

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 577.128

doi: 10.17223/19988591/31/6

И.Е. Злобин

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия

Лабильный пул ионов меди как необходимый компонент системы ее клеточного гомеостатирования

Существенная часть меди в клетках находится в виде комплексов с низкомолекулярными лигандами, образуя лабильный пул данного металла. За счет сохранения кинетической подвижности ионов меди в составе лабильного пула происходит ее распределение по клетке и доставка к медьсвязывающим белкам, например металлошаперонам и металлоферментам. Вероятно, основными лигандами лабильных ионов меди в клетке являются различные цистеин-содержащие соединения. Обсуждается роль глутатиона, металлотионеинов, фитохелатинов и некоторых других соединений в связывании лабильного пула ионов меди. Определяется возможная роль низкомолекулярных комплексов меди в генерации активных форм кислорода.

Ключевые слова: медь; лабильный пул; АФК, металлотионеины; глутатион.

Введение

Медь является необходимым для аэробных организмов элементом; в то же время медь – один из наиболее токсичных тяжелых металлов. Клеткам необходимо обеспечивать адресную доставку ионов данного металла к медьсодержащим белкам, вместе с тем не допуская ее случайных взаимодействий с другими биомолекулами.

Аффинность связывания меди с белками и другими биомолекулами очень высока [1–3], а неспецифическое связывание ионов меди с биомолекулами способно изменять их структуру и нарушать биологические функции. Кроме того, медь является редокс-активным металлом, который способен в ходе реакции Фентона генерировать высокоактивные свободные радикалы из сравнительно инертных активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид или H_2O_2 [5, 6]. При этом в генерации АФК способны участвовать не только свободные акваионы меди, которые в клетке отсутствуют [6, 7], но и ионы меди в связанной форме, если при этом в сайте связывания сохраняется возможность окислительно-восстановительных переходов между Cu(I) и Cu(II) [8–12].

С другой стороны, очень высокая способность цитоплазмы клеток связывать медь означает, что медьсодержащие ферменты не могут снабжать-

ся данным элементом просто за счет термодинамически свободных ионов меди, растворенных в цитозоле [6, 13]. Сразу же после поступления в клетку медь должна связываться с определенными соединениями, причем образующиеся комплексы должны обладать следующими свойствами:

- аффинность связывания меди данными комплексами должна быть высока, чтобы не допускать случайного перехода ионов меди на не предназначенные для этого биомолекулы, т.е. комплексы должны иметь высокую термодинамическую стабильность;

- в то же время медь в составе комплексов должна быть кинетически лабильной, чтобы легко переходить к металлсвязывающим сайтам специфических медьсодержащих белков по термодинамическому градиенту;

- соединения должны легко перемещаться по клетке; кроме того, их концентрация во внутриклеточной среде должна быть велика. Это необходимо для того, чтобы перехватывать ионы меди сразу же после их поступления в клетку, а потом быстро переносить ее по клетке к сайтам требования;

- медь в этих соединениях должна быть стабилизирована в одной окислительной форме и не способна генерировать АФК.

Действительно, в клетке, помимо меди, находящейся в составе металлопротеинов, где она выполняет свои физиологические функции, значительная часть меди находится в виде кинетически лабильного обменного пула, в состав которого медь включается сразу после поглощения и откуда переходит в состав металлопротеинов [14, 15]. Основу лабильного пула меди, по всей видимости, составляют комплексы Cu(I) с цистеинсодержащими биомолекулами. Цель данной работы состоит в том, чтобы рассмотреть основные группы соединений, участвующих в формировании лабильного пула ионов меди в клетках, заострив внимание на оценке кинетической подвижности ионов меди в составе данных комплексов, а также на способности комплексов участвовать в генерации АФК.

Роль глутатиона в формировании лабильного пула ионов меди

Значительная часть лабильного пула меди в клетке может быть образована комплексами Cu(I) с глутатионом [16–18]. Восстановленный глутатион (GSH) имеет очень высокую аффинность связывания с одновалентной медью; константа диссоциации комплекса Cu(I)–GSH составляет порядка 10^{-11} М [18]. Глутатион содержится в клетках в высоких концентрациях [19], и его содержание примерно на 2 порядка превышает общее содержание в них меди [6]. В культурах клеток млекопитающих показано, что в контрольных условиях более половины внутриклеточной меди находится в виде комплексов с GSH; при действии же избыточных концентраций меди уже в течение первых часов повышается доля комплексов меди с металлотионеинами и с Cu,Zn-супероксиддисмутазой, а с глутатионом – снижается [20, 21].

Как известно, для доставки меди к металлопротеинам существуют специальные белки – металлошапероны, которые переносят медь в форме

Cu(I) к молекулам медьсодержащих белков и за счет специфических межмолекулярных взаимодействий включают металл в их состав [22]. Однако маловероятно, что металлошапероны получают медь непосредственно от белков – транспортеров меди [23]; так, делеция или сверхэкспрессия генов металлошаперонов ATOX1 или CCS не влияли на скорость начального поступления меди в культуру клеток почки эмбриона НЕК293 [14]. В то же время при снижении содержания в клетках НЕК293 восстановленного глутатиона на 95% скорость поступления в них меди падала на 50%. Вероятно, поступающие в клетку ионы меди первоначально связываются именно с молекулами GSH, так как концентрация глутатиона в клетке превышает содержание в ней молекул транспортеров и металлошаперонов на несколько порядков [14]. Из состава комплексов с GSH медь может легко переходить к сравнительно немногочисленным молекулам металлошаперонов; аффинность металлошаперонов к Cu(I) существенно выше, чем у GSH, и в результате *in vivo* GSH и металлошапероны обладают сопоставимой способностью связывать медь [18]. В клетках *Saccharomyces cerevisiae* комплексы меди с глутатионом являются основным источником меди для шаперона Atx1; вероятно, *in vivo* данный шаперон существует в виде димера, включающего две молекулы белка Atx1, два иона Cu(I) и две молекулы GSH [16].

