



УДК 577.112

РАЗРАБОТКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ НЕЙРОГЛОБИНА И ЦИТОХРОМА С В МЕЧЕННОЙ СТАБИЛЬНЫМИ ИЗОТОПАМИ $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ФОРМЕ

© 2025 г. М. А. Семенова*, О. М. Смирнова*, В. В. Бритиков**, Е. В. Бритикова**,
А. П. Ходненко*, Я. В. Бершацкий*, А. А. Игнатова*, Э. В. Бочаров*, ***,
М. П. Кирпичников*, ****, Д. А. Долгих*, ****, Р. В. Черткова*, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ГНУ “Институт биоорганической химии НАН Беларусь”,
Беларусь, 220084 Минск, ул. Академика Купревича, 5/2

*** Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский переулок, 9

**** МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 02.06.2025 г.

После доработки 16.06.2025 г.

Принята к публикации 17.06.2025 г.

Разработана эффективная система продукции изотопно-меченых гемсодержащих белков нейроглобина и цитохрома с человека. Получены соответствующие штаммы-продуценты, подобраны оптимальные условия культивирования: температура и продолжительность инкубации, состав сред, концентрация индуктора экспрессии. С помощью КД-спектроскопии в дальней и ближней УФ-видимой областях показано, что состав вторичной структуры ^{15}N -нейроглобина близок к расчетному, а ориентация гема в молекулах преимущественно каноническая. Согласно двумерным $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC спектрам ЯМР нейроглобина и цитохрома с человека, белки свернуты в нативную конформацию с преобладанием α -спиральной структуры. Полученная система продукции может быть использована для наработки высокоочищенных препаратов totally $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -меченых белков для проведения структурно-динамических исследований с использованием современных методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

Ключевые слова: нейроглобин, цитохром с, ЯМР, гемсодержащие белки, рекомбинантные белки

DOI: 10.31857/S0132342325050159

ВВЕДЕНИЕ

Гемсодержащие белки – это группа металлопротеинов, к которой относятся структурно, функционально и филогенетически далекие представители, при этом их объединяет наличие простетической группы, а именно гема [1–4]. Биологические функции гемсодержащих белков в большинстве своем основаны на реакционной активности гемовой группы [4, 5]. Так, гем-

содержащие белки принимают участие в реакциях переноса электрона (цитохромы), катализитических реакциях (монооксигеназы), а также выполняют функцию депонирования и транспорта кислорода (гемоглобин и миоглобин) и некоторые другие [4, 5].

Нейроглобин (Ngb) – гемсодержащий белок из семейства глобинов, был обнаружен в нейрональных тканях позвоночных в 2000 г. [6]. Для

Сокращения: δ -ALA – δ -аминолевулиновая кислота; HSQC – гетероядерная корреляция через одно-квантовую когерентность (heteronuclear single quantum coherence experiment); Ngb – нейроглобин; Cyt c – цитохром с; КД-круговой дихроизм.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 772-86-54; эл. почта: cherita@inbox.ru).

Ngb была показана нейропротекторная функция как *in vitro*, так и *in vivo*, однако молекулярные механизмы реализации данной функции на настоящий момент все еще выступают предметом изучения [7–10]. Одним из возможных механизмов считается редокс-взаимодействие Ngb с цитохромом *c* (Cyt *c*) [11–13]. Cyt *c* – гемсодержащий белок, выполняющий функцию переносчика электронов от комплекса III к комплексу IV в дыхательной цепи митохондрий. В ряде патологических состояний, таких как метаболические стрессы, повреждение ДНК, нарушение фолдинга клеточных белков, Cyt *c* способен инициировать запрограммированную гибель клетки после выхода из межмембранных пространства митохондрий в цитозоль [14, 15]. При этом в процессе инициации ключевую роль играет редокс-состояние белка: известно, что в формировании апоптосомы Cyt *c* участвует только в окисленной форме. Таким образом, в результате восстановления Cyt *c* при взаимодействии с Ngb, он утрачивает свою проапоптотическую активность, что приводит к блокировке инициации апоптоза и выживанию клетки [11–13].

