

УДК 577.121.7

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АНИОНОВ НА ЩЕЛОЧНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОХРОМА *c*

© 2021 Е. Седлак<sup>1,2</sup>, Т. Кожар<sup>2</sup>, Р. Вархач<sup>1</sup>, А. Мусатов<sup>3</sup>, Н. Томашкова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University,  
04154 Košice, Slovakia; e-mail: natasa.tomaskova@upjs.sk

<sup>2</sup> Centre for Interdisciplinary Biosciences, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia

<sup>3</sup> Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, 04001 Košice, Slovakia

Поступила в редакцию 28.08.2020

После доработки 10.11.2020

Принята к публикации 10.11.2020

Изучено специфическое влияние анионов на структуру и термостабильность, а также на пероксидазную активность нативного (состояние III) и щелочного (состояние IV) цитохрома *c* (сyt *c*) с помощью методов УФ-абсорбционной спектроскопии, собственной флуоресценции триптофана и кругового дихроизма. Термическая и изотермическая денатурация, контролируемая, соответственно, по флуоресценции триптофана и методом кругового дихроизма, предполагают более низкую стабильность сyt *c* в состоянии IV по сравнению с состоянием III. Значения  $pK_a$  щелочной изомеризации сyt *c* зависят от присутствующих солей, в соответствии с эффектом Хофмейстера на стабильность белка, т.е. космотропные анионы увеличивают, а хаотропные анионы уменьшают его значение. Пероксидазная активность сyt *c* в состоянии III, измеренная путём окисления гваякола, показывает четкую зависимость от положения солей в ряду Хофмейстера, в то время как сyt *c* в щелочном состоянии не проявляет пероксидазной активности независимо от типа анионов, присутствующих в растворе. Щелочная изомеризация сyt *c* в присутствии 8 М мочевины, измеренная по флуоресценции Trp59, предполагает существование высокоаффинного не природного для гемового железа лиганда даже при частично денатурированной конформации белка. Конформация сyt *c* в щелочном состоянии в 8 М мочевины заметно модулируется специфическим эффектом анионов. Основываясь на снижении флуоресценции Trp59 при титровании до щелочного значения pH в 8 М мочевины и используя метод молекулярной динамики, мы предполагаем, что Lys79-конформер является, скорее всего, доминирующим щелочным конформером сyt *c*. Высокое сродство шестого лиганда к гемовому железу, вероятно, является причиной отсутствия пероксидазной активности у сyt *c* в щелочной среде.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** щелочная изомеризация, анионы Хофмейстера, псевдо-пероксидазная активность.

**DOI:** 10.31857/S0320972521010061

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохром *c* (сyt *c*) — это многофункциональный гемопrotein, расположенный преимущественно на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны, где он выполняет свою функциональную роль в качестве мобильного переносчика электронов между комплексом III и комплексом IV в дыхательной цепи. Кроме того, сyt *c* способен катализировать пероксидазо-подобные реакции [1], может функционировать как ловушка супероксида [2–4] и участвовать в инициации апоптоза после выхода в цитоплазму [5–7]. Более того, во внемитохондриальном пространстве сyt *c* был идентифици-

рован как партнер взаимодействия для более чем 250 различных биомолекул [8, 9]. Такая многофункциональность сyt *c*, по-видимому, возможна благодаря конформационной гибкости его окисленного нативного складчатого состояния [10–13], что позволяет структуре белка существовать в различных альтернативных конформациях, зависящих от условий окружающей среды (значения pH, локальных электрических полей и т.д.). Эти ненативные конформации могут различаться в шестой аксиальной координации (differ in sixth-axial coordination), по окислительно-восстановительным параметрам, сродству связывания и каталитической активности белка [11, 14, 15].

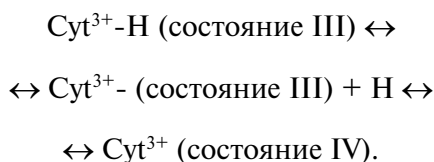
Возможно одной из наиболее изученных ненативных конформаций сyt *c* является так называемое щелочное состояние или состояние IV, которое характеризуется потерей шестого аксиального лиганда Met80 гемового железа

Принятые сокращения: сyt *c* — цитохром *c*; GdmCl — гуанидинхлорид; КД — круговой дихроизм; МД — молекулярная динамика.

\* Адресат для корреспонденции.

без существенного влияния на третичную и вторичную структуры белка [16–18]. Щелочная трансформация *сyt c* представляет собой конформационное изменение, которое происходит спонтанно в природном *сyt c* в интервале значений pH 8,5–11 [19, 20]. В митохондриальном *сyt c* исследования рекомбинантной экспрессии [21] при сочетании методов ЯМР [22] и резонансной Рамановской спектроскопии [23] показали, что Lys73 и Lys79, а также, возможно, Lys72 [24] в составе  $\Omega$ -петли фолдона, состоящей из а.о. 70–85, заменяют нативный лиганд Met80. Эта неоднородность щелочного состояния, представленная несколькими пространственными конфигурациями, вероятно, является причиной трудности получения его кристаллической структуры. Однако структуры двойных и тройных мутантов *сyt c* дрожжей с Lys73 в шестом аксиальном положении гемового железа были определены методами ЯМР и рентгеновской кристаллографии и представляют собой хорошие структурные модели состояния IV [6, 25].

Результаты, полученные в экспериментах с использованием кинетических методов остановленной струи и в экспериментах по обмену водорода с использованием ЯМР [10, 14, 23, 27–30] позволяют предположить, что механизм щелочного перехода включает как минимум два этапа:



Результатом первого шага является одноводородное депротонирование триггерной группы, приводящее к нативному депротонированному состоянию III *сyt c* с экспериментально определенной константой равновесия  $K_H$  для диссоциации протонов ( $pK_H \sim 11$ ) [27]. Эта стадия депротонирования связана со вторым этапом, ограничивающим скорость конформационным изменением *сyt c* (с константой равновесия  $K_C$  для структурных изменений,  $pK_C \sim -2$ ), что приводит к лигандному обмену Met80 на другой сильный лиганд [30]. Депротонирование триггерной группы в *сyt c* дикого типа с  $pK_H \sim 11$  говорит в пользу остатков 72, 73 и/или 79 [23, 31], но точная идентичность триггерной группы все еще находится в стадии обсуждения [15, 28, 32–34]. Следует отметить, что более поздние исследования указывают на то, что щелочной переход является более сложным процессом, состоящим из нескольких последующих и/или параллельных переходов [31, 35].

Несмотря на интенсивные исследования, функциональная роль щелочных состояний *сyt c* до сих пор неизвестна. Эти не природные конфигурации *сyt c*, по-видимому, похожи на более поздний промежуточный продукт, расположенный вдоль складок [30, 36–38], но были также указания на то, что снижение окислительно-восстановительного потенциала цитохрома *c* является следствием более открытой структуры гемовой щели, что важно для работы *сyt c* как в цепи переноса электронов [23, 25, 39], так и в апоптозе в связи с усилением активности пероксидазы [11, 40–43]. Дискуссия о функциональной роли щелочно-подобных состояний была подогрета недавними открытиями некоторых посттранскрипционных модификаций *сyt c* млекопитающих и некоторыми естественными точечными мутациями, которые запускают конформацию белка, аналогичную состоянию IV, даже при физиологическом значении pH. Мутант *сyt c* Gly41Ser [44, 45], а также Tyr48His [46] в гене *сyt c* человека индуцируют ранние щелочные переходы при нейтральном pH, которые способствуют увеличению динамики  $\Omega$ -петли (40–57 а.о.), диссоциации Met80 и повышению пероксидазной активности *сyt c* [43, 45]. Эти мутанты проявляли повышенную апоптотическую активность, вероятно, за счет усиления связывания и активации Araf-1 или способствуя реокислению *сyt c*, сборке апоптосом и их активации [44]. Посттрансляционная модификация *сyt c*, например нитрованием (остаток Tyr в положении 74) и фосфорилированием (например, Tyr48), которая возникает при окислительном стрессе, приводит к ослаблению аксиальной связи Fe-Met80. Таким образом, эта модификация позволяет осуществлять щелочной переход при физиологическом pH, что, вероятно, связано с повышением пероксидазной активности [15, 41, 47]. Несмотря на возникновение повышенной активности пероксидазы, эти модификации оказывали антиапоптотическое воздействие за счет снижения способности активировать каспазу-9 [41, 47]. Эти данные подтверждают гипотезу о важной функции щелочной конформации *сyt c in vivo* [17, 41, 43, 47–49].

С этой позиции возникает вопрос, связанный с пероксидазной активностью щелочной конформации *сyt c*. Diederich et al. [50, 51] для *сyt c* сердца лошади и McClelland et al. [52] для tmK72 *сyt c* и *сyt c*-550 из *Saccharomyces cerevisiae* показали, что пероксидазная активность белка снижается с увеличением pH из-за замены Met80 аксиальным лигандом с сильным полем, который ингибирует его пероксидазную активность. С другой стороны, было сообщено, что *сyt c* с Lys в качестве шестого аксиального

лиганда обладает повышенной пероксидазной активностью [17, 48, 53, 54], что согласуется с активностью *сут c* при определенных естественных мутациях и посттрансляционных модификациях [15, 41, 43, 45, 47].

Общепризнано, что каталитическая пероксидазная активность *сут c* коррелирует с наличием популяции пятикоординатных высокоспиновых видов [17, 48, 55], которые являются следствием присущей этой популяции динамики в области гема [11, 56, 57]. Мы и другие исследователи ранее показали, что динамика структуры белка может быть модулирована изменением физико-химических свойств растворителя солями, за счет эффекта, известного как эффект Хофмейстера, или специфический солевой эффект [58–61]. Модуляция динамики структуры белка может оказывать влияние на глобальную и локальную стабильность, конформационные переходы и активность ферментов [57, 58, 62–64].

В настоящей работе мы проанализировали структуру и термическую стабильность, а также пероксидазную активность, щелочного *сут c* в присутствии анионов Хофмейстера. Показано, что щелочное состояние *сут c* имеет (i) компактную структуру с несколько меньшей изотермической стабильностью по сравнению с его нативным состоянием, и (ii) практически отсутствует пероксидазная активность независимо от типа аниона Хофмейстера, присутствующего в растворителе. Наши эксперименты предполагают сильное сродство не природного лиганда к гемовому железу даже в присутствии высокой концентрации денатуранта. Моделирование молекулярной динамики (МД) в сочетании с экспериментальными результатами свидетельствует о чрезвычайном высоком сродстве лизина к гемовому железу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Цитохром *c* из сердца лошади («Sigma», США) использовали без дополнительной очистки. Перед измерениями белок полностью окисляли добавлением 1 мкл 10 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$  к 2,5 мл образца. Концентрацию окисленного *сут c* определяли спектрофотометрически по поглощению при 410 нм ( $\epsilon \approx 106\ 100\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ) при pH 7,0 в 10 мМ натрий-фосфатном буфере. Концентрацию 35%-ного водного раствора перекиси водорода без добавок («Centrachem», Словакия) определяли спектрофотометрически по поглощению при 240 нм ( $\epsilon \approx 40\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ) в дистиллированной воде. Концентрацию гваякола (>99%) («Sigma», США) в исходном растворе определяли спектрофотометрически по погло-

щению при 274 нм ( $\epsilon \approx 2550\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ) [65]. Все остальные химикаты были закуплены у компаний «Fluka», Германия и «Sigma», США. Исходные растворы солей перед использованием фильтровали.