В некоторых случаях глутатион может непосредственно участвовать в доставке меди к медьсодержащим белкам. Так, у большинства исследованных организмов медь может встраиваться в состав апофермента супероксиддисмутазы без участия шаперона CCS, а у нематоды *Caenorhabditis elegans* данный шаперон отсутствует [24]. Для осуществления процесса CCS-независимой активации Cu,Zn-СОД необходим глутатион [25, 26]. Активность СОД из эритроцитов *Bos taurus* на 100% восстанавливалась *in vitro* комплексом Cu(I)-GSH, причем в процессе восстановления обнаруживалось прямое взаимодействие комплекса с активным сайтом фермента [27]. С другой стороны, на мутантах *Arabidopsis thaliana*, не вырабатывавших CCS, показано, что *in vitro* комплекс меди с GSH способен восстанавливать активность СОД более эффективно, чем CuSO₄, только в том случае, если одновременно в реакцию вносился экстракт из растений-мутантов по гену CCS [28], т.е. процесс внедрения меди из комплекса Cu(I)-GSH в состав апоСОД *A. thaliana* резко усиливался за счет некоторого неидентифицированного фактора.

Одно из важнейших свойств комплекса меди с GSH состоит в том, что медь в нем стабилизирована в виде Cu(I), а окислительно-восстановительные переходы Cu(I) ↔ Cu(II) невозможны до тех пор, пока ион Cu(I) связан с молекулой GSH. В системах *in vitro* показано, что при наличии определенного избытка GSH над Cu(II) медь восстанавливается глутатионом до Cu(I) и связывается с молекулами GSH, в результате чего участие ионов Cu(I) в реакции Фентона становится невозможным и образования в растворе гидроксильных радикалов не происходит [29–32]. Способность к генерации

гидроксильных радикалов возвращается к ионам меди только после того, как они высвобождаются в раствор в результате полного окисления SH-содержащих лигандов [33, 34], но в условиях *in vivo* подобная ситуация вряд ли будет иметь место, так как концентрация тиолов в клетках на порядки превышает содержание в них меди [31].

В ряде работ обнаружено, что комплексы меди с GSH, хотя и не способны генерировать гидроксильные радикалы, но активно образуют супероксид-радикал, из чего был сделан вывод, что медь в составе комплекса с глутатионом сохраняет редокс-активность [35–37]. Однако в других работах показано, что источником генерации супероксида служат тиоловые радикалы RS \cdot , образующиеся в ходе окисления комплексов тиолов с медью; медь же в ходе реакции окисления остается в виде Cu(I) до тех пор, пока связана с тиолами [31, 33]. Таким образом, хотя комплексы Cu(I) с тиолами и могут генерировать супероксид, но медь в данных процессах непосредственно не участвует и степень окисления металла при этом не меняется. Играет ли комплекс Cu-GSH значительную роль в генерации супероксид-радикала *in vivo*, неизвестно; при этом, однако, нужно отметить, что супероксид-радикал намного менее реакционноспособен, чем гидроксильный радикал, и в клетке есть множество систем его инактивации [4].

Роль металлотионеинов в формировании лабильного пула ионов меди

Металлотионеины (MT) – это небольшие (массой 6–7 кДа) цистеин-богатые белки, способные связывать различные d10-металлы [38, 39], в том числе Cu(I). Количество MT в норме в среднем составляет около 0,5% от содержания GSH в клетке, однако в условиях действия избытка металлов оно способно существенно возрастать [40]. За счет наличия множественных остатков цистеина MT способны связывать d10-металлы с очень высокой аффинностью – так, константы стабильности для комплексов Zn-MT составляют 10^{11} – 10^{14} , Cd-MT – 10^{15} – 10^{17} , Cu(I)-MT – 10^{17} – 10^{19} [41]. Ионы металлов, в том числе Cu(I), связываются металлотионеинами кооперативно с образованием Cu-S-кластеров; Cu-S-кластеры окружаются участками полипептидной цепи и гидрофобными атомами серы таким образом, что кластер становится малодоступным для взаимодействий с молекулами растворителя [42–44], хотя иногда отмечается и обратное [45].

Несмотря на наличие в молекуле MT металлсвязывающего кластера, где ионы Cu(I) связываются с очень высокой аффинностью и недоступны для молекул растворителя, было обнаружено, что очень сильные хелаторы Cu(I) могут удалять часть меди из состава MT. Так, в MT *Oryctolagus cuniculus* 20–30% Cu(I) со временем переходило в состав комплекса с батocupроином дисульфоновой кислоты (BCS) [46]; в составе MT *S. cerevisiae* 2 иона меди из 8 сразу же были доступны для связывания BCS, а при длительной инкубации практически вся медь из состава MT переходила в комплекс с BCS [47];

в Cu,Zn-содержащем МТ печени *B. taurus* только 1 ион Cu(I) был полностью недоступен для связывания BCS [48]. Доступность связанной с МТ меди для хелатирования может объясняться двумя причинами. Во-первых, не все ионы Cu(I) в молекуле МТ связываются одинаково. Так, в составе металлсвязывающего кластера МТ *S. cerevisiae* 2 иона Cu(I) из 8 связываются с двумя SH-группами цистеиновых остатков в то время как остальные – с тремя; по-видимому, именно эти 2 иона доступны для взаимодействий с молекулами растворителя [49] и способны немедленно связываться с BCS [47]. В разных видах МТ от 10 до 50% меди может быть связано с 2 остатками цистеина [50]; возможно, эти ионы в составе МТ более доступны для обменных реакций, чем ионы, связанные с тремя SH-группами. Во-вторых, несмотря на высокую термодинамическую стабильность Cu-S-комплексов в составе МТ, металлсодержащие кластеры в МТ являются гибкими, динамическими структурами, в пределах которых происходит постоянный разрыв и образование связей между ионами металлов и тиоловыми группами [39, 51]. В результате связанные МТ ионы металлов проявляют высокую кинетическую лабильность, постоянно перемещаются в пределах металлсвязывающего кластера и способны при наличии соответствующего термодинамического градиента легко переходить между МТ и другими металлсвязывающими лигандами [39].

Как уже говорилось выше, связывание меди SH-группами в составе комплексов с глутатионом предотвращает окислительно-восстановительные переходы меди, стабилизируя ее в виде Cu(I). Так как связывание меди в молекулах МТ также происходит за счет SH-групп остатков цистеина, то следует ожидать, что медь в виде комплексов с МТ редокс-неактивна. Действительно, в ряде работ было показано, что *in vitro* Cu-МТ способны вызывать окислительное повреждение ДНК и перекисное окисление липидов (ПОЛ) лишь в том случае, если Cu(I) из их состава высвобождается во внешнюю среду в виде иона. Это может происходить за счет окисления SH-групп остатков цистеина перекисью водорода или избытком 2-валентной меди [52–54], а также окисления и / или нитрозилирования SH-групп под действием оксида азота NO [46, 57]. Однако окисление SH-групп в составе МТ обратимо и может восстанавливаться меркаптоэтанолом, дитиотреитолом, дигидролипоевой кислотой и одним из основных клеточных восстановителей – GSH [54–56, 57], причем восстановленные остатки цистеинов снова способны связывать Cu(I) [57]. Так как среда в цитозоле в общем случае является восстановленной [19] и содержит глутатион в высоких концентрациях, то в условиях *in vivo*, скорее всего, медь в составе Cu-МТ редокс-неактивна, как и в комплексе с GSH.