Ngb и Cyt *c* представляют собой небольшие α -спиральные мономерные белки, 151 и 104 аминокислотных остатка (а.о.), соответственно [6, 14]. Для обоих белков характерно гексакоординированное состояние гемового железа, т.е. пятое и шестое аксиальные координационные положения заняты а.о. [14, 16]. Считается, что гексакоординация – эволюционно более ранний вариант, а пентакоординация возникла позже [17]. Кроме того, аминокислотные последовательности Ngb и Cyt *c* отличаются высокой консервативностью [10, 15]. Небольшие гидродинамические размеры и высокая водорастворимость этих гемсодержащих белков делают их удобными объектами для исследований методами ЯМР-спектроскопии при условии введения ^{13}C / ^{15}N -изотопных меток. Стоит отметить, что понимание динамических характеристик полипептидной цепи белков в растворе важно для полного раскрытия механизмов их взаимодействий. В процесс переноса электрона значительный вклад могут вносить изменения динамических характеристик белка, индуцируемые комплексообразованием, например, такие как локальная подвижность основной цепи. При изменении локальной подвижности возникает дополнительный вклад в свободную энергию взаимодействия от изменения конформационной энтропии [18, 19]. Исследование редокс-взаимодействия Ngb и Cyt *c* несомненно актуально, поскольку на настоящий момент как изменение

структуры и динамических характеристик при комплексообразовании, так и интерфейс белок-белкового взаимодействия неизвестны [20]. Вместе с тем, методами молекулярного docking [13, 21, 22], молекулярной динамики [23] и с помощью системы предсказания пространственной структуры белка на основе искусственного интеллекта (AlphaFold2) [24] (рис. 1) получен ряд согласующихся между собой моделей комплекса Ngb-Cyt *c*. Ранее мы исследовали механизм окислительно-восстановительного взаимодействия Ngb и Cyt *c* с использованием метода спектроскопии комбинационного рассеяния, благодаря которому удалось детально изучить конформационные изменения гемовых групп, происходящие при взаимодействии данных белков [25]. Понимание молекулярного механизма взаимодействия Ngb и Cyt *c* откроет новые перспективы применения форм Ngb в качестве основы рационального конструирования препаратов для терапии нейродегенеративных заболеваний, инсультов, ишемий и прочих патологических состояний, ассоциированных с гибеллю нейрональных клеток [20].

В связи с этим, необходима эффективная система продукции изотопно-меченых гемсодержащих Ngb и Cyt *c* для последующих исследований методами ЯМР-спектроскопии. При этом важно, чтобы такая система позволяла получать рекомбинантные белки в виде нативной холоформы, для последующего обеспечения эффективного процесса переноса электрона между гемовыми группами [20].

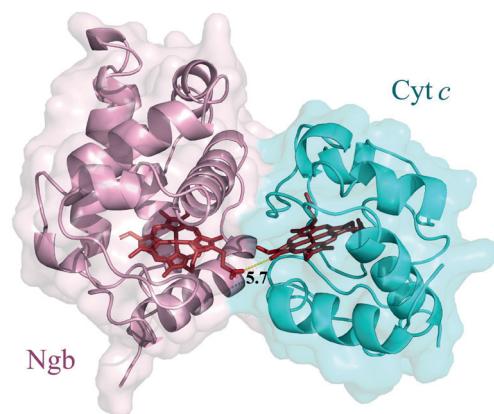


Рис. 1. Модель реакционного комплекса Ngb-Cyt *c*, полученная с помощью ColabFold v1.5.5: AlphaFold2, pLDDT = 92.9, pTM = 0.833, ipTM = 0.701. Для визуализации модели использовали программу PyMOL. Отмечено наименьшее расстояние между гемами Ngb и Cyt *c* в ангстремах (5.7 Å).