**Флуоресцентно-эмиссионная спектроскопия.** Измерения флуоресценции проводили с помощью 10 мм кюветы на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse («Varian», США), снабжённом Пельтье-элементом. Щелочное титрование проводили путем добавления очень небольших количеств концентрированного NaOH в раствор, содержащий либо 5 мМ какодилатный буфер, либо буфер с 8 М мочевиной и 0,5 М солью. Температура в кюветах поддерживалась постоянной на уровне  $20,0 \pm 0,5\ ^\circ C$  с помощью элемента Пельтье. При титровании регистрировались спектры эмиссионной флуоресценции *сут c* в диапазоне 310–400 нм при длине волны возбуждения 290 нм. Концентрация *сут c* в кювете составляла 9 мкМ. В качестве эталона был взят спектр при pH 6,0.

Кривые щелочной изомеризации строили в виде зависимости значений флуоресценции при 350 нм от pH. Значения  $pK_a$  кривых щелочной изомеризации определяли по следующему уравнению:

$$f = \frac{A_N + A_D 10^{n(pK_a - pH)}}{1 + 10^{n(pK_a - pH)}}, \quad (1)$$

где  $f$  – фракция *сут c* в щелочном состоянии,  $A_N$  и  $A_D$  – интенсивность флуоресценции в точке 350 нм нативной и денатурированной форм, а  $n$  – число протонов, участвующих в переходе. Значения pH измеряли непосредственно в кюветах с помощью стеклянного микроэлектрода Sensorex (до и после регистрации спектров).

**Измерения термической стабильности.** Термическую денатурацию *сут c* регистрировали при длине волны возбуждения 290 нм и излучения – 350 нм, при постоянной скорости сканирования  $1\ ^\circ C/мин$  и в присутствии 0,5 М солей в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, и 0,5 М солей в 50 мМ глицин-NaOH буфере, pH 10,0. Конечная концентрация белка составляла 9 мкМ. Кривые термической денатурации *сут c* были проанализированы с использованием следующего уравнения, описывающего двухфазный переход:

$$I_{obs} = \frac{I_N + m_N T + (I_U + m_U T) \exp \left[ \frac{\Delta H_{trs}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{trs}} \right) \right]}{1 + \exp \left[ \frac{\Delta H_{trs}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{trs}} \right) \right]}, \quad (2)$$

где  $I_{\text{obs}}$  — наблюдаемая интенсивность флуоресценции при температуре  $T$ ,  $I_N$  и  $I_U$ , а также  $m_N$  и  $m_U$  представляют собой пересечения и наклоны (intercepts and slopes) нативных (предденатурированных) и развившихся (постденатурированных) исходных линий соответственно, а  $\Delta H_{\text{trs}}$  — энтальпия при температуре перехода  $T_{\text{trs}}$ .

**Измерения методом кругового дихроизма (КД).** После изотермической денатурации *сyt c* гуанидинхлоридом (GdmCl) проводили измерения КД в дальней УФ области при 220 нм в 1 мм кювете с помощью спектрополяриметра JASCO J-810 («Jasco», Япония). Измерения КД проводили в растворе, содержащем 25 мкМ *сyt c* в 5 мМ буфере натрий-какодилат рН 6 и в 10 мМ буфере натрий-фосфатном/NaOH рН 11. Измерения проводили при 20 °С.

Свободная энергия разворачивания Гиббса ( $\Delta G$ ), которая выражает стабильность белка, и величина  $m$ , которая зависит от площади поверхности белка, подвергнутого воздействию растворителя при разворачивании [66], были оценены с применением нелинейного анализа наименьших квадратов, используемого в рассматриваемой модели [67].

$$\theta = \frac{\Delta\theta_N + m_N[D] + (\Delta\theta_U + m_U[D]) \exp(\Delta G/RT + m[D]/RT)}{1 + \exp(\Delta G/RT + m[D]/RT)}. \quad (3)$$

В этой модели отражена наблюдаемая эллиптичность ( $\theta$ ) и концентрация денатуранта  $[D]$ , с входящими в неё параметрами  $\Delta\theta_N$ ,  $\Delta\theta_U$ ,  $m_N$ ,  $m_U$ ,  $m$  и  $\Delta G$ , соответствующими модели. Здесь  $\Delta\theta_N$  и  $\Delta\theta_U$  представляют собой пересечения базовых кривых предденатурации и постденатурации соответственно, а  $m_N$  и  $m_U$  представляют собой наклоны исходных линий предденатурации и постденатурации соответственно. Значения  $\Delta G$  и  $m$  представляют собой пересечение и наклон линейной экстраполяции происходящих изменений свободной энергии в зависимости от концентрации денатуранта. Это уравнение учитывает линейную зависимость предденатурационной и постденатурационной областей развернувшейся кривой [67].

**Измерения методом абсорбционной спектроскопии.** Спектры поглощения измеряли в 10 мм кювете на спектрофотометре Varian Cary Bio 100 («Varian», США), оснащенный элементом Пельтье. Спектры поглощения измеряли в диапазоне 600–800 нм в присутствии и в отсутствие 8 М мочевины и 0,5 М солей ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , NaCl и NaSCN) в 10 мМ натрий-фосфатном буфере при рН 7, 10 и 12. Концентрация *сyt c* составляла 100 мкМ.

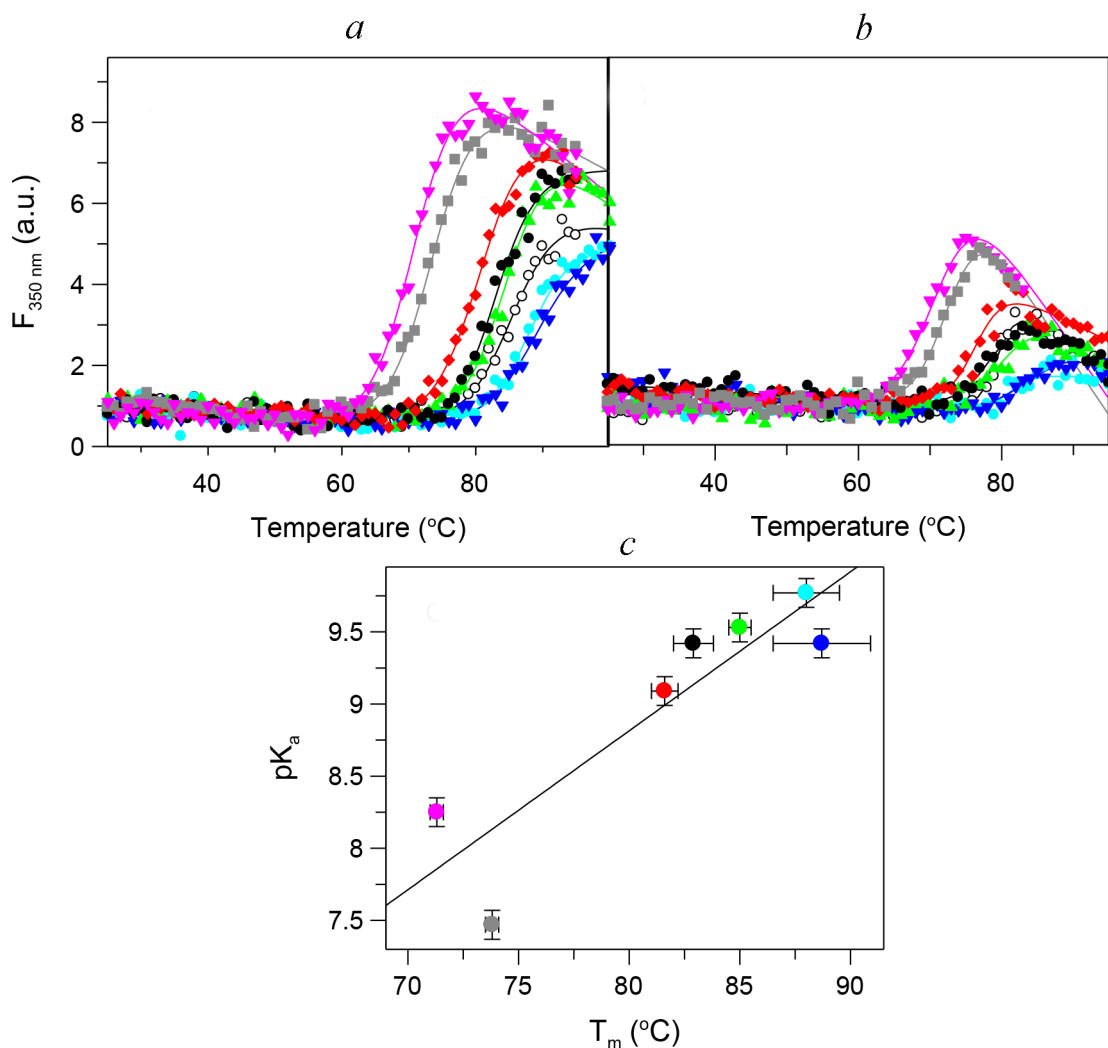
**Кинетические исследования пероксидазной активности цитохрома *c*.** Анализ активности про-

водили в 10 мм кварцевой кювете. Использовали свежеприготовленный исходный раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и его концентрацию проверяли спектрофотометрически ( $\epsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Реакцию образования тетрагуаякола контролировали при 470 нм с помощью спектрофотометра Specord S300 UV-VIS diode-array («Analytik Jena AG», Германия), оснащенного элементом Пельтье. Реакции измеряли при 20 °С в присутствии и в отсутствие 0,5 М солей в 10 мМ натрий-фосфатном буфере при рН 7,0–7,5; 10 мМ Tris-HCl при рН 8,0–8,5 и 10 мМ глицин-NaOH буфере при рН 9,0–10,0. Реакционные смеси содержали 1,8 мкМ *сyt c*, 1 мМ гваякола и соответствующую концентрацию (5–20 мМ) перекиси водорода. Реакцию запускали добавлением  $\text{H}_2\text{O}_2$ , как сообщалось ранее [57].