Сочетание высокой термодинамической стабильности и низкой кинетической стабильности связывания Cu(I) металлотионеинами, а также редокс-неактивность меди в их составе позволяют предположить, что МТ, как и GSH, являются важными компонентами поддержания лабильного пула меди

в клетке и напрямую участвуют не только в детоксификации избытка данного металла, но и в процессах его транспорта и перераспределения в клетке, а также в передаче специфическим медьсвязывающим белкам. В виде комплексов с МТ может находиться значительная, а при некоторых условиях большая часть общей меди в клетке [20, 21, 48]. МТ способны *in vivo* принимать Cu(I) от молекул GSH, вероятно, за счет образования производного GS-Cu-MT [20]. Также *in vivo* может происходить и обратный процесс, т.е. переход Cu(I) от молекул МТ к GSH [58]. *In vitro* показано, что МТ могут осуществлять прямой (т.е. без высвобождения ионов меди в раствор) перенос меди к стеллацианину [57], лакказе [59] и СОД [46]. Возможно, МТ могут служить донорами меди для металлошаперонов [44], однако пока напрямую это не показано. Предполагается, что МТ являются своего рода «резервуаром», в котором постоянно находится определенная часть содержащейся в клетке меди; МТ могут служить источником меди для медьсодержащих белков, а при повышении содержания металла в клетке МТ депонируют избыточные его количества [44].

С другой стороны, есть свидетельства того, что в реальных концентрациях *in vivo* металлошапероны и GSH не могут конкурировать за связывание меди с МТ, а медьсвязывающие сайты цитохром-с-оксидазы и Cu,Zn-СОД кинетически недоступны для обмена металлом с МТ [18]. В таком случае МТ являются своего рода «ловушкой» для ионов Cu(I), и находящаяся в них медь *in vivo* является недоступной. Однако против такого предположения говорит тот факт, что в клетке значительная часть МТ находится в деметаллизированном виде в форме апоМТ [56].

Другие возможные лиганды лабильной меди

По-видимому, медь в составе лабильного пула связывается и с другими лигандами, кроме GSH и металлотионеинов. Так, 85% меди в митохондриях дрожжей и 70% меди в митохондриях печени *Mus musculus* находится в виде комплекса иона Cu(I) с низкомолекулярным анионным лигандом CuL неизвестной химической природы, который служит источником Cu(I) для митохондриальных белков цитохром с-оксидазы и Cu,Zn-СОД1 [60, 61]. Данный лиганд имеет очень высокую аффинность связывания Cu(I) (K_d порядка 10^{-19}), однако при этом медь в составе комплекса CuL остается кинетически лабильной и может включаться в состав митохондриальных ферментов [61]. Данный лиганд обнаруживается не только в митохондриях, но и в цитоплазме, однако там он находится в основном в свободном от меди состоянии; предполагается, что связывание иона Cu(I) запускает перенос комплекса CuL из цитоплазмы в матрикс митохондрий [61]. По-видимому, пул меди в митохондриях не связан с GSH, так как мутанты *S. cerevisiae*, не способные синтезировать глутатион, не отличались от клеток дикого типа по содержанию меди в митохондриях [60]; кроме того, аффинность CuL к меди превосходит таковую для глутатиона [18, 61].

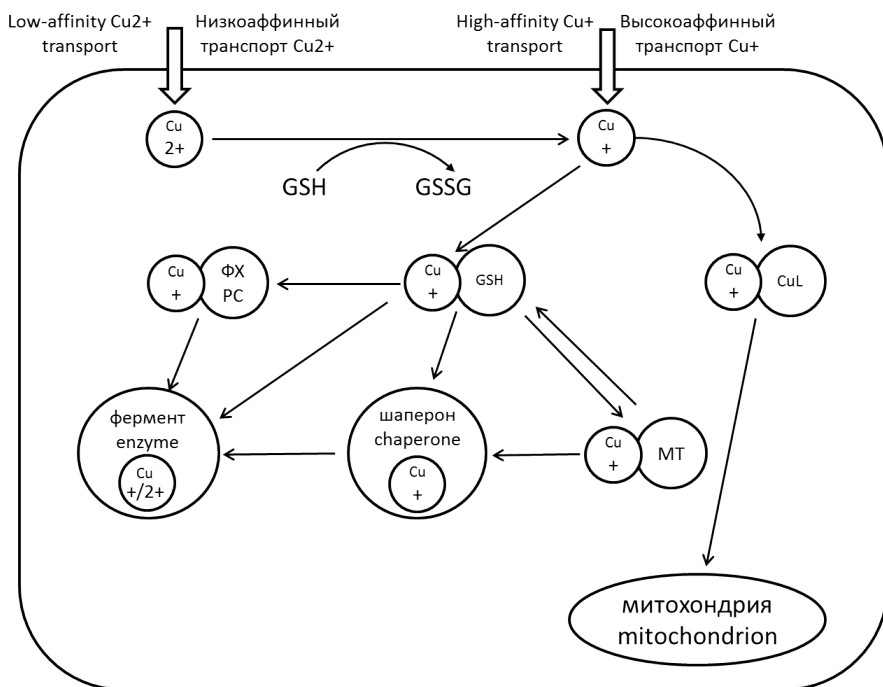


Рис. 1. Возможная схема образования пула лабильной меди в эукариотической клетке

[Fig. 1. Possible scheme of labile copper pool formation in the eukaryotic cell]

В ряде организмов, например в растениях, водорослях, некоторых грибах и нематод *C. elegans*, обнаружены небольшие металлсвязывающие пептиды, называемые фитохелатинами (ФХ). Фитохелатины имеют общую структуру $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$) и синтезируются из GSH с помощью фермента фитохелатинсинтазы. В клетках дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* фитохелатины образуют комплексы из нескольких молекул ФХ и нескольких ионов Cu(I) массой около 3 кДа [62, 63]; точная стехиометрия комплексов неизвестна, однако в состав 1 комплекса, по-видимому, входят менее 4 пептидов [62] и 4–6 ионов Cu(I) [50]. Как и в металлотионеинах, в ФХ медь находится в составе полиметаллического металл-тиолатного кластера [50] и защищена от взаимодействия с молекулами растворителя [62, 64]; в то же время комплексы меди с ФХ более чувствительны к окислению кислородом, чем Cu-MT [63]. Значительная часть меди в составе ФХ, как и в MT, доступна к хелатированию BCS [62], а значит, кинетически лабильна. На данный момент известно, что ФХ играют значительную роль в формировании устойчивости клеток к кадмию. Роль ФХ в гомеостазе меди изучена значительно хуже, чем для MT; тем не менее ФХ также могут принимать участие в гомеостазе ионов меди, особенно у организмов, которые не вырабатывают

МТ (например, *S. pombe*). Обнаружено, что *in vitro* комплексы меди и цинка с ФХ могут восстанавливать активность апоформ диаминооксидазы и угольной ангидразы соответственно [65].