Цель настоящей работы – разработка высокоэффективной системы продукции изотопно-меченых гемсодержащих белков Ngb и Cyt c человека в виде водорастворимой холоформы в количествах, достаточных для структурно-динамических исследований методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система продукции изотопно-меченых гемсодержащих белков. Протокол экспрессии Ngb и Cyt c в бактериальной системе *Escherichia coli* на минимальной среде M9 был разработан на

основе литературных данных (по методу Марлей [26], с некоторыми модификациями) [26–29]. Схема биосинтеза предполагает культивирование клеток на богатой среде с последующим переносом культуры на минимальную среду. В ходе подбора условий протестированы различные штаммы *E.coli*: SHuffle T7, JM-109, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, в результате чего штамм BL21(DE3) был выбран как оптимальный (табл. 1, рис. 2a,b). Были подобраны оптимальные условия культивирования на каждом из этапов (богатая среда/минимальная среда) (табл. 1). При использовании питательных сред TB и SB на стадии подращивания рост бактериальной куль-

Таблица 1. Условия биосинтеза изотопно-меченых Ngb и Cyt c

Параметры штамма и среды	Ngb	Cyt c
Штамм-продуцент <i>E. coli</i>	BL21(DE3)	BL21(DE3)
Подращивание на богатой среде	18 ч + 8 ч, 37°C, 180 об/мин	18 ч, 37°C, 250 об/мин
Экспрессия на минимальной среде	28°C, 220 об/мин, 16 ч	37°C, 220 об/мин, 24 ч
Концентрация δ-ALA	0.8 мМ	0.5 мМ
Концентрация глюкозы	2 г/л	4 г/л
Концентрация хлорида аммония	0.6 г/л	0.6 г/л
Концентрация ИПТГ	0.15 мМ	0.15 мМ

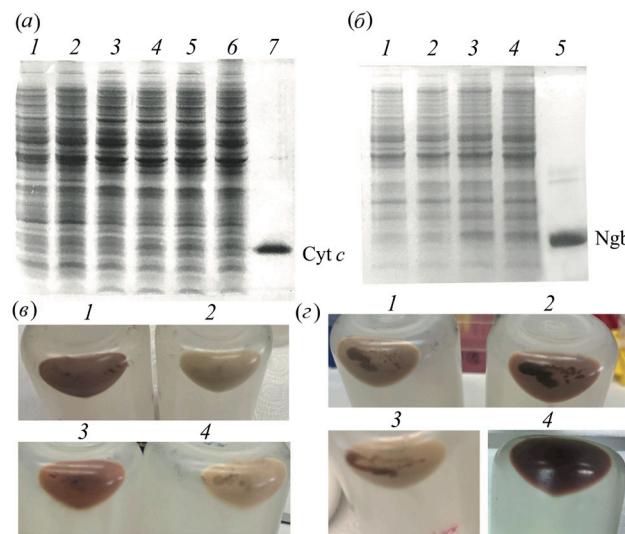


Рис. 2. Подбор оптимальных условий культивирования гемсодержащих белков на минимальной среде. Электрофоретический анализ в 12% Трис-трицин SDS-ПААГ клеточного белка после экспрессии на M9: (a) – Cyt c (1 – клетки JM-109, 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ δ-ALA; 2 – клетки JM-109, 1 мМ δ-ALA; 3 – клетки BL21(DE3), 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ δ-ALA; 4 – клетки BL21(DE3), 0.1 мМ δ-ALA; 5 – клетки BL21(DE3), 0.5 мМ δ-ALA; 6 – клетки BL21(DE3), 1 мМ δ-ALA; 7 – Cyt c); (b) – Ngb (1 – клетки BL21(DE3), 0.15 мМ ИПТГ, 2 г/л глюкозы; 2 – клетки BL21(DE3), 0.3 мМ ИПТГ, 2 г/л глюкозы; 3 – клетки BL21(DE3), 0.3 мМ ИПТГ, 4 г/л глюкозы; 4 – клетки BL21(DE3), 0.15 мМ ИПТГ, 4 г/л глюкозы; 5 – Ngb). Клеточные осадки после экспрессии на M9: (c) – Cyt c (1 – BL21(DE3), 1 мМ δ-ALA; 2 – BL21(DE3), 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ δ-ALA; 3 – JM-109, 1 мМ δ-ALA; 4 – JM-109, 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ δ-ALA); (d) – Ngb (1 – BL21(DE3), 0.25 мМ δ-ALA; 2 – BL21(DE3), 0.5 мМ δ-ALA; 3 – BL21(DE3), 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ δ-ALA; 4 – BL21(DE3), 0.8 мМ δ-ALA).