**Моделирование методом молекулярной динамики (МД).** Конформации *сyt c* с шестым лигандом Lys72, Lys73 и Lys79 были построены вручную с помощью визуализатора BIOVIA Discovery Studio 2020 г. выпуска [68]. Нативная структура *сyt c*, основанная на экспериментальной геометрии *сyt c* с разрешением 1,9 Å (PDB ID: 1HRC) [69], была использована для построения вышеупомянутых конформационных форм. Комбинация программ Maestro/Desmond выпуска 2020 г. [70] была использована для моделирования различных конформационных состояний *сyt c*, которые были сольватированы в каждом сайте связывания, используя программу Maestro. На этом этапе была использована SPC water Model [71] с молекулами воды в 1 нм буфере вокруг конформеров *сyt c*. Полученные структуры были минимизированы и уравновешены при первом 5 нс запуске NPT (давление 1,01325 бар) моделирования при 10 К. Для проведения исследований моделирования использовалось силовое поле OPLS-2005 (современная версия семейства силовых полей OPLS [72, 73]). Окончательные структуры были подвергнуты в течение 10 нс NPT моделированию (давление 1,01325 бар) с помощью программы Desmond при 300 К. Кроме того, веб-сервис ChExVis [74] был использован для прогнозирования внутримолекулярных каналов всех четырех конформационных форм *сyt c*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Специфическое влияние анионов на щелочную изомеризацию и термостабильность *сyt c*.** Тот факт, что соли влияют на щелочной переход *сyt c*, был недавно продемонстрирован на ряде солей Хофмейстера [62]. В данной работе, по сравнению с предыдущей, мы еще больше

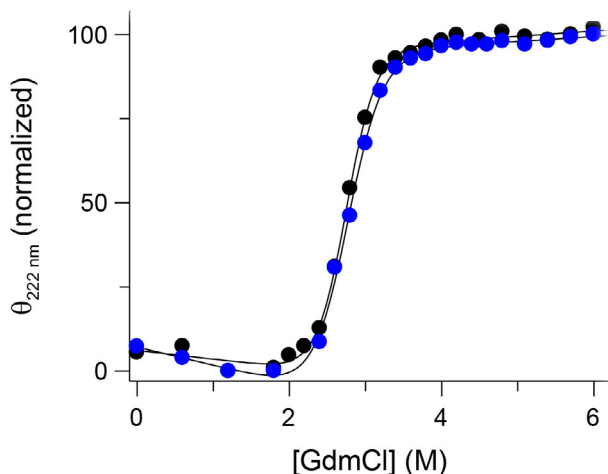


**Рис. 1.** Температурная денатурация сyt *c* в отсутствие соли (белые кружки) и в присутствии 0,5 М солей:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (голубые кружки),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (синие перевернутые треугольники),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (зеленые треугольники),  $\text{NaCl}$  (черные кружки),  $\text{NaBr}$  (красные ромбы),  $\text{NaClO}_4$  (серые квадраты) и  $\text{NaSCN}$  (пурпурные перевернутые треугольники) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7 (*a*) и в 50 мМ глицин- $\text{NaOH}$  буфере, pH 10 (*b*). Интенсивность флуоресценции контролировалась при длине волны излучения 350 нм после возбуждения при длине волны 290 нм. *c* – Корреляция между значениями  $pK_a$  и  $T_m$ , полученными в присутствии исследуемых солей (коэффициент корреляции линейной зависимости равен 0,8895). (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

расширили количество изученных солей. Полученные значения  $pK_a$  щелочной изомеризации сyt *c* (табл. S1 в Приложении) наглядно демонстрируют специфическое действие анионов в зависимости от их положения в ряду Хофмейстера. Фактически, щелочное состояние, состояние IV, стабилизируется хаотропными анионами по мере уменьшения значений  $pK_a$  в процессе перехода, т.е. состояние III сyt *c* дестабилизируется в направлении от космотропных к хаотропным анионам.

Специфическое влияние анионов на термостабильность сyt *c* в состояниях III и IV изучали путем мониторинга интенсивности флуорес-

ценции при pH 7 и 10 (рис. 1, *a* и *b*), и полученные значения  $T_m$  приведены в табл. S2 Приложения. Тепловые переходы цитохрома *c* при всех исследованных условиях делают очевидным двойной характер его состояний. Температуры перехода определяли путем внесения экспериментальных данных в уравнение 2. При низкой ионной силе температура перехода сyt *c* при pH 10 ( $79,5^{\circ}\text{C}$ ) была примерно на  $6^{\circ}\text{C}$  ниже по сравнению с температурой при pH 7 ( $85,6^{\circ}\text{C}$ ). Такая же тенденция наблюдалась и в присутствии 0,5 М анионов. Значения температур перехода сyt *c* при pH 10 были во всех солях, кроме того, в присутствии хаотропного перхлората и



**Рис. 2.** Изотермическая денатурация cyt *c* в присутствии GdmCl в 5 мМ натрий-какодилате, рН 6 (чёрный) и в 10 мМ натрий-фосфат/NaOH, рН 11 (синий), сопровождающаяся эллиптичностью при 222 нм

тиоцианата они были ниже по сравнению со значениями при рН 7 (табл. S2 в Приложении). При обоих рН термостабильность cyt *c* плавно снижается от космотропных к хаотропным анионам (рис. 1, *a* и *b*; табл. S2 в Приложении) в соответствии с известным эффектом Хофмейстера на стабильность белка [75].

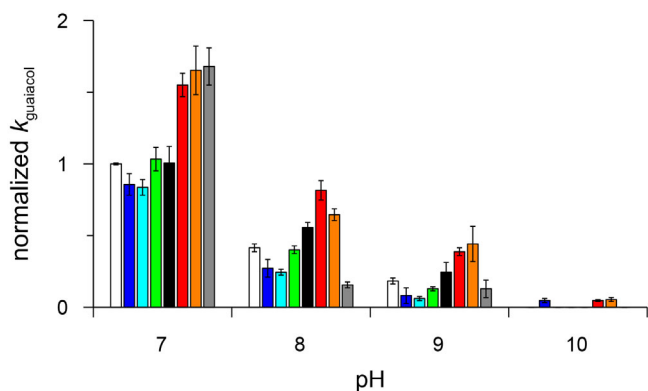
Отметим, что интенсивность флуоресценции при термической денатурации при рН 10 была примерно в два раза ниже, чем при рН 7, что свидетельствует о более компактном состоянии термически денатурированного цитохрома *c* при щелочном рН, чем при нейтральном рН (рис. 1, *a* и *b*). График зависимости величины  $pK_a$  от температуры перехода цитохрома *c* в присутствии исследуемых солей демонстрирует корреляцию, указывающую на взаимосвязь между этими параметрами (рис. 1, *c*).

**Изотермическая денатурация цитохрома *c* в нативном и щелочном состояниях.** Для сравнения стабильности нативного и щелочного состояний cyt *c* мы также провели эксперименты по изотермической денатурации, контролируя значения эллиптичности при 220 нм в присутствии гуанидинхлорида (рис. 2). GdmCl-индуцированное разворачивание нативного и щелочного состояний cyt *c* было обратимым, что позволило применить равновесный термодинамический анализ. Значения эллиптичности, измеренные при 220 нм, были нормированы по минимальным и максимальным значениям эллиптичности в исследуемом диапазоне концентраций денатуранта. Экспериментальные данные эллиптичности, в зависимости от концентрации GdmCl, были получены в соответствии с уравнением 3. В результате был получен набор

термодинамических параметров для нативного цитохрома *c* при рН 6 ( $m = 12,7 \pm 0,7$  кДж/моль/м и  $\Delta G = 34,9 \pm 2,1$  кДж/моль) и щелочного цитохрома *c* при рН 11 ( $m = 10,9 \pm 0,6$  кДж/моль/м и  $\Delta G = 29,9 \pm 1,6$  кДж/моль). Эти результаты свидетельствуют о том, что в нативном состоянии cyt *c* имеет более высокую стабильность  $\sim 5$  кДж/моль, чем в щелочном состоянии, что согласуется с результатами термической денатурации. Полученные значения  $m$ , пропорциональные площади поверхности белка, обращённой в растворитель [66], позволяют предположить, что развернутая конформация обоих состояний III и IV аналогична, а структура щелочного состояния несколько более открыта по сравнению с нативным состоянием cyt *c*.

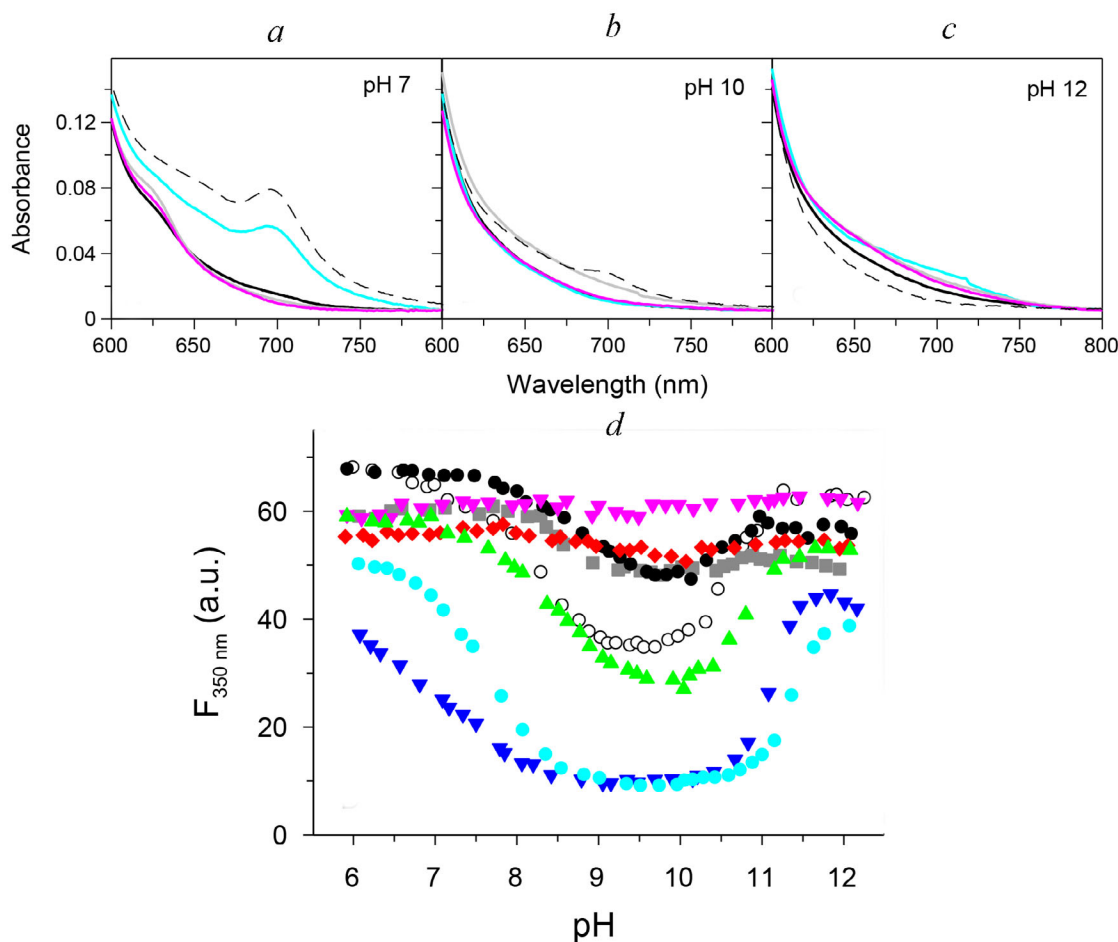
**Пероксидазная активность щелочного цитохрома *c* в присутствии анионов.** Пероксидазную активность cyt *c* в диапазоне рН 7–10 определяли при окислении гваякола, как было описано ранее [57]. При рН 7 у cyt *c* равномерно увеличивалась пероксидазная активность, начиная от присутствия космотропных и до хаотропных анионов. Действительно, константа скорости второго порядка пероксидазной активности cyt *c* увеличивалась в 2,5 раза в присутствии хаотропных анионов по сравнению с таковой в присутствии космотропных анионов или в отсутствие солей (рис. 3, табл. S3 в Приложении). Однако при постепенном увеличении рН константа скорости второго порядка пероксидазной активности cyt *c* снижалась независимо от типа аниона, и при рН 10 пероксидазная активность cyt *c* не обнаруживалась. Отметим, что в присутствии 0,5 М перхлората пероксидазная активность cyt *c* наиболее высока при рН 6, но эта активность исчезает уже при рН 8. Это наблюдение ясно показывает, что пероксидазная активность cyt *c* исчезает при переходе его в состояние IV ( $pK_a$  щелочной изомеризации cyt *c* в присутствии 0,5 М NaClO<sub>4</sub> составляет  $\sim 7,5$ ), что согласуется с ингибированной пероксидазной активностью cyt *c* в присутствии всех исследуемых солей при рН 10.