Таким образом, на сегодняшний день для ряда биомолекул предполагается потенциальная роль в формировании лабильного пула меди в клетках. В общем виде предполагаемая роль различных лигандов лабильной меди в эукариотической клетке представлена на рис. 1.

Весьма вероятно, что у некоторых организмов основными лигандами, участвующими в образовании лабильного пула меди, являются соединения, не упомянутые выше. Так, в клетках фибробластов *M. musculus* основная часть кинетически лабильной меди находится в виде Cu(I) и связана с серосодержащими соединениями, которые, однако, не являются ни GSH, ни металлотионеинами [66]. Комплексы меди с глутатионом, по-видимому, не являются основой лабильного пула меди в цитозоле *Escherichia coli* [7]. Ингибиторы синтеза глутатиона оказывают неожиданно слабое влияние на гомеостаз ионов меди в клетках *Saccharomyces cerevisiae* [67].

Заключение

Значительная часть ионов меди в клетке находится в виде кинетически лабильных, подвижных комплексов, которые необходимы для доставки меди к специфическим металлопротеинам. Лабильная медь в клетке находится в одновалентной форме, стабилизированной за счет связывания с сульфгидрильными группами, что делает ее редокс-неактивной и предотвращает участие ионов меди в реакции Фентона. Основными лигандами лабильной меди, по-видимому, являются глутатион и металлотионеины. Комплексы Cu(I) с данными соединениями сочетают высокую термодинамическую стабильность с кинетической лабильностью и вследствие этого могут служить источниками ионов меди для целого ряда медьсодержащих ферментов *in vitro*. Тем не менее действительную природу основных медьсвязывающих соединений в клетке еще предстоит установить.

Литература

1. Prütz W.A. Interaction between glutathione and Cu(II) in the vicinity of nucleic acids // Biochem. J. 1994. Vol. 302. P. 373–382.
2. Tottey S., Waldron K.J., Firbank S.J., Reale B., Bessant C., Katsuko S., Cheek T.R., Gray J., Banfield M.J., Dennison C., Robinson N.J. Protein-folding location can regulate manganese binding versus copper- or zinc-binding // Nature. 2008. Vol. 455. P. 1138–1142.
3. Xiao Z., Brose J., Schimo S., Ackland S.M., La Fontaine S., Wedd A.G. Unification of the copper(I) binding affinities of the metallochaperones Atx1, Atox1, and related proteins: Detection probes and affinity standards // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 13. P. 11047–11055.
4. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification // Toxicol. Pathol. 2002. Vol. 30, № 6. P. 620–650.

5. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress // *Curr. Med. Chem.* 2005. Vol. 12, № 10. P. 1161–1208.
6. Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase // *Science*. 1999. Vol. 284, № 5415. P. 805–808.
7. Changela A., Chen K., Xue Y., Holschen J., Outten C.E., O'Halloran T.V., Mondragon A. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR // *Science*. 2003. Vol. 301, № 5638. P. 1383–1387.
8. Samuni A., Chevion M., Czapski G. Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256, № 24. P. 12632–12635.
9. Chevion M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals // *Free Radical Bio. Med.* 1988. Vol. 5, № 1. P. 27–37.
10. Yamamoto K., Kawanishi S. Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper(II) ion and hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 26. P. 15435–15440.
11. Sayre L.W., Perry G., Harris P.L.R., Liu Y., Schubert K.A., Smith M.A. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals // *J. Neurochem.* 2001. Vol. 74, № 1. P. 270–297.
12. Rubino J.T., Franz K.J. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function // *J. Inorg. Biochem.* 2012. Vol. 107, № 1. P. 129–143.
13. Waldron K.J., Robinson N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. Vol. 7. P. 25–35.
14. Maryon E.B., Molloy S.A., Kaplan J.H. Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1 // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013. Vol. 304, № 8. P. 768–779.
15. Dodani S.C., Firl A., Chan J., Nam C.I., Aron A.T., Onak C.S., Ramos-Torres K.M., Paek J., Webster C.M., Feller M.B., Chang C.J. Copper is an endogenous modulator of neural circuit spontaneous activity // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. Vol. 111, № 46. P. 16280–16285.
16. Miras R., Morin I., Jacquin O., Cuillel M., Guillain F., Mintz E. Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1 // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008. Vol. 13, № 13. P. 195–205.
17. Poger D., Fillaux C., Miras R., Crouzy S., Delange P., Mintz E., Auwer C.D., Ferrand M. Interplay between glutathione, Atx1 and copper: X-ray absorption spectroscopy determination of Cu(I) environment in an Atx1 dimer // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008. Vol. 13, № 8. P. 1239–1248.
18. Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Kozyreva T., Zovo K., Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations // *Nature*. 2010. Vol. 465. P. 645–648.
19. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // *Chem.-Biol. Interact.* 2006. Vol. 160, № 1. P. 1–40.
20. Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 10. P. 5598–5605.
21. Ferruzza S., Sambuy Y., Ciriolo M.R., De Martino A., Santaroni P., Potilio G., Scarino M.-L. Copper uptake and intracellular distribution in the human intestinal Caco-2 cell line // *Biomaterials*. 2000. Vol. 2000, № 13. P. 179–185.
22. Huffman D.L., O'Halloran T.V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. Vol. 70. P. 677–701.
23. Portnoy M., Schmidt P., Rogers R., Culotta V. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Genet. Genomics*. 2001. Vol. 265, № 5. P. 873–882.