туры ускорялся незначительно (+0.01–0.02 отн.ед. оптической плотности при длине волны 600 нм за первые 4 ч роста культуры), поэтому для проведения данной стадии выбрали среду LB. Показано, что концентрация индуктора экспрессии ИПТГ (0.1–1 мМ) не оказывает значительного влияния на эффективность экспрессии в данных системах хозяин-вектор (табл. 1, рис. 2б). В ходе подбора состава минимальной среды варьировали концентрации источников изотопных меток: ^{13}C – глюкозы (2–5 г/л) и ^{15}N – хлорида аммония (0.6–2 г/л), подбор концентраций осуществляли с использованием немеченых реагентов. Повышение концентрации хлорида аммония в минимальной среде не влияло на уровень экспрессии генов Ngb и Cyt c, тогда как при повышении концентрации глюкозы в среде наблюдали увеличение выхода целевого белка (табл. 1, рис. 2б).

Ngb и Cyt c – гемсодержащие белки, поэтому для получения холоформы белков с правильно встроенной гемовой группой необходимо наличие свободного гемина или его биосинтетического предшественника в среде культивирования. В ходе подбора условий в качестве источника гема использовали дрожжевой экстракт в низких концентрациях (0.0002%) или δ -аминолевулиновую кислоту (δ -ALA) в концентрациях от 0.1 до 1 мМ. При экспрессии на минимальной среде с дрожжевым экстрактом, фракции с Cyt c после первого этапа очистки на MP HS (рис. 3а) отличались отсутствием в оптических спектрах поглощения характеристической полосы Соре, что свидетельствует об отсутствии гемовой группы в составе белка. Так, было показано, что добавление

δ -ALA необходимо для наработки Cyt c, а также увеличивает выход холоформы Ngb в 10 раз по сравнению с добавлением дрожжевого экстракта (табл. 1, рис. 2, 3). При этом важно отметить, что высокие концентрации δ -ALA в питательной среде предположительно приводили к повышенной экспрессии бактериального гемсодержащего белка. Данный белок не связывался с сорбентом на первом этапе очистки, а его спектр поглощения в УФ-видимой областях характеризовался пиком при 406 нм (данные не показаны). Кроме того, значительно снижалась экспрессия целевого белка Ngb (менее 1 мг очищенного белка с литра клеточной суспензии). Однако при снижении интенсивности аэрации культуры бактериальных клеток высокие концентрации δ -аминолевулиновой кислоты (0.8–1 мМ) не приводили к конкурентному синтезу бактериального гемсодержащего белка и ингибированию синтеза рекомбинантного Ngb, а, напротив, позволили значительно повысить уровень экспрессии гена целевого белка. Снижение интенсивности аэрации осуществляли за счет увеличения объема культуральной среды в ростовых колбах – до 0.5 л среды на колбу Эрленмейера объемом 2 л. При этом выход очищенного белкового препарата увеличился примерно в 4.5 раз (от 3 до 14 мг с 1 л), несмотря на то, что конечную концентрацию глюкозы в минимальной среде снизили вдвое (с 4 до 2 г на 1 л).