**Влияние анионов на щелочную изомеризацию денатурированного cyt *c*.** Анализ щелочной изомеризации cyt *c* в присутствии 8 М мочевины позволил проверить гипотезу о том, что сродство Lys к гемовому железу при щелочном значении рН сохраняется даже в таких суровых условиях. При инкубации cyt *c* в 8 М мочевины нативный лиганд гемового железа в cyt *c*, Met80, заменяется другим сильным лигандом, His33, при этом небольшая часть cyt *c* находится в неупорядоченном состоянии, похожем на пентакоординированное [76]. Фактически, именно на это указывает спектр поглощения cyt *c* в 8 М мо-



**Рис. 3.** Зависимость нормированного коэффициента константы скорости второго порядка пероксидазной активности *cyt c*, измеренного при окислении гваякола, от pH в присутствии и в отсутствие разного рода солей: без соли (белый),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (голубой),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (синий),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (зеленый), раствор  $\text{NaCl}$  (черный),  $\text{NaBr}$  (красный),  $\text{NaNO}_3$  (оранжевый) и  $\text{NaClO}_4$  (серый)

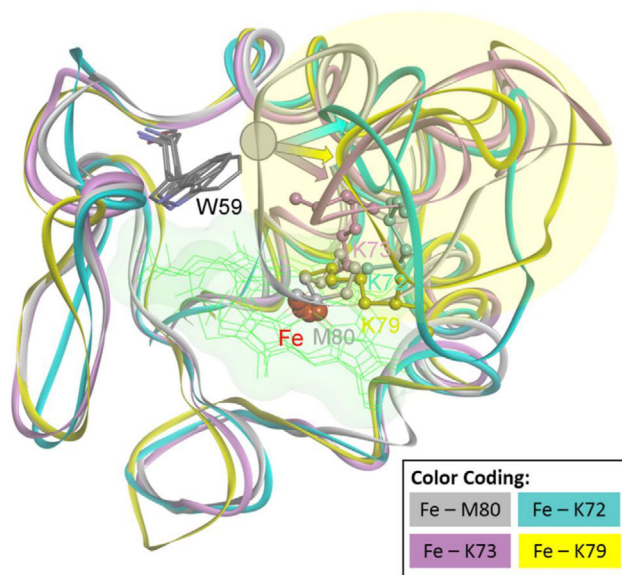
чевине в области 600–700 нм (рис. 4, *a*): (i) полоса 695 нм отсутствует и (ii) присутствует слабая полоса 620 нм (показатель высокоспинового состояния гемового железа), соответствующая ~5% от высокоспинового состояния *cyt c*, наблюдаемого при низкой ионной силе при pH 2. Щелочную изомеризацию в 8 М мочеvine можно проследить с помощью другой характеристики *cyt c* – собственной флуоресценции триптофана. *Cyt c* содержит только один остаток триптофана (Trp59), который погружен в гемовую щель вблизи гема и отражает малейшие изменения своего (Trp59) расстояния от гема [77]. В нативной конформации *cyt c* флуоресцентное излучение триптофана гасится за счет переноса гемом энергии Фостера [55], но при pH 7 в 8 М мочеvine интенсивность флуоресценции *cyt c* достигает ~60–65% от флуоресценции NATA (N-ацетил-L-триптофанамида) –



**Рис. 4.** Спектры поглощения *cyt c* в области 600–800 нм, измеренные при pH 7 (*a*), pH 10 (*b*) и pH 12 (*c*) в буфере (пунктирная линия) и в присутствии 8 М мочеvine при pH 7, 10 и 12 в отсутствие солей (серая линия) и в присутствии 0,5 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (голубая линия), 0,5 М  $\text{NaCl}$  (черная линия) и 0,5 М  $\text{NaSCN}$  (пурпурная линия). *d* – Зависимости интенсивности флуоресценции *cyt c* при 350 нм в 8 М мочеvine в отсутствие соли в 5 мМ какодилатном буфере (белые кружки) и в присутствии 0,5 М натриевых солей:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (голубые кружки),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (синие перевернутые треугольники),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (зеленые треугольники),  $\text{NaCl}$  (черные кружки),  $\text{NaBr}$  (красные ромбы),  $\text{NaClO}_4$  (серые квадраты) и  $\text{NaSCN}$  (пурпурные перевернутые треугольники)

аналога остатка триптофана (данные не приведены).

Щелочная изомеризация *cut c* в 8 М мочеви-не в интервале pH 6–12 явно указывает на три переходные состояния (рис. 4): (i) первый переход состоит в неожиданном снижении флуоресценции почти во всех условиях (кроме присутствия тиоцианата) со значением  $pK_a$  7,7–9,1 (табл. S4 в Приложении), а значение  $n \sim 1$  говорит о том, что депротонированию подверглась одна группа. Эти переходы отражают изменение конформации молекул, находящихся в состоянии низкоспинового гемового железа (рис. 4, *a*), и небольшой популяции молекул с высокоспиновым гемом железа (в случае хаотропов) в другое низкоспиновое состояние гемового железа (рис. 4, *b*); (ii) второй переход заключается в увеличении флуоресценции триптофана до исходного, т.е. на уровне pH 6, со значениями  $pK_a$   $11,0 \pm 0,4$  и значениями  $n \sim (2-3)$ , подразумевающими более чем одну группу, подвергающуюся депротонированию (табл. S4 в Приложении). Окончательная конформация *cut c* во втором переходе представлена низкоспиновым гемом железа (рис. 4, *c*). Эти переходы, скорее всего, представляют собой щелочно-подобные переходы к конформации Lys-гемового железа при более низких значениях pH (6–10), т.е. в IV-подобное состояние, и переход в V-подобное состояние в диапазоне pH 10–12.



**Рис. 5.** Суперпозиция нативной структуры цитохрома *c*, а также различных конформаций, в которых различные ли-зины образуют координационную связь с гемовым железом. Гибкость петли выделена светло-оранжевым цветом, а стрелки иллюстрируют движение петли, облегчающее взаимодействие K72, K73 или K79 с гемовым железом. (Обозначения: К – остаток Lys, М – Met, W – Trp)

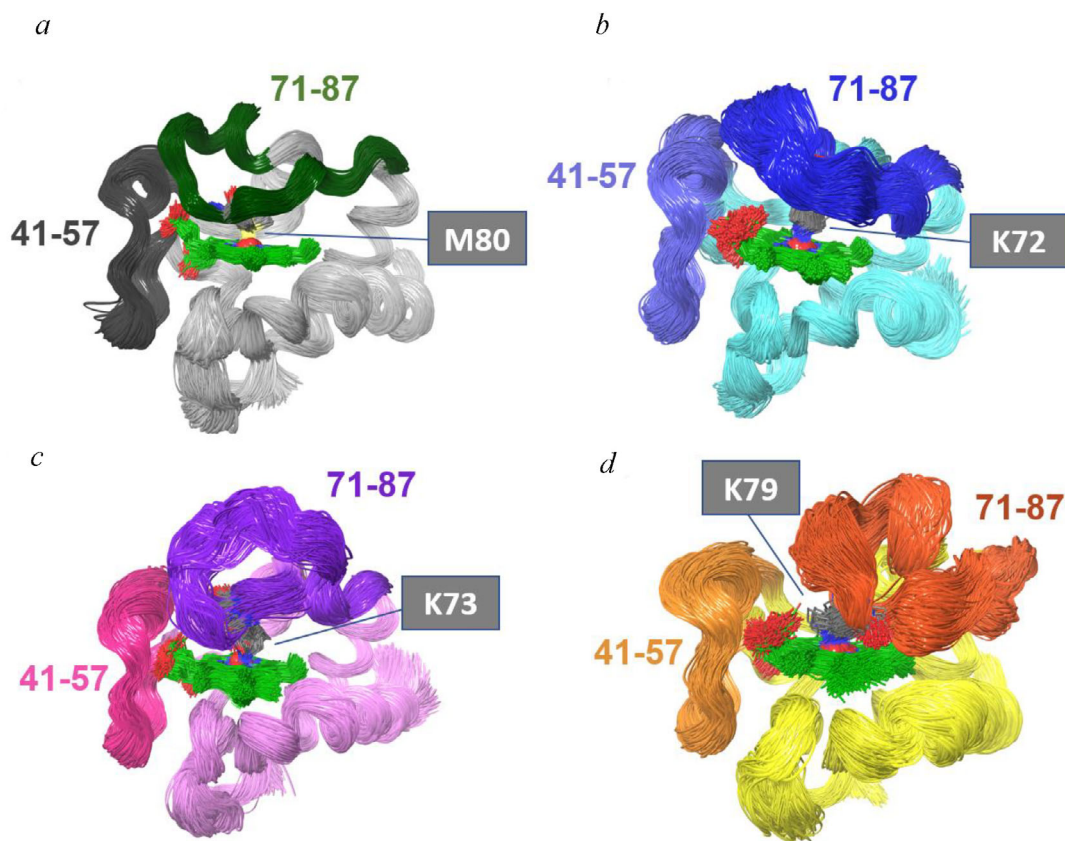
Анионы Хофмейстера существенно влияют на pH-переходы *cut c* в 8 М мочеви-не. В присутствии космотропных анионов (фосфатов и сульфатов) снижение флуоресценции наиболее выражено, в то время как в присутствии хаотропов (тиоцианата и перхлората) изменения флуоресценции триптофана довольно незначительны (рис. 4, *d*).

Основываясь на анионзависимом снижении флуоресценции триптофана, мы предполагаем, что анионы в щелочном состоянии не стабилизируют одинаково все возможные состояния лигирования. Для решения этой гипотезы мы исследовали молекулярную динамику *cut c* в различных лигированных состояниях: Met80, Lys79, Lys73 и Lys72.

**Моделирование МД различных лигированных состояний *cut c*.** Моделирование МД различных связанных состояний *cut c* предсказывает различную ориентацию (рис. 5) и различную гибкость конформации петель (рис. 6). На рис. 5 показана исходная геометрия для моделирования. Желтым цветом выделены конформации петель (71–87 а.о.), содержащих Met80, Lys72, Lys73 и Lys79. В то время как небольшие конформационные изменения необходимы для координационного обмена Met80 на Lys79, больший конформационный сдвиг необходим для того, чтобы Lys72 или Lys73 взаимодействовали с гемовым железом. Этот конформационный сдвиг связан с большей гибкостью этой петли по сравнению с нативной формой *cut c*. Более значительная гибкость петли (71–87 а.о.), когда Lys72, Lys73 или Lys79 координационно связаны с гемовым железом, проиллюстрирована на рис. 6, *b–d* на схемах петель различной окраски. Эти результаты хорошо согласуются с данными Oviedo-Rouco et al. [78], которые предсказали, что сегменты петли (71–87 а.о.) и петли (41–57 а.о.) будут более гибкие для конформеров, содержащих Lys в положении шестого лиганда. Сравнение гибкости петель показано на рис. 6, где *cut c* представлен в виде ленты с отмеченными аминокислотами, координационно связывающимися с атомом гемового железа. Визуализируется около 1000 конформаций для всех форм *cut c*, которые были сохранены при 10 нс МД-моделировании в водной среде (рис. S1 и S2 в Приложении).

