependent structural transition of SOD1 modulates its ability to undergo phase separation, *The EMBO Journal*, **42**, e111185.
199. Mukherjee, S., Sakunthala, A., Gadhe, L., Poudyal, M., Sawner, A.S., Kadu, P., Maji, S.K. (2023) Liquid-liquid phase separation of α -synuclein: A new mechanistic insight for α -synuclein aggregation associated with parkinson's disease pathogenesis, *Journal of Molecular Biology*, **435**, 167713.
200. Huang, S., Xu, B., Liu, Y. (2022) Calcium promotes α -synuclein liquid-liquid phase separation to accelerate amyloid aggregation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **603**, 13–20.
201. Xu, B., Huang, S., Liu, Y., Wan, C., Gu, Y., Wang, D., Yu, H. (2022) Manganese promotes α -synuclein amyloid aggregation through the induction of protein phase transition, *Journal of Biological Chemistry*, **298**, e101469.
202. Peggion, C., Bertoli, A., Sorgato, M.C. (2016) Almost a century of prion protein(s): from pathology to physiology, and back to pathology, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **483**, 1148–1155.
203. Brown, D.R. (2011) Prions and manganese: a maddening beast, *Metallomics*, **3**, 229–238.
204. Benetti, F., Biarnés, X., Attanasio, F., Giachin, G., Rizzarelli, E., Legname, G. (2014) Structural determinants in prion protein folding and stability. *Journal of Molecular Biology*, **426**, 3796–3810.
205. Canello, T., Friedman-Levi, Y., Mizrahi, M., Binyamin, O., Cohen, E., Frid, K., Gabizon, R. (2012) Copper is toxic to PrP-ablated mice and exacerbates disease in a mouse model of E200K genetic prion disease, *Neurobiology of Disease*, **45**, 1010–1017.
206. Mitteregger, G., Korte, S., Shakarami, M., Herms, J., Kretzschmar, H.A. (2009). Role of copper and manganese in prion disease progression, *Brain Research*, **1292**, 155–164.
207. Liu, M., Yu, S., Yang, J., Yin, X., Zhao, D. (2007) RNA and CuCl₂ induced conformational changes of therecombinant ovine prion protein, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **294**, 197–203.
208. Vassallo, N., Herms, J. (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse, *Journal of Neurochemistry*, **86**, 538–544.
209. Brown, D.R. (2001) Prion and prejudice: Normal protein and the synapse, *Trends in Neurosciences*, **24**, 85–90.
210. Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J., Jones, I.M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase, *Biochemical Journal*, **344**, Pt 1, 1–5.
211. Pass, R., Frudd, K., Barnett, J.P., Blindauer, C.A., Brown, D.R. (2015) Prion infection in cells is abolished by a mutated manganese transporter but shows no relation to zinc, *Molecular and Cellular Neuroscience*, **68**, 186–193.
212. Choi, C.J., Anantharam, V., Saetveit, N.J., Houk, R.S., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G. (2007). Normal cellular prion protein protects against manganese-induced oxidative stress and apoptotic cell death, *Toxicological Sciences*, **98**, 495–509.
213. Rana, A., Gnaneswari, D., Bansal, S., Kundu, B. (2009) Prion metal interaction: is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal

- imbalance? *Chemico-Biological Interactions*, **181**, 282–291.
214. Watt, N.T., Griffiths, H.H., Hooper, N.M. (2013) Neuronal zinc regulation and the prion protein, *Prion*, **7**, 203–208.
215. Kenward, A.G., Bartolotti, L.J., Burns, C.S. (2007) Copper and zinc promote interactions between membrane-anchored peptides of the metal binding domain of the prion protein, *Biochemistry*, **46**, 4261–4271.
216. Постникова, Г.Б., Шеховцова, Е.А. (2016) Гемоглобин и миоглобин как восстановительные реагенты в биологических системах. Редокс-реакции глобинов с солями и комплексами меди и железа, *Успехи биологической химии*, **56**, 337–376.
217. Debnath, S., Chakrabarti, A. (2020) Effects of free soluble iron on thermal aggregation of hemoglobin, *Biophysical Chemistry*, **269**, e106527.
218. Kozlova, E., Chernysh, A., Moroz, V., Sergunova, V., Gudkova, O., Fedorova, M., Kuzovlev, A. (2012) Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, **14**, 3–13.
219. Lee, S.R. (2018) Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2018**, e9156285.
220. Kellis, J.T.Jr., Todd, R.J., Arnold, F.H. (1991) Protein stabilization by engineered metal chelation, *Biotechnology (New York)*, **10**, 994–995.
221. Chung, H.-S., Lee, S., Park, S.J. (2016) Oxidation protection in metal-binding peptide motif and its application to antibody for site-selective conjugation, *PLoS One*, **11**, e0159451.