Экспрессию гена Cyt c проводили в присутствии 0.5 мМ δ -ALA, т.к. снижение интенсивности аэрации для данной системы приводило к значительному снижению уровня экспрессии. Это может быть связано с тем, что биосинтез Cyt c в бактериальной системе связан с необ-

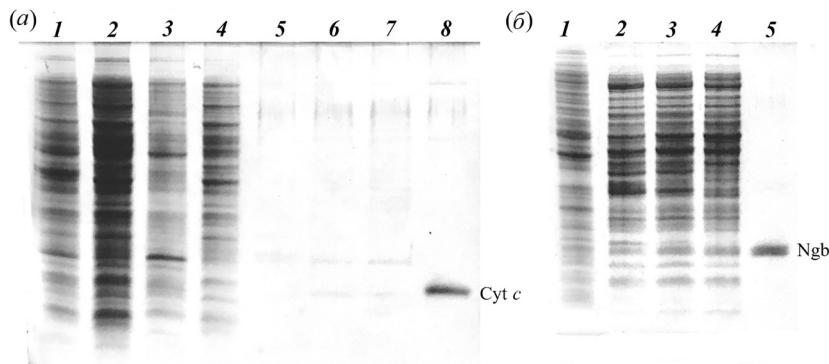


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 12% Трис-трицин SDS-ПААГ стадий наработки, выделения и очистки (экспрессия без δ -ALA): (а) – Cyt c (1 – клетки BL21(DE3) после экспрессии на M9, 2 – клеточный лизат, 3 – клеточный осадок, 4 – белки не связавшиеся с сорбентом MP HS, 5–7 – фракции с MP HS, 8 – Cyt c); (б) – 1 – клетки BL21(DE3) после экспрессии на M9, 2–4 – фракции с Q50, 5 – Ngb.

ходимостью совместной экспрессии гена *Cyt c* и гена холоцитохром-*c*-сингтазы (гем-лиазы). Гем-лиаза – фермент, способствующий образованию ковалентных связей между гемом и белковой частью *Cyt c*, что необходимо для биосинтеза холоформы *Cyt c*, свернутой в нативную конформацию. Несмотря на то, что аминокислотные последовательности дрожжевой и человеческой гем-лиазы гомологичны только на 32%, дрожжевая гем-лиаза эффективно присоединяет гемовую группу к апоформе человеческого *Cyt c* при совместной экспрессии в бактериальной системе [29]. Оптимальные условия экспрессии Ngb и *Cyt c* на минимальной среде M9 суммированы в табл. 1.

Схемы выделения и очистки Ngb и *Cyt c*, разработанные для выделения из клеток штаммов-продуцентов, выращенных на богатых средах [29–31], в целом оказались эффективными и для выделения белков из клеток продуцентов, выращенных на минимальных средах (рис. 4.). С целью повышения эффективности связывания белка с катионообменным сорбентом в схему выделения и очистки ^{15}N -*Cyt c* была добавлена дополнительная стадия диализа клеточного лизата перед хроматографической очисткой. Разработанная система продукции позволяет получать рекомбинантные гемсодержащие Ngb и *Cyt c* в количествах, сопоставимых с таковыми при использовании систем биосинтеза на богатых средах [30–32]: до 14 мг с 1 л культуры штамма-про-

дукента для Ngb (в среднем 16–20 мг с 1 л культуры штамма продуцента на среде TB) и до 6 мг с 1 л культуры штамма-продуцента для *Cyt c* (в среднем 7–10 мг с 1 л культуры штамма-продуцента на среде SB).

Согласно разработанным схемам ^{15}N -Ngb и ^{15}N -*Cyt c* наработаны, выделены и очищены в препаративных количествах. Отсутствие примесей в полученных белковых препаратах подтверждено с помощью электрофоретического (рис. 4a, дорожка 7 и 4b, дорожка 6) и спектрофотометрического анализов (рис. 5). Анализ спектров поглощения в УФ-видимой области восстановленной и окисленной форм ^{15}N -меченых Ngb и *Cyt c* позволил сделать вывод, что спектры редокс-форм ^{15}N -*Cyt c* не отличались от таковых немеченых форм белка, наработанных на богатой среде, тогда как для окисленного ^{15}N -Ngb наблюдали смещение пика в области Соре (380–440 нм) на 2 нм в красную область по сравнению с Ngb, наработанном на богатой среде (рис. 5a). Такие спектральные изменения ранее наблюдали для Ngb с точечными мутациями а.о. из гемового микроокружения (E60K и K95E) [33, 34].