Координационная связь Fe-S, возникающая в случае Met80 и нативного *cut c* (рис. 6, *a*), вероятно, приводит к более высокой стабилизации геометрии петли, чем координационная связь Fe-N, которая имеется в случае Lys72, Lys73 и Lys79. Как следствие, в случае конформеров Lys гибкость петли, по-видимому, выше (рис. 6, *b–d*). Интересно, что аминокислоты сегмента пет-





**Рис. 6.** Конформационные ансамбли различных форм сыв *c* по отношению к координации гема железо–серы (для случая Met80) и координации азот–железо (в случае Lys72, Lys73 и Lys79). Различными цветами обозначены петли (41–57 а.о.) и (71–87 а.о.). При координационном связывании Lys с гемовым железом была обнаружена большая гибкость петель, чем при координационной связи с серой нативного сыв *c*. (Обозначения: К – остаток Lys, М – Met)

ли (41–57 а.о.), которые не находятся в прямом взаимодействии с гемовым железом, также обладают более высокой гибкостью в случае Lys-конформеров по сравнению с нативным состоянием сыв *c*.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Щелочное состояние сыв *c*, включающее в себя смесь по меньшей мере двух конформаций с ненативными лигандами гемового железа, является единственным из пяти различных состояний, кроме нативного, в диапазоне рН 0–14, с низкоспиновым состоянием гемового железа [79]. Цитохром *c* в состояниях III и IV имеет в целом сходные свойства, которые суммированы в таблице. Однако пониженный восстановительный потенциал в состоянии IV, по сравнению с состоянием III, привлёк большое внимание. Действительно, более низкий (на 0,3–0,5 В) восстановительный потенциал сыв *c* в состоянии IV [53, 80] превращал сыв *c* из обратимого переносчика электрона между комплексами III

и IV в однонаправленного транспортёра электрона (к комплексу IV) с возможной регуляторной ролью *in vivo* [19, 81]. Однако только недавно было обнаружено, что некоторые естественные мутации [43, 45, 82, 83] и посттрансляционные модификации [15, 41, 47, 84] смещают щелочную изомеризацию в нейтральную, близкую к физиологической, область значений рН. Предполагается, что щелочное состояние играет определенную роль в проапоптотических событиях, во время которых сыв *c* повышает свою способность катализировать пероксидазную реакцию [17, 26, 41, 49, 52]. Систематически сообщалось, что в условиях, благоприятствующих состоянию IV, как образца аксиального взаимодействия, сыв *c* обладает повышенной пероксидазной активностью по сравнению с состоянием III [48, 53, 54]. Интересно, что в сыв *c* как в состоянии III, так и в состоянии IV, присутствуют низкоспиновые формы гемового железа, что означает наличие сильного шестого аксиального лиганда и, следовательно, отсутствие пероксидазной активности. Гемовый белок, способный катализировать пероксидазные реакции,

должен находиться в пента-координированном состоянии с вакантным шестым сайтом, что является неизбежным условием доступности активного участка для субстрата. Действительно, было показано, что пероксидазная активность *сyt c* является результатом временно формирующегося пента-координированного состояния гема. Это считается следствием присущей данной области гема динамики — обратимого разворачивания наименее стабильных фолдонов *сyt c* [57], т.е. так называемых инфракрасных и красных фолдонов, состоящих из а.о. 41–57 и 71–87 соответственно [85]. Это предположение основано на экспериментальных наблюдениях связывания малых лигандов, таких как цианид [60, 86, 87] или имидазол [88], с гемовым железом. Основываясь на наших выводах о том, что анионы Хофмейстера влияют на динамику в области гема, как показано на анионной зависимости константы скорости связывания цианида с гемовым железом [60], мы предположили, что эффект Хофмейстера должен влиять также на пероксидазную активность *сyt c* в состоянии III. Фактически, полученные результаты пероксидазной активности *сyt c*, контролируемой окислением гваякола (рис. 3), подтверждают эту гипотезу. Показано, что пероксидазная активность *сyt c* в присутствии солей возрастает в направлении от космотропных к хаотропным анионам в соответствии с повышенной динамикой в области гема. Это согласуется с нашей предыдущей работой, в которой мы наблюдали повышенную окислительную модификацию *сyt c* перекисью водорода в присутствии хаотропных, по сравнению с космотропными, анионов [89]. Однако в то время, при измерении методом FOX2, мы не наблюдали разницы в пероксидазной активности *сyt c*, что свидетельствует о его меньшей чувствительности по сравнению с методом, основанном на окислении гваякола.

В наших исследованиях, посвященных эффекту Хофмейстера, мы отмечали, что анионы влияют не только на динамику *сyt c* в области гема, но и на значения  $pK_a$  в его щелочном состоянии [62]. Этот вывод согласуется с наблюдениями локальной дестабилизации  $\Omega$ -петли (70–85 а.о.) в результате мутаций [90–93], посттрансляционной модификации [41, 43, 47, 49, 55], физико-химических факторов, таких как повышенная концентрация денатурантов [76] или температура [94–96], что снижает значения  $pK_a$  щелочной изомеризации *сyt c*. Наши результаты подтверждают этот вывод, как видно из корреляции между стабильностью в целом, представленной значениями  $T_m$ , и значениями  $pK_a$ , наблюдаемыми в присутствии солей (рис. 1, *c*).

Из-за сопоставимости стабильности состояний III и IV (рис. 2) мы предположили аналогичное влияние анионов Хофмейстера на пероксидазную активность состояния IV, как это наблюдалось для состояния III. Однако во всех изученных условиях, с солями или без них, *сyt c* в состоянии IV обладает незначительной пероксидазной активностью. Наше объяснение этого наблюдения состоит в том, что Met80, шестой лиганд состояния III, находится в относительно лабильном положении, конкурируя с другими аминокислотными остатками (Lys) за связь с гемовым железом, как это следует из детального анализа спектральных свойств *сyt c*, выполненного группой Schweitzer-Stenner [97, 98]. По-видимому, следствием этой конкуренции за гемовое железо является существование популяции в пента-координированном состоянии, способной катализировать пероксидазные реакции. С другой стороны, несмотря на аналогичную гетерогенность щелочного состояния *сyt c*, представленную наличием двух гем-железных лигандов, Lys73 и Lys79 [31], пероксидазная активность этого состояния ингибируется. По-видимому, координационная связь Lys73 и Lys79 с гемовым железом при щелочном значении pH прочна и ограничена в диссоциации, препятствуя таким образом образованию пента-координированного состояния. Мы проверили прочность этой координационной связи (ей) титрованием *сyt c* до щелочного значения pH в присутствии 8 М мочевины с солями Хофмейстера и без них (рис. 4). Russell и Bren [76] показали, что *сyt c* в присутствии 8 М мочевины существует в трёх (по крайней мере) популяциях, где шестой лиганд свободен либо занят Lys79 или His 33. При титровании до щелочного значения pH равновесие этих популяций, вероятно, смещается в сторону лиганда(ов) Lys. Действительно, мы наблюдали снижение флуоресценции Trp59 при pH 10 в отсутствие солей, что свидетельствует о более компактном состоянии со значением  $pK_a$ , сопоставимым со значениями щелочной изомеризации *сyt c* в присутствии хаотропных солей в отсутствие мочевины.

Компактность такого щелочно-подобного состояния (в 8 М мочеvine) *сyt c*, по-видимому, может модулироваться солями Хофмейстера. В присутствии космотропных сульфатных и фосфатных солей снижение наиболее выражено, в то время как в присутствии хаотропных солей, таких как тиоцианат натрия, щелочной переход не наблюдается (рис. 4, *d*). Это говорит о том, что соли хаотропа дестабилизируют координационную связь в щелочно-подобном состоянии *сyt c* в присутствии 8 М мочевины, в отличие от

Сравнение структурных свойств, аксиального лигирования, спинового состояния, физического и термодинамического, а также активности в нативном (состояние III) и щелочном (состояние IV) состояниях сут *c*

Феррицитохром <i>c</i>	Нативное состояние III	Щелочное состояние IV
Структура	третичный	глобулярная упаковка [69, 102, 103]
	вторичный	глобулярная упаковка [25, 26]
	щель гема	то же, что и нативное состояние III (не повлияло) [16, 18]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• закрытая форма [107]</li> <li>• широкая сеть водородных связей [69, 108, 109]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• закрытая форма [104], более 20% выявленного гема, чем в нативном состоянии [25]</li> <li>• искажение в сети Н-связей между складками Ω-петли (70–85 и 40–57) [15, 83, 110]</li> </ul>
Шестой аксиальный лиганд	Met80 [69, 102, 111]	Lys73/79/72 [21–23, 27, 90, 112–115]
Спиновое состояние гемового железа	низкое [69, 116, 117]	низкое [20, 118]
Восстановительный потенциал	+255 мВ при pH 7 [115, 119–122]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• +120 мВ при pH 10 [27, 123]</li> <li>• на 0,3–0,5 В ниже, чем состояние III [53, 80]</li> </ul>
Стабильность	<ul style="list-style-type: none"> <li>• изотермальная денатурация: ~ 34–35 кДж/моль [124, данная работа]</li> <li>• температурная денатурация: 85,6 ± 0,1 °С (данная работа)</li> <li>• основанное на редокс потенциале состояние III на ~42 кДж/моль более стабильно, чем состояние IV [80]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• изотермальная денатурация: ~ 30 кДж/моль [данная работа]</li> <li>• температурная денатурация: 79,5 ± 0,3 °С [данная работа]</li> </ul>
Пероксидазная активность	низкая пероксидазная активность [7]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• повышенная пероксидазная активность [48, 53, 54]</li> <li>• нет пероксидазной активности [50–52, данная работа]</li> </ul>

космотропных солей, которые оказывают сильное стабилизирующее действие на эту связь. Предполагая, что разные лиганды в щелочно-подобном состоянии обладают разной стабильностью по аналогии с ситуацией при нейтральном значении pH [99], мы попытались определить наиболее стабильный конформер щелочного состояния на основе расстояния между Trp59 и гемовым железом. МД-моделирование показало, что самое короткое расстояние между Trp59 и гемовым железом, соответствующее наиболее компактному состоянию, было получено для Lys79-конформера (~8,9 Å) (рис. 6). Расстояние для нативного состояния с лигандом Met80 составляет ~9,2 Å, а для конформеров Lys72 и Lys73 – это ~9,3 Å. Хотя эти задачи не обязательно должны соответствовать ситуации в случае щелочного состояния, идентификация Lys79, как наиболее стабильного конформера щелочного состояния, согласуется с работой Maity et al. [14]. Работа Nelson и Bowler [29] с изоформой-1 сут *c* также свидетельствует в пользу роли Lys79 как наиболее стабильной щелочной формы сут *c*. Они показали, что из-за структурной близости Lys73 и Lys79 от-

носителем связи железо-Met80 гораздо большее структурное нарушение происходит для гемового лиганда в положении 73, чем для лиганда в положении 79, когда он замещает Met80. Наше МД-моделирование показало, что структурные возмущения во время щелочной изомеризации были связаны с одним специфическим фолдоном Ω-петли (70–85 а.о., красный фолдон) в сочетании с фолдоном Ω-петли (40–57 а.о., черный, называемый также инфракрасным, фолдон), что согласуется с теорией фолдона Englander [100, 101] и работами Oviedo-Rouco et al. [15, 78].