24. Leitch J.M., Jensen L.T., Bouldin S.D., Outten C.E., Hart P.J., Culotta V.C. Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. P. 21863–21871.
25. Carroll M.C., Girouard J.B., Ulloa J.L., Subramaniam J.R., Wong P.C., Valentine J.S., Culotta V.C. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone // *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, № 21. P. 5964–5969.
26. Jensen L.T., Culotta V.C. Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 50. P. 41373–41379.
27. Ciriolo M.R., Desideri A., Paci M., Rotilio G. Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, № 19. P. 11030–11034.
28. Huang C.-S., Kuo W.-Y., Weiss C., Jinn T.-L. Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2012. Vol. 158. P. 737–746.
29. Hanna P.M., Mason R.P. Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. Vol. 295, № 1. P. 205–213.
30. Milne L., Nicotera P., Orrenius S., Burkitt M.J. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. Vol. 304, № 1. P. 102–109.
31. Spear N., Aust S.D. Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 317, № 1. P. 142–148.
32. Kachur A.V., Koch C.J., Blaglow J.E. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione // *Free Rad. Res.* 1998. Vol. 28, № 3. P. 259–269.
33. Pecci L., Montefoschi G., Musci G., Cavallini D. Novel findings on the copper catalysed oxidation of cysteine // *Amino Acids.* 1997. Vol. 13, № 3–4. P. 355–367.
34. Rigo A., Corazza A., di Paolo M.L., Rossetto M., Ugolini R., Scarpa M. Interaction of copper with cysteine: Stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation // *J. Inorg. Biochem.* 2004. Vol. 98, № 9. P. 1495–1501.
35. Carrasco-Pozo C., Aliaga M.E., Olea-Azar C., Speisky H. Double edge redox-implications for the interaction between endogenous thiols and copper ions: In vitro studies // *Bioorgan. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, № 22. P. 9795–9803.
36. Speisky H., Gomez M., Carrasco-Pozo C., Pastene E., Lopez-Alarcon C., Olea-Azar C. Cu(I)-glutathione complex: A potential source of superoxide radicals generation // *Bioorgan. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, № 13. P. 6568–6574.
37. Speisky H., Gomez M., Burgos-Bravo F., Lopez-Alarcon C., Jullian C., Olea-Azar C., Aliaga M.E. Generation of superoxide radicals by copper–glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione // *Bioorgan. Med. Chem.* 2009. Vol. 17, № 5. P. 1803–1810.
38. Pountney D.L., Schauwecker I., Zarn J., Vasak M. Formation of mammalian Cu8-metallothionein in vitro: Evidence for the existence of two Cu(I)4-thiolate clusters // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33, № 32. P. 9699–9705.
39. Romero-Isart N., Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins // *J. Inorg. Biochem.* 2002. Vol. 88, № 3–4. P. 388–396.
40. Deters D., Hartmann H.-J., Weser U. Transient thiyl radicals in yeast copper(I) thionein // *BBA-Struct. M.* 1994. Vol. 1208, № 2. P. 344–347.
41. Hamer D.H. Metallothionein 1,2 // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 913–951.
42. Beltramini M., Munger K., Germann U.A., Lerch K. Luminescence emission from the Cu(I)-thiolate complex in metallothioneins // *Metallothionein II. Proceedings of the «Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins»* / Eds Kagi J.H.R., Kojima Y. Zurich, 1987. P. 237–241.

43. Byrd J., Berger R.M., McMilling D.R., Wright C.F., Hamer D., Winge D.R. Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263, № 14. P. 6688–6694.
44. Calderone V., Dolderer B., Hartmann H.-J., Echner H., Luchinat C., Del Blanco C., Mangani S., Weser U. The crystal structure of yeast copper thionein: The solution of a long-lasting enigma // *PNAS.* 2005. Vol. 102, № 1. P. 51–56.
45. Vaher M., Romero-Isart N., Vasak M., Palumaa P. Reactivity of Cd7-metalllothionein with Cu(II) ions: evidence for a cooperative formation of Cd3,Cu(I)5-metalllothionein // *J. Inorg. Biochem.* 2001. Vol. 83, № 1. P. 1–6.
46. Liu S.X., Fabisiak J.P., Tyurin V.A., Borisenko G.G., Pitt B.R., Lazo J.S., Kagan V.E. Reconstitution of apo-superoxide dismutase by nitric oxide-induced copper transfer from metallothioneins // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. Vol. 13, № 9. P. 922–931.
47. Weser U., Hartmann H.-J. Differently bound copper(I) in yeast Cu8-thionein // *BBA-Struct. M.* 1988. Vol. 953. P. 1–5.
48. Chen P., Onana P., Shaw C.F., Petering D.H. Characterization of calf liver Cu,Zn-metalllothionein: Naturally variable Cu and Zn stoichiometries // *Biochem. J.* 1996. Vol. 317. P. 389–394.
49. Hartmann H.-J., Li Y.-J., Weser U. Analogous copper(I) coordination in metallothionein from yeast and the separate domains of the mammalian protein // *Biomaterials.* 1992. Vol. 5, № 3. P. 187–191.
50. Pickering I.J., George G.N., Dameron C.T., Kurz B., Winge D.R., Dance I.G. X-ray absorption spectroscopy of cuprous-thiolate clusters in proteins and model systems // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. Vol. 115, № 21. P. 9498–9505.
51. Vasak M. Dynamic metal-thiolate cluster structure of metallothioneins // *Environ. Health Perspect.* 1986. Vol. 65. P. 193–197.
52. Stephenson G.F., Chan H.M., Cherian M.G. Copper-metalllothionein from the toxic milk mutant mouse enhances lipid peroxidation initiated by an organic hydroperoxide // *Toxicol. Appl. Pharm.* 1994. Vol. 125, № 1. P. 90–96.
53. Oikawa S., Kurasaki M., Kojima Y., Kawanishi S. Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 27. P. 8763–8770.
54. Fabisiak J.P., Pearce L.L., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Razzack J., Lazo J.S., Pitt B.R., Kagan V.E. Bifunctional anti-/prooxidant potential of metallothionein: redox signaling of copper binding and release // *Antioxid. Redox Sign.* 2008. Vol. 1, № 3. P. 349–364.
55. Suzuki K.T., Maitani T. Metal-dependent properties of metallothionein. Replacement in vitro of zinc in zinc-thionein with copper // *Biochem. J.* 1981. Vol. 199. P. 289–295.
56. Carpena E., Andreani G., Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics // *J. Trace Elem. Med. Bio.* 2007. Vol. 21, S1. P. 35–39.
57. Hartmann H.-J., Mörpurgo L., Desideri A., Rotilio G., Weser U. Reconstitution of stellacyanin as a case of direct Cu(I) transfer between yeast copper thionein and ‘blue’ copper apoprotein // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 152, № 1. P. 94–96.
58. Freedman J.H., Peisach J. Intracellular copper transport in cultured hepatoma cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. Vol. 164, № 1. P. 134–140.
59. Mörpurgo L., Hartmann H.J., Desideri A., Weser U., Rotilio G. Yeast copper-thionein can reconstitute the Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase from the Type 2-copper-depleted enzyme via a direct copper(I)-transfer mechanism // *Biochem. J.* 1983. Vol. 211. P. 515–517.
60. Cobine P.A., Ojeda L.D., Rigby K.M., Winge D.R. Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 14. P. 14447–14455.
61. Cobine P.A., Pierrel F., Bestwick M.L., Winge D.R. Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 48. P. 36552–36559.