КД-спектроскопия. На рис. 6а представлены спектры КД в дальней УФ-области (190–250 нм) образцов рекомбинантного ^{15}N -Ngb, наработанного на минимальной среде M9, и на богатой среде TB, по методике, описанной в [30]. КД-спектры образцов Ngb имеют форму, характерную для белков с преобладанием α -спиральной струк-

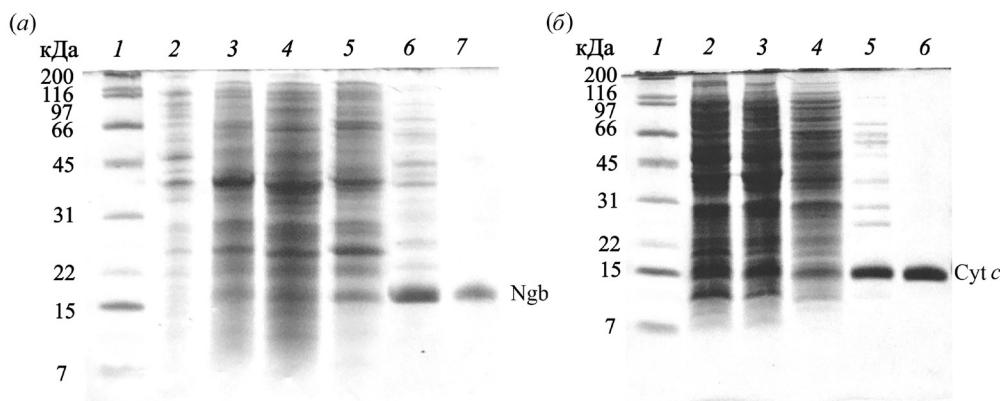


Рис. 4. Электрофоретический анализ ^{15}N -меченых белков в 12% Трис-трицин SDS-ПААГ. (а) – Стадии наработки, выделения и очистки ^{15}N -Ngb (1 – стандарт молекулярных масс (Bio-Rad, США), 2 – клетки после стадии подрашивания на LB, 3 – клетки после экспрессии на M9, 4–6 – стадии выделения и очистки Ngb, 7 – очищенный препарат ^{15}N -Ngb); (б) – стадии наработки, выделения и очистки ^{15}N -*Cyt c* (1 – стандарт молекулярных масс (Bio-Rad, США), 2 – клетки после стадии подрашивания на LB, 3 – клетки после экспрессии на M9, 4–5 – стадии выделения и очистки *Cyt c*, 6 – очищенный препарат ^{15}N -*Cyt c*).