В заключение мы показываем, что образование щелочного состояния цитохрома *c* коррелирует со стабильностью белка и может модулироваться солями Хофмейстера посредством специфического анионного эффекта. Мы пришли к выводу, что конформационная стабильность состояний III и IV сравнима, но, в отличие от состояния III, щелочное состояние не обладает пероксидазной активностью, что указывает на присутствие сильного лиганда, скорее всего, Lys79.

**Финансирование.** Эта работа была поддержана исследовательским грантом, предоставленным Словацким агентством исследований и разработок (грант № APVV-15-0069) и грантовым агентством Министерства образования, науки, исследований и спорта Словацкой Республики (грант № VEGA 2/0009/17). Данная публикация является результатом реализации проекта: Открытое научное сообщество для современных междисциплинарных исследований в медицине (Акроним: OPENMED), ITMS2014 +: 313011V455 при поддержке Интегрированной инфраструктуры операционной программы, финансируемой ЕФРР.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии прямого или потенциального конфликта интересов, связанного с публикацией этой статьи.

**Соблюдение этических норм.** Эта статья не содержит описания исследований, выполненных авторами с участием человека или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 1, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radi, R., Turrens, J. F., and Freeman, B. A. (1991) Cytochrome *c*-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 118-125, doi: 10.1016/0003-9861(91)90172-f.
2. Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Azzariti, A., Marra, E., and Passarella, S. (2000) Cytochrome *c* is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death, *J. Biol. Chem.*, **275**, 37159-37166, doi: 10.1074/jbc.M002361200.
3. Paradies, G., Petrosilio, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F. M. (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transfer chain on the cytochrome *c* oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles, *FEBS Lett.*, **466**, 323-326, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01082-6.
4. Pereverzev, M. O., Vygodina, T. V., Konstantinov, A. A., and Skulachev, V. P. (2003) Cytochrome *c*, an ideal antioxidant, *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1312-1315, doi: 10.1042/bst0311312.
5. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*, *Cell*, **86**, 147-157, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80085-9.
6. Jiang, X., and Wang, X. (2004) Cytochrome *c*-mediated apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 87-106, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706.
7. Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., et al. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 223-232, doi: 10.1038/nchembio727.
8. Chapple, C. E., Robisson, B., Spinelli, L., Guien, C., Becker, E., and Brun, C. (2015) Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network, *Nat. Commun.*, **6**, 7412, doi: 10.1038/ncomms8412.
9. González-Arzola, K., Velázquez-Cruz, A., Guerra-Castellano, A., Casado-Combreras, M. A., Pérez-Mejías, G., et al. (2019) New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome *c* in the cytoplasm and nucleus, *FEBS Lett.*, **593**, 3101-3119, doi: 10.1002/1873-3468.13655.
10. Cherney, M. M., and Bowler, B. E. (2011) Protein dynamics and function: making new strides with an old warhorse, the alkaline transition of cytochrome *c*, *Coord. Chem. Rev.*, **255**, 664-677, doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.014.
11. Hannibal, L., Tomasina, F., Capdevila, D. A., Demicheli, V., Tortora, V., et al. (2016) Alternative conformations of cytochrome *c*: structure, function, and detection, *Biochemistry*, **55**, 407-428, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01385.
12. Schweitzer-Stenner, R. (2018) Relating the multi-functionality of cytochrome *c* to membrane binding and structural conversion, *Biophys. Rev.*, **10**, 1151-1185, doi: 10.1007/s12551-018-0409-4.
13. Milorey, B., Schweitzer-Stenner, R., Kurbaj, R., and Malyshka, D. (2019) pH-induced switch between different modes of cytochrome *c* binding to cardiolipin-containing liposomes, *ACS Omega*, **4**, 1386-14000, doi: 10.1021/acsomega.8b02574.
14. Maity, H., Rumbley, J. N., and Englander, S. W. (2006) Functional role of a protein foldon – an  $\Omega$ -loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome *c*, *Proteins*, **63**, 349-355, doi: 10.1002/prot.20757.
15. Oviedo-Rouco, S., Castro, M. A., Alvarez-Paggi, D., Spedalieri, C., Tortora, V., et al. (2019) The alkaline transition of cytochrome *c* revisited: effects of electrostatic interactions and tyrosine nitration on the reaction dynamics, *Arch. Biochem. Biophys.*, **665**, 96-106, doi: 10.1016/j.abb.2019.02.016.
16. Oellerich, S., Waxckerbarth, H., and Hildebrandt, P. (2002) Spectroscopic characterization of nonnative conformational states of cytochrome *c*, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 6566-6580, doi: 10.1021/jp013841g.
17. Alvarez-Paggi, D., Hannibal, L., Castro, M. A., Oviedo-Rouco, S., Demicheli, V., et al. (2017) Multifunctional cytochrome *c*: learning new tricks from an old dog, *Chem. Rev.*, **117**, 13382-13460, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00257.
18. Milazzo, L., Tognaccini, L., Howes, B. D., and Smulevich, G. (2018) Probing the non-native states of cytochrome *c* with resonance Raman spectroscopy: a tool for investigating the structure-function relationship, *J. Raman. Spectrosc.*, **49**, 1041-1055, doi: 10.1002/jrs.5315.
19. Osheroff, N., Borden, D., Koppenol, W. H., and Margoliash, E. (1980) Electrostatic interactions in cytochrome *c*. The role of interactions between residues 13 and 90 and residues 79 and 47 in stabilizing the heme crevice structure, *J. Biol. Chem.*, **255**, 1689-1697.
20. Moore, G. R., and Pettigrew, G. W. (1990) *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*, Springer-Verlag, New York.
21. Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M. B., Dumont, M. E., and Mauk, A. G. (1998) Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome *c*. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome *c* and the alkaline conformational transition, *Biochemistry*, **37**, 6124-6131, doi: 10.1021/bi972188d.
22. Rosell, F. I., Ferrer, J. C., and Mauk, A. G. (1998) Proton-linked protein-conformational switching: definition of the alkaline conformational transition of yeast iso-1-ferricy-

- tochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11234-11245, doi: 10.1021/ja971756.
23. Döpner, S., Hildebrandt, P., Rosell, F. I., and Mauk, A. G. (1998) Alkaline conformational transitions of ferricytochrome *c* studied by Resonance Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11246-11255, doi: 10.1021/ja9717572.
  24. Krishna, M. M. G., Maity, H., Rumbley, J. N., Lin, Y., and Englander, S. W. (2006) Order of steps in the cytochrome *c* folding pathway: evidence for a sequential stabilization mechanism, *J. Mol. Biol.*, **359**, 1410-1419, doi: 10.1016/j.jmb.2006.04.035.
  25. Assfalg, M., Bertini, I., Dolfi, A., Turano, P., Mauk, A. G., Rosell, F. I., and Gray, H. B. (2003) Structural model for an alkaline form of ferricytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2913-2922, doi: 10.1021/ja027180s.
  26. Amacher, J. F., Zhong, F., Lisi, G. P., Zhu, M. Q., Alden, S. L., et al. (2015) A compact structure of cytochrome *c* trapped in a lysine-ligated state: loop refolding and functional implications of a conformational switch, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 8435-8449, doi: 10.1021/jacs.5b01493.
  27. Davis, L. A., Schejter, A., and Hess, G. P. (1974) Alkaline isomerization of oxidized cytochrome *c*. Equilibrium and kinetic measurements, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2624-2632.
  28. Gadsby, P. M., Peterson, J., Foote, N., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1987) Identification of ligand-exchange process in the alkaline transition of horse cytochrome *c*, *Biochem. J.*, **246**, 43-54, doi: 10.1042/bj2460043.
  29. Nelson, C. J., and Bowler, B. E. (2000) pH dependence of formation of a partially unfolded state of a Lys 73 → His variant of iso-1-cytochrome *c*: implications for the alkaline conformational transition of cytochrome *c*, *Biochemistry*, **39**, 13584-13594, doi: 10.1021/bi0017778.
  30. Hoang, L., Maity, H., Krishna, M. M. G., Lin, Y., and Englander, S. W. (2003) Folding units govern the cytochrome *c* alkaline transition, *J. Mol. Biol.*, **331**, 37-43, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00698-3.
  31. Weinkam, P., Zimmermann, J., Sagle, L. B., Matsuda, S., Dawson, P. E., Wolynes, P. G., and Romesberg, F. E. (2008) Characterization of alkaline transitions in ferricytochrome *c* using carbon-deuterium infrared probes, *Biochemistry*, **47**, 13470-13480, doi: 10.1021/bi801223n.
  32. Hartshorn, R. T., and Moore, G. R. (1989) A denaturation-induced proton-uptake study of horse cytochrome *c*, *Biochem. J.*, **258**, 595-598, doi: 10.1042/bj2580595.
  33. Rosell, F. I., Harris, T. R., Hildebrand, D. P., Döpner, S., Hildebrandt, P., and Mauk, A. G. (2000) Characterization of an alkaline transition intermediate stabilized in the Phe82Trp variant of yeast iso-1-cytochrome *c*, *Biochemistry*, **39**, 9047-9054, doi: 10.1021/bi001095k.
  34. Silkstone, G. G., Cooper, C. E., Svistunenko, D., and Wilson, M. T. (2005) EPR and optical spectroscopic studies of Met80X mutants of yeast ferricytochrome *c*. Models for inter-mediate in the alkaline transition, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 92-99, doi: 10.1021/ja045719b.
  35. Verbaro, D., Hagarman, A., Soffer, J., and Schweitzer-Stenner, R. (2009) The pH dependence of the 695 nm charge transfer band reveals the population of an intermediate state of the alkaline transition of ferricytochrome *c* at low ion concentrations, *Biochemistry*, **48**, 2990-2996, doi: 10.1021/bi802208f.
  36. Bai, Y., Sosnick, T. R., Mayne, L., and Englander, S. W. (1995) Protein folding intermediates: native state hydrogen exchange, *Science*, **269**, 192-197, doi: 10.1126/science.7618079.
  37. Godbole, S., and Bowler, B. E. (1999) Effect of pH on formation of a native-like intermediate on the unfolding pathway of a Lys 73→His variant of yeast iso-1-cytochrome *c*, *Biochemistry*, **38**, 487-495, doi: 10.1021/bi981698k.
  38. Nelson, C. J., LaConte, M. J., and Bowler, B. E. (2001) Direct detection of heat and cold denaturation for partial unfolding of a protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7453-7454, doi: 10.1021/ja016144a.
  39. Weber, C., Michael, B., and Bosshard, H. R. (1987) Spectroscopic analysis of the cytochrome *c* oxidase-cytochrome *c* complex: circular dichroism and magnetic circular dichroism measurements reveal change of cytochrome *c* heme geometry imposed by complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6687-669, doi: 10.1073/pnas.84.19.6687.
  40. Jemmerson, R., Liu, J., Hausauer, D., Lam, K. P., Mondino, A., and Nelson, R. D. (1999) A conformational change in cytochrome *c* of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles, *Biochemistry*, **38**, 3599-3609, doi: 10.1021/bi9809268.
  41. Abriata, L. A., Cassina, A., Tortora, V., Marin, M., Souza, J. M., et al. (2009) Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome *c* triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies, *J. Biol. Chem.*, **284**, 17-26, doi: 10.1074/jbc.M807203200.
  42. Santucci, R., Sinibaldi, F., Patriarca, A., Santucci, D., and Fiorucci, L. (2010) Misfolded proteins and neurodegeneration: role of non-native cytochrome *c* in cell death, *Expert Rev. Proteomics*, **7**, 507-5017, doi: 10.1586/epr.10.50.
  43. Josephs, T. M., Liptak, M. D., Hughes, G., Lo, A., Smith, R. M., et al. (2013) Conformational change and human cytochrome *c* function: mutation of residue 41 modulates caspase activation and destabilizes Met-80 coordination, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **18**, 289-297, doi: 10.1007/s00775-012-0973-1.
  44. Liptak, M. D., Fagerlund, R. D., Ledgerwood, E. C., Wilbanks, S. M., and Bren, K. L. (2011) The proapoptotic G41S mutation to human cytochrome *c* alters the heme electronic structure and increases the electron self-exchange rate, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1153-1155, doi: 10.1021/ja106328k.
  45. Karsisiotis, A. I., Deacon, O. M., Wilson, M. T., Macdonald, C., Blumenschein, T. M. A., et al. (2016) Increased dynamics in the 40-57 Ω-loop of the G41S variant of human cytochrome *c* promote its pro-apoptotic conformation, *Sci. Rep.*, **6**, 30447, doi: 10.1038/srep30447.
  46. De Rocco, D., Cerqua, C., Goffrini, P., Russo, G., Pastore, A., et al. (2014) Mutations of cytochrome *c* identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 269-274, doi: 10.1016/j.bbdis.2013.12.002.
  47. Garcia-Heredia, J. M., Diaz-Quintana, A., Salzano, M., Orzaez, M., Perez-Paya, E., et al. (2011) Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome *c* behave as an ant-apoptotic switch, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**, 1155-1168, doi: 10.1007/s00775-011-0804-9.
  48. Capdevila, D., Alvarez-Paggi, D., Castro, M., Tortora, V., Demicheli, V., et al. (2014) Coupling of tyrosine deprotonation and axial ligand exchange in nitrocytochrome *c*, *Chem. Commun.*, **50**, 2592-2594, doi: 10.1039/c3cc47207h.
  49. Josephs, T. M., Morison, I. M., Day, C. L., Wilbanks, S. M., and Ledgerwood, E. C. (2014) Enhancing the peroxidase activity of cytochrome *c* by mutation of residue 41: implications for peroxidase mechanism any cytochrome *c* release, *Biochem. J.*, **458**, 259-265, doi: 10.1042/BJ20131386.
  50. Diederix, R. E., Ubbink, M., and Canters, G. W. (2001) The peroxidase activity of cytochrome *c*-550 from *Paracoccus versutus*, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4207-4216, doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02335.x.