62. Mehra R.K., Winge D.R. Cu(I) binding to the Schizosaccharomyces pombe γ -glutamyl peptides varying in chain lengths // Arch. Biochem. Biophys. 1988. Vol. 265, № 2. P. 381–389.
63. Reese R.N., Mehra R.K., Tarbet E.B., Winge D.R. Studies on the γ -glutamyl Cu-binding peptide from Schizosaccharomyces pombe // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263, № 9. P. 4186–4192.
64. Winge D.R. Copper coordination in metallothionein // Method. Enzymol. 1991. Vol. 205. P. 458–469.
65. Thumann J., Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes // FEBS Lett. 1991. Vol. 284, № 1. P. 66–69.
66. Yang L., McRae R., Henary M.M., Patel R., Lai B., Vogt S., Fahrni C. Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy // PNAS USA. 2005. Vol. 102, № 32. P. 11179–11184.
67. Bi W.X., Kong F., Hu X.Y., Cui X. Role of glutathione in detoxification of copper and cadmium by yeast cells having different abilities to express Cup1 protein // Toxicol. Mech. Method. 2007. Vol. 17, № 6. P. 371–378.

Поступила в редакцию 30.04.2015 г.; повторно 10.07.2015 г.; принята 15.07.2015 г.

Злобин Илья Евгеньевич – аспирант, м.н.с. лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева (г. Москва, Россия).

E-mail: ilya.zlobin.90@mail.ru

Zlobin I.E. Labile copper pool as the essential component of copper homeostasis system. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2015;3(31):67-83. doi: 10.17223/19988591/31/6. In Russian, English summary

Илья Е. Злобин

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Labile copper pool as the essential component of copper homeostasis system

Free copper ions do not exist in the cell, and cellular copper distribution relies on the bulk of copper complexes with different low-molecular ligands, which together constitute the kinetically labile cellular copper pool. The main copper ligands within this pool are probably reduced glutathione and metallothioneins, and some other compounds. The aim of this work is to characterise the main groups of labile copper-binding ligands in the cell, with special focus on the kinetical lability of copper ions in such complexes and their capability to generate reactive oxygen species.

Reduced glutathione (GSH) is probably the main labile copper ligand in the cell, because it is found in millimolar concentrations inside the cell and has picomolar binding affinities for Cu(I) ions. Reduction of GSH content is accompanied by a significant decrease in copper uptake by the cell. The Cu(I)-GSH complex is probably involved in copper transfer from transport proteins, such as Ctr1, to copper chaperones, like Atx1. In several cases Cu-GSH was shown to be directly involved in copper donation *in vivo* to copper-containing proteins, such as Cu/Zn-SOD. Copper binding to GSH leads to its stabilization in Cu(I) oxidation state, which precludes copper participation in generation of hydroxyl radicals during Fenton-like reactions. Cu-GSH complex is probably able to generate superoxide anions, but this process occurs as a result of cysteine oxidation, with copper remaining in the Cu(I) state.

Significant part of labile copper ligands may be implemented by metallothioneins - small cysteine-rich proteins, which bind ions of different d10-metals, including Cu(I), with the formation of polynuclear Cu-S clusters. Despite Cu(I) ions are bound to cysteine residues with high affinity, a significant part of them retains the kinetic lability and is able to transfer from metallothioneins to other ligands. Metallothioneins are capable to receive copper from Cu-GSH complex *in vivo*, and to deliver copper ions *in vitro* to different proteins, such as Cu,Zn-SOD, laccase and stellacyanin. Metallothioneins are likely to be involved in copper distribution in the cell and sequestration of excessive copper ions. Copper in Cu-MT is bound in Cu(I) oxidation state and is redox-inactive, thus it is incapable of generating highly active reactive oxygen species.

There are some other possible constituents of the labile copper pool in the cell. A significant part of mitochondrial copper is bound with anionic copper ligand named CuL, which chemical nature is unknown. This ligand is probably involved in copper transport from cytosol to copper-containing proteins in mitochondria. Phytochelatins may play a role similar to that of metallothioneins in copper homeostasis. Phytochelatins are small peptides produced from glutathione, which bind copper ions within Cu-S clusters. Phytochelatins were able to donate bound copper ions to diamine oxidase *in vitro*. There can be also other ligands of labile copper in the cell, whose chemical nature is still to be identified.

The article contains 1 Figure, 67 References.

Key words: copper; labile pool; reactive oxygen species; metallothioneins; glutathione.

References

1. Prütz WA. Interaction between glutathione and Cu(II) in the vicinity of nucleic acids. *Biochem. J.* 1994;302:373-382.
2. Tottey S, Waldron KJ, Firbank SJ, Reale B, Bessant C, Katsuko S, Cheek TR, Gray J, Banfield MJ, Dennison C, Robinson NJ. Protein-folding location can regulate manganese binding versus copper- or zinc-binding. *Nature.* 2008;455:1138-1142. doi: [10.1038/nature07340](https://doi.org/10.1038/nature07340)
3. Xiao Z, Brose J, Schimo S, Ackland SM, La Fontaine S, Wedd AG. Unification of the copper(I) binding affinities of the metallochaperones Atx1, Atox1, and related proteins: Detection probes and affinity standards. *J. Biol. Chem.* 2011;286(13):11047-11055. doi: [10.1074/jbc.M110.213074](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213074)
4. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002;30(6):620-650.
5. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005;12(10):1161-1208. doi: [10.2174/0929867053764635](https://doi.org/10.2174/0929867053764635)
6. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 1999;284(5415):805-808. doi: [10.1126/science.284.5415.805](https://doi.org/10.1126/science.284.5415.805)
7. Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, O'Halloran TV, Mondragon A. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science.* 2003;301(5638):1383-1387. doi: [10.1126/science.1085950](https://doi.org/10.1126/science.1085950)
8. Samuni A, Chevion M, Czapski G. Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* 1981;256(24):12632-12635.
9. Chevion M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Biol. Med.* 1988;5(1):27-37. doi: [10.1016/0891-5849\(88\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90059-7)
10. Yamamoto K, Kawanishi S. Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper(II) ion and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1989;264(26):15435-15440.