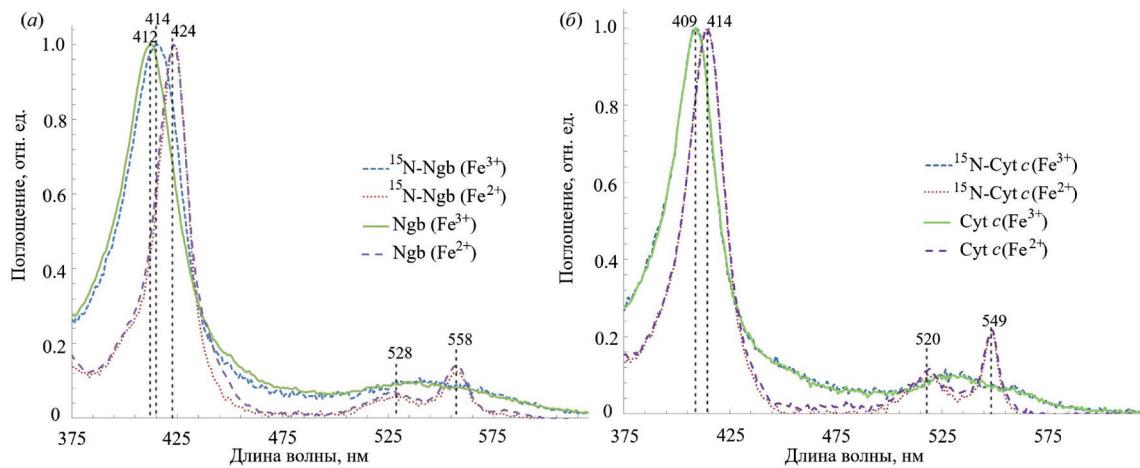


Рис. 5. Спектры поглощения в УФ-видимой области ^{15}N -меченых белков, наработанных на минимальной среде, и немеченых белков, наработанных на богатой среде: (а) – Ngb в окисленной и восстановленной формах; (б) – Cyt c в окисленной и восстановленной формах.

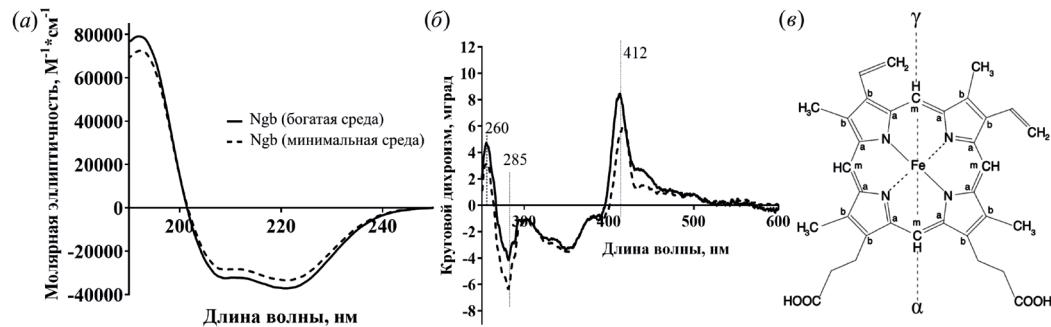


Рис. 6. Спектры КД рекомбинантных Ngb, наработанных на минимальной (^{15}N -меченный) и на богатой средах: (а) – в дальней УФ-области; (б) – в ближней УФ-видимой области. На (в) представлена структура гема Ngb с указанием α, β, γ -мезо оси.

туры, не имеют существенных отличий друг от друга и от спектров Ngb и его мутантных форм, полученных ранее [30, 33]. Составы вторичной структуры образцов рекомбинантного Ngb, рассчитанные по накопленным спектрам КД (табл. 2), согласуются между собой и с литературными данными [30, 33, 35].

На рис. 6б представлены спектры образцов рекомбинантного Ngb в ближней УФ-видимой

области (250–600 нм). Пик в области Соре соответствует пику от гемовой группы Ngb. Как и в случае спектров поглощения в УФ-видимой области, на КД-спектре Ngb, наработанного на минимальной среде наблюдался сдвиг на 2 нм в красную область. Значение пика в области Соре имеет положительное вращение и соседствует с небольшим отрицательным пиком около 400 нм, что свидетельствует о том, что гем в молекулах

Таблица 2. Анализ вторичной структуры образцов рекомбинантного Ngb, наработанных на минимальной и на богатой средах

Образец	α -Спираль, %	β -Складчатый слой, %	β -Поворот, %	Неупорядоченная структура, %	NRMSD*
Ngb (богатая среда)	83.4	0.5	1.9	14.2	0.01
Ngb (минимальная среда)	80.0	0.7	4.6	14.8	0.02

* Приведенные значения нормализованных среднеквадратичных отклонений (NRMSD) использованы в качестве статистической оценки разницы между экспериментальным спектром и теоретическим спектром, рассчитанным на основе полученного состава вторичной структуры. Согласно данным Kelly et al. [36], значение NRMSD в расчетах должно быть < 0.1 , что свидетельствует о высокой достоверности расчетов.