51. Diederix, R. E., Ubbink, M., and Canters, G. W. (2002) Peroxidase activity as a tool for studying the folding of *c*-type cytochromes, *Biochemistry*, **41**, 13067-13077, doi: 10.1021/bi0260841.
52. McClelland, L. J., Mou, T.-Ch., Jeakins-Cooley, M. E., Sprang, S. R., and Bowler, B. E. (2014) Structure of mitochondrial cytochrome *c* conformer competent for peroxidase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6648-6653, doi: 10.1073/pnas.1323828111.
53. Battistuzzi, G., Borsari, M., Sola, M., and Francia, F. (1997) Redox thermodynamics of the native and alkaline forms of eukaryotic and bacterial class I cytochrome *c*, *Biochemistry*, **36**, 16247-16258, doi: 10.1021/bi971535g.
54. Millo, D., Bonifacio, A., Raineri, A., Borsari, M., Gooijer, C., and Van Der Zwan, G. (2007) pH-induced changes in absorbed cytochrome *c*. Voltammetric and surface-enhanced resonance Raman characterization performed simultaneously at chemically modified silver electrodes, *Langmuir*, **23**, 9898-9904, doi: 10.1021/la701751r.
55. Capdevila, D. A., Oviedo Rouco, S., Tomasina, F., Torora, V., Demicheli, V., et al. (2015) Active site structure and peroxidase activity of oxidatively modified cytochrome *c* species in complexes with cardiolipin, *Biochemistry*, **54**, 7491-7504, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00922.
56. Deacon, O. M., Karsisiotis, A. I., Moreno-Chicano, T., Hough, M. A., Macdonald, C., et al. (2017) Heightened dynamics of the oxidized Y48H variant of human cytochrome *c* increases its peroxidatic activity, *Biochemistry*, **56**, 6111-6124, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00890.
57. Tomášková, N., Varhač, R., Lysáková, V., Musatov, A., and Sedlák, E. (2018) Peroxidase activity of cytochrome *c* in its compact state depends on dynamics of the heme region, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1866**, 1073-1083, doi: 10.1016/j.bbapap.2018.09.003.
58. Žoldák, G., Sprinzl, M., and Sedlák, E. (2004) Modulation of activity of NADH oxidase from *Thermus thermophilus* through change in flexibility in the enzyme active site induced by Hofmeister series anions, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 48-57, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03900.x.
59. Dér, A., Kelemen, L., Fábrián, L., Taneva, S. G., Fodor, E., et al. (2007) Interfacial water structure controls protein conformation, *J. Phys. Chem. B.*, **111**, 5344-5350, doi: 10.1021/jp066206p.
60. Varhač, R., Tomášková, N., Fábrián, M., and Sedlák, E. (2009) Kinetics of cyanide binding as a probe of local stability/flexibility of cytochrome *c*, *Biophys. Chem.*, **144**, 21-26, doi: 10.1016/j.bpc.2009.06.001.
61. Bogár, F., Bartha, F., Násztor, Z., Fábrián, L., Leitgeb, B., and Dér, A. (2014) On the Hofmeister effect: fluctuations at the protein-water interface and the surface tension, *J. Phys. Chem. B.*, **118**, 8496-8504, doi: 10.1021/jp502505c.
62. Tomášková, N., Varhač, R., Žoldák, G., Olekšáková, L., Sedláková, D., and Sedlák, E. (2007) Conformational stability and dynamics of cytochrome *c* affect its alkaline isomerization, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 257-266, doi: 10.1007/s00775-006-0183-9.
63. Garajová, K., Balogová, A., Dušeková, E., Sedláková, D., Sedlák, E., and Varhač, R. (2017) Correlation of lysozyme activity and stability in the presence of Hofmeister series anions, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 281-288, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.11.016.
64. Dušeková, E., Garajová, K., Yavaşer, R., Varhač, R., and Sedlák, E. (2018) Hofmeister effect on catalytic properties of chymotrypsin is substrate-dependent, *Biophys. Chem.*, **243**, 8-16, doi: 10.1016/j.bpc.2018.10.002.
65. Lemon, H. W. (1947) The effect of alkali on the ultraviolet absorption spectra of hydroxyaldehydes, hydroxyketones, and other phenolic compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2998-3000, doi: 10.1021/ja01204a018.
66. Myers, J. K., Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1995) Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.*, **4**, 2138-2148.
67. Santoro, M. M., and Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants, *Biochemistry*, **27**, 8063-8068, doi: 10.1021/bi00421a014.
68. URL: <https://www.3ds.com/products-services/biovia/> (Dassault Systems BIOVIA; Discovery Studio Client; San Diego, USA (2020) Dassault Systems BIOVIA; Discovery Studio 2020 Client; San Diego, USA.)
69. Bushnell, G. W., Louie, G. V., and Brayer, G. D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*, *J. Mol. Biol.*, **214**, 585-595, doi: 10.1016/0022-2836(90)90200-6.
70. Bowers, K. J., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., Shaw, D. E., et al. (2006) Molecular dynamics – Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters, *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing – SC '06*, ACM Press.
71. Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., and Straatsma, T. P. (1987) The missing term in effective pair potentials, *J. Phys. Chem.*, **91**, 6269-6271, doi: 10.1021/j100308a038.
72. Jorgensen, W. L., and Tirado-Rives, J. (1988) The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1657-1666, doi: 10.1021/ja00214a001.
73. Jorgensen, W. L., Tirado-Rives, J. (2005) Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6665-6670, doi: 10.1073/pnas.0408037102.
74. Masood, T. B., Sandhya, S., Chandra, N., and Natarajan, V. (2015) CHEXVIS: a tool for molecular channel extraction and visualization, *BMC Bioinformatics*, **16**, 119.
75. Baldwin, R. L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.*, **71**, 2056-2063, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79404-3.
76. Russell, B. S., and Bren, K. L. (2002) Denaturant dependence of equilibrium unfolding intermediates and denatured state structure of horse ferricytochrome *c*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 909-916, doi: 10.1007/s00775-002-0381-z.
77. Tsong, T. Y. (1974) The Trp-59 fluorescence of ferricytochrome *c* as a sensitive measure of the over-all protein conformation, *J. Biol. Chem.*, **249**, 1988-1990.
78. Oviedo-Rouco, S., Perez-Bertoldi, J. M., Spedaliere, C., Castro, M. A., Tomasina, F., et al. (2020) Electron transfer and conformational transitions of cytochrome *c* are modulated by the same dynamical features, *Arch. Biochem. Biophys.*, **680**, 108243, doi: 10.1016/j.abb.2019.108243.
79. Theorell, H., and Åkesson, Å. (1941) Studies on cytochrome *c*. II. The optical properties of pure cytochrome *c* and some of its derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1804-1811, doi: 10.1021/ja01852a005.
80. Barker, P. D., and Mauk, A. G. (1992) pH-Linked conformational regulation of a metalloprotein oxidation-reduction equilibrium: electrochemical analysis of the alkaline form of cytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3619-3624, doi: 10.1021/ja00036a006.
81. Lambeth, D. O., Campbell, K. L., Zand, R., and Palmer, G. (1973) The appearance of transient species of cytochrome *c* upon rapid oxidation or reduction at alkaline pH, *J. Biol. Chem.*, **248**, 8130-8136.
82. Deacon, O. M., White, R. W., Moore, G. R., Wilson, M. T., and Worrall, J. A. R. (2020) Comparison of the