11. Sayre LW, Perry G, Harris PLR, Liu Y, Schubert KA, Smith MA. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* 2001;74(1):270-297. doi: [10.1046/j.1471-4159.2000.0740270.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740270.x)
12. Rubino JT, Franz KJ. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.* 2012;107(1):129-143. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024)
13. Waldron KJ, Robinson NJ. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 2009;7:25-35. doi: [10.1038/nrmicro2057](https://doi.org/10.1038/nrmicro2057)
14. Maryon EB, Molloy SA, Kaplan JH. Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013;304(8):768-779. doi: [10.1152/ajpcell.00417.2012](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00417.2012)
15. Dodani SC, Firl A., Chan J., Nam C.I., Aron AT, Onak CS, Ramos-Torres KM, Paek J, Webster CM, Feller MB, Chang CJ. Copper is an endogenous modulator of neural circuit spontaneous activity. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(46):16280-16285. doi: [10.1073/pnas.1409796111](https://doi.org/10.1073/pnas.1409796111)
16. Miras R, Morin I, Jacquin O, Cuillel M, Guillain F, Mintz E. Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008;13(13):195-205. doi: [10.1007/s00775-007-0310-2](https://doi.org/10.1007/s00775-007-0310-2)
17. Poger D, Fillaux C, Miras R, Crouzy S, Delange P, Mintz E, Auwer CD, Ferrand M. Interplay between glutathione, Atx1 and copper: X-ray absorption spectroscopy determination of Cu(I) environment in an Atx1 dimer. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008;13(8):1239-1248. doi: [10.1007/s00775-008-0408-1](https://doi.org/10.1007/s00775-008-0408-1)
18. Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Kozyreva T, Zovo K, Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature.* 2010;465:645-648. doi: [10.1038/nature09018](https://doi.org/10.1038/nature09018)
19. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interact.* 2006;160(1):1-40. doi: [10.1016/j.cbi.2005.12.009](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009)
20. Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 1989;264(10):5598-5605.
21. Ferruzza S, Sambuy Y, Ciriolo MR, De Martino A, Santaroni P, Potilio G, Scarino M-L. Copper uptake and intracellular distribution in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biomaterials.* 2000;2000(13):179-185. doi: [10.1023/A:1009271622356](https://doi.org/10.1023/A:1009271622356)
22. Huffman DL, O'Halloran TV. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 2001;70:677-701. doi: [10.1146/annurev.biochem.70.1.677](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.677)
23. Portnoy M, Schmidt P, Rogers R, Culotta V. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 2001;265(5):873-882. doi: [10.1007/s004380100482](https://doi.org/10.1007/s004380100482)
24. Leitch JM, Jensen LT, Bouldin SD, Outten CE, Hart PJ, Culotta VC. Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J. Biol. Chem.* 2009;284:21863-21871. doi: [10.1074/jbc.M109.000489](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000489)
25. Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS, Culotta VC. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(21):5964-5969. doi: [10.1073/pnas.0308298101](https://doi.org/10.1073/pnas.0308298101)
26. Jensen LT, Culotta VC. Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J. Biol. Chem.* 2005;280(50):41373-41379. doi: [10.1074/jbc.M509142200](https://doi.org/10.1074/jbc.M509142200)
27. Ciriolo MR, Desideri A, Paci M, Rotilio G. Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex. *J. Biol. Chem.* 1990;265(19):11030-11034.

28. Huang C-S, Kuo W-Y, Weiss C, Jinn T-L. Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2012;158:737-746. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.190223>
29. Hanna PM, Mason RP. Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992;295(1):205-213. doi: [10.1016/0003-9861\(92\)90507-S](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90507-S)
30. Milne L, Nicotera P, Orrenius S, Burkitt MJ. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;304(1):102-109. doi: [10.1006/abbi.1993.1327](https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1327)
31. Spear N, Aust SD. Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995;317(1):142-148. doi: [10.1006/abbi.1995.1146](https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1146)
32. Kachur AV, Koch CJ, Blaglow JE. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Rad. Res.* 1998;28(3):259-269.
33. Pecci L, Montefoschi G, Musci G, Cavallini D. Novel findings on the copper catalysed oxidation of cysteine. *Amino Acids.* 1997;13(3-4):355-367. doi: [10.1007/BF01372599](https://doi.org/10.1007/BF01372599)
34. Rigo A, Corazza A, di Paolo ML, Rossetto M, Ugolini R, Scarpa M. Interaction of copper with cysteine: Stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation. *J. Inorg. Biochem.* 2004;98(9):1495-1501. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2004.06.008](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.06.008)
35. Carrasco-Pozo C, Aliaga ME, Olea-Azar C, Speisky H. Double edge redox-implications for the interaction between endogenous thiols and copper ions: In vitro studies. *Bioorgan. Med. Chem.* 2008;16(22):9795-9803. doi: [10.1016/j.bmc.2008.09.068](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.068)
36. Speisky H, Gomez M, Carrasco-Pozo C, Pastene E, Lopez-Alarcon C, Olea-Azar C. Cu(I)-glutathione complex: A potential source of superoxide radicals generation. *Bioorgan. Med. Chem.* 2008;16(13):6568-6574. doi: [10.1016/j.bmc.2008.05.026](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.05.026)
37. Speisky H, Gomez M, Burgos-Bravo F, Lopez-Alarcon C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorgan. Med. Chem.* 2009;17(5):1803-1810. doi: [10.1016/j.bmc.2009.01.069](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.069)
38. Pountney DL, Schauwecker I, Zarn J, Vasak M. Formation of mammalian Cu8-metallothionein in vitro: Evidence for the existence of two Cu(I)4-thiolate clusters. *Biochemistry.* 1994;33(32):9699-9705. doi: [10.1021/bi00198a040](https://doi.org/10.1021/bi00198a040)
39. Romero-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 2002;88(3-4):388-396. doi: [10.1016/S0162-0134\(01\)00347-6](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00347-6)
40. Deters D, Hartmann H-J, Weser U. Transient thiol radicals in yeast copper(I) thionein. *BBA-Struct. M.* 1994;1208(2):344-347. doi: [10.1016/0167-4838\(94\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90123-6)
41. Hamer DH. Metallothionein1,2. *Ann. Rev. Biochem.* 1986;55:913-951. doi: [10.1146/annurev.bi.55.070186.004405](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004405)
42. Beltramini M, Munger K, Germann UA, Lerch K. Luminescence emission from the Cu(I)-thiolate complex in metallothioneins. *Exp. Suppl.* 1987;52:237-241. doi: [10.1007/978-3-0348-6784-9_17](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6784-9_17)
43. Byrd J, Berger RM, McMilling DR, Wright CF, Hamer D, Winge DR. Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants. *J. Biol. Chem.* 1988;263(14):6688-6694.
44. Calderone V, Dolderer B, Hartmann H-J, Echner H, Luchinat C, Del Blanco C, Mangani S, Weser U. The crystal structure of yeast copper thionein: The solution of a long-lasting enigma. *PNAS.* 2005;102(1):51-56. doi: [10.1073/pnas.0408254101](https://doi.org/10.1073/pnas.0408254101)
45. Vaher M, Romero-Isart N, Vasak M, Palumaa P. Reactivity of Cd7-metallothionein with Cu(II) ions: evidence for a cooperative formation of Cd3,Cu(I)5-metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* 2001;83(1):1-6. doi: [10.1016/S0162-0134\(00\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00183-5)