- structural dynamic and mitochondrial electron-transfer properties of the proapoptotic human cytochrome *c* variants, G41S, Y48H and A51V, *J. Inorg. Biochem.*, **203**, 110924, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110924.
83. Deacon, O. M., Svistusenko, D. A., Moore, G. R., Wilson, M. T., and Worrall, J. A. R. (2018) Naturally occurring disease-related mutations in the 40-57  $\Omega$ -loop of human cytochrome *c* control triggering of the alkaline isomerization, *Biochemistry*, **57**, 4276-4288, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00520.
84. Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Moreno-Beltrán, B., López-Prados, J., Nieto, P. M., et al. (2015) Mimicking tyrosine phosphorylation in human cytochrome *c* by the evolved tRNA synthetase technique, *Chemistry*, **21**, 15004-15012, doi: 10.1002/chem.201502019.
85. Tsai, M. Y., Morozov, A. N., Chu, K. Y., and Lin, S. H. (2009) Molecular dynamics insight into the role of tertiary (foldon) interactions on unfolding in cytochrome *c*, *Chem. Phys. Lett.*, **475**, 111-115, doi: 10.1016/j.cplett.2009.05.027.
86. George, P., and Tsou, C. L. (1952) Reaction between hydrocyanic acid, cyanide ion and ferricytochrome *c*, *Biochem. J.*, **50**, 440-448, doi: 10.1042/bj0500440.
87. Sutin, N., and Yandell, J. K. (1972) Mechanisms of the reactions of cytochrome *c*. Rate and equilibrium constants for ligand binding to horse heart ferricytochrome *c*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6932-6936.
88. Dumortier, C., Meyer, T. E., and Cusanovich, M. A. (1999) Protein dynamics: imidazole binding to class I C-type cytochromes, *Arch Biochem Biophys.*, **371**, 142-148, doi: 10.1006/abbi.1999.1440.
89. Tomášková, N., Varinská, L., and Sedlák, E. (2010) Rate of oxidative modification of cytochrome *c* by hydrogen peroxide is modulated by Hofmeister anions, *Gen. Physiol. Biophys.*, **29**, 254-264, doi: 10.4149/gpb\_2010\_03\_255.
90. Pearce, L. L., Gärtner, A. L., Smith, M., and Mauk, A. G. (1989) Mutation-induced perturbation of the cytochrome *c* alkaline transition, *Biochemistry*, **28**, 3152-3156, doi: 10.1021/bi00434a006.
91. Nall, B. T., Zuniga, E. H., White, T. B., Wood, L. C., and Ramdas, L. (1989) Replacement of a conserved proline and the alkaline conformational change in iso-2-cytochrome *c*, *Biochemistry*, **28**, 9834-9839, doi: 10.1021/bi00451a043.
92. Sinibaldi, F., Piro, M. C., Howes, B. D., Smulevich, G., Ascoli, F., and Santucci, R. (2003) Rupture of the hydrogen bond linking two Omega-loops induces the molten globule state at neutral pH in cytochrome *c*, *Biochemistry*, **42**, 7604-7610, doi: 10.1021/bi034132r.
93. Baddam, S., and Bowler, B. E. (2006) Mutation of asparagine 52 to glycine promotes the alkaline form of iso-1-cytochrome *c* and causes loss of cooperativity in acid unfolding, *Biochemistry*, **45**, 4611-4619, doi: 10.1021/bi0524971.
94. Taler, G., Schejter, A., Navon, G., Vig, I., and Margoliash, E. (1995) The nature of the thermal equilibrium affecting the iron coordination of ferric cytochrome *c*, *Biochemistry*, **34**, 14209-14212, doi: 10.1021/bi00043a027.
95. Banci, L., Bertini, I., Spyroulias, G. A., and Turano, P. (1998) The conformational flexibility of oxidized cytochrome *c* studied through its interaction with NH<sub>3</sub> and at high temperatures, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1998**, 583-591.
96. Varhač, R., Sedláková, D., Stupák, M., and Sedlák, E. (2015) Non-two-state thermal denaturation of ferricytochrome *c* at neutral and slightly acidic pH values, *Biophys. Chem.*, **203-204**, 41-50, doi: 10.1016/j.bpc.2015.05.002.
97. Dragomir, I., Hagarman, A., Wallace, C., and Schweitzer-Stenner, R. (2007) Optical band splitting and electronic perturbations of the heme chromophore in cytochrome *C* at room temperature probed by visible electronic circular dichroism spectroscopy, *Biophys. J.*, **92**, 989-998, doi: 10.1529/biophysj.106.095976.
98. Shah, R., and Schweitzer-Stenner, R. (2008) Structural changes of horse heart ferricytochrome *c* induced by changes of ionic strength and anion binding, *Biochemistry*, **47**, 5250-5257, doi: 10.1021/bi702492n.
99. Schweitzer-Stenner, R., Shah, R., Hagarman, A., and Dragomir, I. (2007) Conformational substates of horse heart cytochrome *c* exhibit different thermal unfolding of the heme cavity, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 9603-9607, doi: 10.1021/jp069022j.
100. Maity, H., Maity, M., and Englander, S. W. (2004) How cytochrome *c* folds, and why: submolecular foldon units and their stepwise sequential stabilization, *J. Mol. Biol.*, **343**, 223-233, doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.005.
101. Hu, W., Kan, Z. Y., Mayne, L., and Englander, S. W. (2016) Cytochrome *c* folds through foldon-dependent native-like intermediates in an ordered pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3809-3814, doi: 10.1073/pnas.1522674113.
102. Dickerson, R. E., Takano, T., Eiseberg, D., Kallai, O. B., Samson, L., Cooper, A., and Margoliash, E. (1971) Ferricytochrome *c*. I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1511-1535.
103. Louie, G. V., Hutcheon, W. L., and Brayer, G. D. (1988) Yeast iso-1-cytochrome *c*. A 2.8 Å resolution three-dimensional structure determination, *J. Mol. Biol.*, **199**, 295-314, doi: 10.1016/0022-2836(88)90315-4.
104. Levin, Ö. (1963) Electron micrographs of bovine cytochrome *c*, *J. Mol. Biol.*, **6**, 137-140, doi: 10.1016/S0022-2836(63)80129-1.
105. Margoliash, E., Needleman, S. B., and Stewart, J. W. (1963) A comparison of the amino acid sequences of the cytochrome *c* of several vertebrates, *Acta Chem. Scand.*, **17**, S250-S256.
106. Zand, R., and Vinogradov, S. (1968) Circular Dichroism Studies II. The far ultraviolet circular dichroism of cytochrome *c*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 94-97, doi: 10.1016/0003-9861(68)90642-5.
107. Margoliash, E., Schejter, A. (1966) Cytochrome *c*, *Adv. Protein Chem.*, **21**, 113-286, doi: 10.1016/s0065-3233(08)60128-x.
108. Takano, T., and Dickerson, R. E. (1981) Conformation change of cytochrome *c*. I. Ferricytochrome *c* refinement at 1.8 Å and comparison with the ferrocyclochrome structure, *J. Mol. Biol.*, **153**, 95-115, doi: 10.1016/0022-2836(81)90529-5.
109. Berghuis, A. M., and Brayer, G. D. (1992) Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome *c*, *J. Mol. Biol.*, **223**, 959-976, doi: 10.1016/0022-2836(92)90255-i.
110. Lei, H., Bowler, B. E. (2019) Naturally occurring A51V variant of human cytochrome *c* destabilizes the native state and enhances peroxidase activity, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 8939-8953, doi: 10.1021/acs.jpbc.9b05869.
111. Harbury, H. A., Cronin, J. R., Fanger, M. W., Hettlinger, T. P., Murphy, A. J., et al. (1965) Complex formation between methionine and a heme peptide from cytochrome *c*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1658-1664, doi: 10.1073/pnas.54.6.1658.
112. Wilgus, H., and Stellwagen, E. (1974) Alkaline isomerization of ferricytochrome *c*: identification of the lysine ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2892-2894, doi: 10.1073/pnas.71.7.2892.
113. Brautigan, D. L., Feinberg, B. A., Hoffman, B. M., Margoliash, E., Preisach, J., and Blumberg, W. E. (1977) Multiple low spin forms of the cytochrome *c* ferrihe-

- mochrome. EPR spectra of various eukaryotic and prokaryotic cytochromes *c*, *J. Biol. Chem.*, **252**, 574-582.
114. Ferrer, J. C., Guillemette, J. G., Bogumil, R., Inglis, S. C., Smith, M., and Mauk, A. G. (1993) Identification of Lys79 as an iron ligand in one form of alkaline state yeast iso-1-cytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7507-7508, doi: 10.1021/ja00069a062.
  115. Moore, G. R., and Williams, R. J. P. (1977) Structural basis for the variation in redox potential of cytochromes, *FEBS Lett.*, **79**, 229-232, doi: 10.1016/0014-5793(77)80793-x.
  116. Eaton, W. A., and Hochstrasser, R. M. (1967) Electric spectrum of single crystals of ferricytochrome *c*, *J. Chem. Phys.*, **46**, 2533-2539, doi: 10.1063/1.1841081.
  117. Pettigrew, G. W., and Moore, G. R. (1987) *Cytochromes c Biological Aspects*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-72698-9.
  118. Brandt, K. G., Parks, P. C., Czerlinski, G. H., and Hess, G. P. (1966) On the elucidation of the pH dependence of the oxidation-reduction potential of cytochrome *c* at alkaline pH, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4180-4185.
  119. Paul, K. G. (1947) Oxidation-reduction potential of cytochrome *c*, *Arch. Biochem.*, **12**, 441-450.
  120. Henderson, R. W., and Rawlinson, W. A. (1956) Oxidation-reduction potential of modified cytochrome *c*, *Nature*, **177**, 1180-1181, doi: 10.1038/1771180b0.
  121. Theodorakis, J. L., Garber, E. A., McCracken, J., Peisach, J., Schejter, A., and Margoliash, E. (1995) A chemical modification of cytochrome-*c* lysines leading to changes in heme iron ligation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 103-113, doi: 10.1016/0167-4838(95)00097-e.
  122. Lemberg, R., and Barrett, J. (1973) *Cytochromes*, Academic Press, New York.
  123. Rodkey, F. L., and Ball, E. G. (1950) Oxidation-reduction potentials of the cytochrome *c* system, *J. Biol. Chem.*, **182**, 17-28.
  124. Shejter, A., Luntz, T. L., Koshy, T. I., and Margoliash, E. (1992) Relationship between local and global stabilities of proteins: site-directed mutants and chemically-modified derivatives of cytochrome *c*, *Biochemistry*, **31**, 8336-8343, doi: 10.1021/bi00150a030.

## ANIONS SPECIFIC EFFECTS ON ALKALINE STATE OF CYTOCHROME *c*

E. Sedlák<sup>1,2</sup>, T. Kožár<sup>2</sup>, R. Varhač<sup>1</sup>, A. Musatov<sup>3</sup>, and N. Tomášková<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia; E-mail: natasa.tomaskova@upjs.sk

<sup>2</sup> Centre for Interdisciplinary Biosciences, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia

<sup>3</sup> Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, 04001 Košice, Slovakia

Specific effects of anions on the structure, thermal stability, and peroxidase activity of native (state III) and alkaline (state IV) cytochrome *c* (cyt *c*) have been studied by the UV-VIS absorbance spectroscopy, intrinsic tryptophan fluorescence, and circular dichroism. Thermal and isothermal denaturation monitored by the tryptophan fluorescence and circular dichroism, respectively, implied lower stability of cyt *c* state IV in comparison with the state III. The p*K*<sub>a</sub> value of alkaline isomerization of cyt *c* depended on the present salts, i.e., kosmotropic anions increased and chaotropic anions decreased p*K*<sub>a</sub> (Hofmeister effect on protein stability). The peroxidase activity of cyt *c* in the state III, measured by oxidation of guaiacol, showed clear dependence on the salt position in the Hofmeister series, while cyt *c* in the alkaline state lacked the peroxidase activity regardless of the type of anions present in the solution. The alkaline isomerization of cyt *c* in the presence of 8 M urea, measured by Trp59 fluorescence, implied an existence of a high-affinity non-native ligand for the heme iron even in a partially denatured protein conformation. The conformation of the cyt *c* alkaline state in 8 M urea was considerably modulated by the specific effect of anions. Based on the Trp59 fluorescence quenching upon titration to alkaline pH in 8 M urea and molecular dynamics simulation, we hypothesize that the Lys79 conformer is most likely the predominant alkaline conformer of cyt *c*. The high affinity of the sixth ligand for the heme iron is likely a reason of the lack of peroxidase activity of cyt *c* in the alkaline state.

**Keywords:** alkaline isomerization, Hofmeister anions, pseudo-peroxidase activity