46. Liu S-X, Fabisiak JP, Tyurin VA, Borisenko GG, Pitt BR, Lazo JS, Kagan VE. Reconstitution of apo-superoxide dismutase by nitric oxide-induced copper transfer from metallothioneins. *Chem. Res. Toxicol.* 2000;13(9): 922-931. doi: [10.1021/tx0000623](https://doi.org/10.1021/tx0000623)
47. Weser U, Hartmann H-J. Differently bound copper(I) in yeast Cu8-thionein. *BBA-Struct. M.* 1988;953:1-5. doi: [10.1016/0167-4838\(88\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90002-7)
48. Chen P, Onana P, Shaw CF, Petering DH. Characterization of calf liver Cu,Zn-metallothionein: Naturally variable Cu and Zn stoichiometries. *Biochem. J.* 1996;317:389-394.
49. Hartmann H-J, Li Y-J, Weser U. Analogous copper(I) coordination in metallothionein from yeast and the separate domains of the mammalian protein. *Biometals.* 1992;5(3):187-191. doi: [10.1007/BF01061327](https://doi.org/10.1007/BF01061327)
50. Pickering IJ, George GN, Dameron CT, Kurz B, Winge DR, Dance IG. X-ray absorption spectroscopy of cuprous-thiolate clusters in proteins and model systems. *J. Am. Chem. Soc.* 1993;115(21):9498-9505. doi: [10.1021/ja00074a014](https://doi.org/10.1021/ja00074a014)
51. Vasak M. Dynamic metal-thiolate cluster structure of metallothioneins. *Environ. Health Perspect.* 1986;65:193-197.
52. Stephenson GF, Chan HM, Cherian MG. Copper-metallothionein from the toxic milk mutant mouse enhances lipid peroxidation initiated by an organic hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1994;125(1):90-96. doi: [10.1006/taap.1994.1052](https://doi.org/10.1006/taap.1994.1052)
53. Oikawa S, Kurasaki M, Kojima Y, Kawanishi S. Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry.* 1995;34(27):8763-8770. doi: [10.1021/bi00027a027](https://doi.org/10.1021/bi00027a027)
54. Fabisiak JP, Pearce LL, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Razzack J, Lazo JS, Pitt BR, Kagan VE. Bifunctional anti/prooxidant potential of metallothionein: redox signaling of copper binding and release. *Antioxid. Redox Sign.* 2008;1(3):349-364. doi: [10.1089/ars.1999.1.3-349](https://doi.org/10.1089/ars.1999.1.3-349)
55. Suzuki KT, Maitani T. Metal-dependent properties of metallothionein. Replacement *in vitro* of zinc in zinc-thionein with copper. *Biochem. J.* 1981;199:289-295.
56. Carpena E, Andreani G, Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 2007;21(S1):35-39. doi: [10.1016/j.jtemb.2007.09.011](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.011)
57. Hartmann H-J, Morpurgo L, Desideri A, Rotilio G, Weser U. Reconstitution of stellacyanin as a case of direct Cu(I) transfer between yeast copper thionein and 'blue' copper apoprotein. *FEBS Lett.* 1983;152(1):94-96. doi: [10.1016/0014-5793\(83\)80489-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80489-X)
58. Freedman JH, Peisach J. Intracellular copper transport in cultured hepatoma cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 1989;164(1):134-140. doi: [10.1016/0006-291X\(89\)91693-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91693-8)
59. Morpurgo L, Hartmann HJ, Desideri A, Weser U, Rotilio G. Yeast copper-thionein can reconstitute the Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase from the Type 2-copper-depleted enzyme via a direct copper(I)-transfer mechanism. *Biochem. J.* 1983;211:515-517.
60. Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM, Winge DR. Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* 2004;279(14):14447-14455. doi: [10.1074/jbc.M312693200](https://doi.org/10.1074/jbc.M312693200)
61. Cobine PA, Pierrrel F, Bestwick ML, Winge DR. Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 2006;281(48):36552-36559. doi: [10.1074/jbc.M606839200](https://doi.org/10.1074/jbc.M606839200)
62. Mehra RK, Winge DR. Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* γ -glutamyl peptides varying in chain lengths. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988;265(2):381-389. doi: [10.1016/0003-9861\(88\)90141-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90141-5)
63. Reese RN, Mehra RK, Tarbet EB, Winge DR. Studies on the γ -glutamyl Cu-binding peptide from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 1988;263(9):4186-4192.
64. Winge DR. Copper coordination in metallothionein. *Method. Enzymol.* 1991;205:458-469.

65. Thumann J, Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett.* 1991;284(1):66-69. doi: [10.1016/0014-5793\(91\)80763-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80763-S)
66. Yang L, McRae R, Henary MM, Patel R, Lai B, Vogt S, Fahrni C. Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy. *PNAS USA.* 2005;102(32):11179-11184. doi: [10.1073/pnas.0406547102](https://doi.org/10.1073/pnas.0406547102)
67. Bi WX, Kong F, Hu XY, Cui X. Role of glutathione in detoxification of copper and cadmium by yeast cells having different abilities to express Cup1 protein. *Toxicol. Mech. Method.* 2007;17(6):371-378. doi: [10.1080/15376510601091392](https://doi.org/10.1080/15376510601091392)

Received 30 April 2015;

Revised 10 July 2015;

Accepted 15 July 2015

Authors info:

Zlobin Ilya E, Junior Researcher, Postgraduate Student, Laboratory of Physiological and Molecular Adaptation Mechanisms, Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

E-mail: ilya.zlobin.90@mail.ru