Ngb встроен преимущественно канонически, но с некоторой примесью молекул с обратной ориентацией гема [37, 38]. Преобладание в образцах молекул Ngb с канонической ориентацией гема дополнительно подтверждается наличием положительного пика при 260 нм (рис. 6б), который отсутствует на спектрах гемоглобинов с обратной ориентацией гема [37, 38]. Два варианта ориентации гемовой группы возможны за счет вращения гема в гемовом кармане на 180° вокруг α, γ -мезо оси (рис. 6в) [37]. Известно, что каноническая ориентация гема характерна для нативных гемоглобинов, тогда как рекомбинантные гемоглобины представляют собой смесь молекул с двумя вариантами ориентации гема, при этом каноническая обычно преобладает [37, 38].

Для Ngb мыши, однако, напротив, было показано преобладание молекул с обратной вставкой гема в рекомбинантных препаратах (около 70% молекул) [39–41]. Снижение селективности вставки гема Ngb мыши связывают с относительно большими размерами гемовой впадины, что также характерно и для мутантного Ngb человека (C46G/C55S/C120S), в структуре которого отсутствует дисульфидная связь Cys46–Cys55 [39, 41]. При этом для Ngb человека было показано снижение объема гемовой впадины на 17–30% и преобладание канонической ориентации гема по сравнению с мутантным Ngb C46G/C55S/C120S [35]. Таким образом, полученные данные соответствуют известным для кристаллической структуры Ngb человека особенностям [35] и также косвенно свидетельствуют о наличии дисульфидной связи в Ngb, наработанного с помощью двух разных систем биосинтеза. Отрицательные значения пика с максимумом при 285 нм характерены для несвязанной с лигандом (например, O₂, CO и другие газообразные лиганды) формы Ngb [42].

ЯМР-спектроскопия. В результате анализа одномерных ¹H- и двумерных ¹H/¹⁵N-спектров ЯМР рекомбинантных белков Ngb и Cyt c (рис. 7 и 8) установлено, что полученные образцы характеризуются высокой степенью мечения (более 80%), в соответствии с ожидаемым уровнем сигнала для измеряемых концентраций. Большая дисперсия сигналов (6–12 м.д.) указывает на высокую упорядоченность полипептидной цепи обоих белков, а также на существенный paramagnитный псевдоконтактный сдвиг, вызванный атомом железа гемовой группы в окисленном

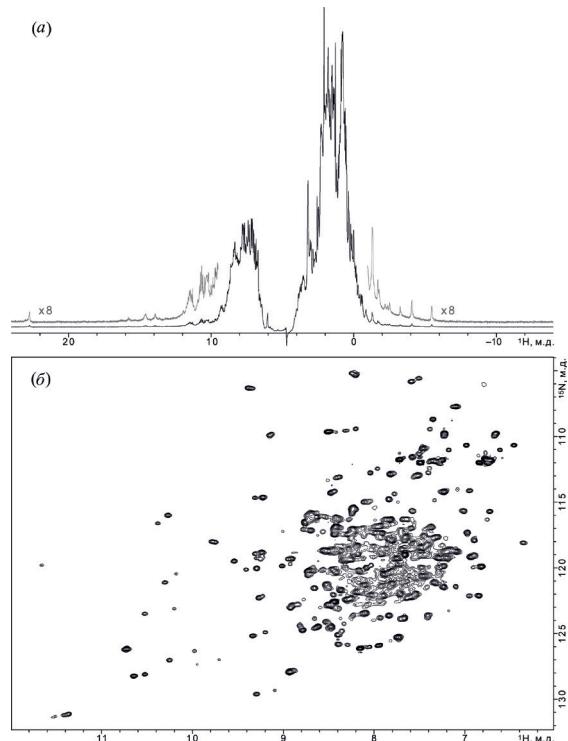


Рис. 7. Одномерный ¹H- (а) и двумерный ¹H/¹⁵N-HSQC (б) ЯМР спектры ¹⁵N-Ngb. Дополнительно в (а) над ЯМР ¹H спектром показаны области с отдельно стоящими ¹H-резонансами групп гема, увеличенные по интенсивности в 8 раз (выделены серым цветом).

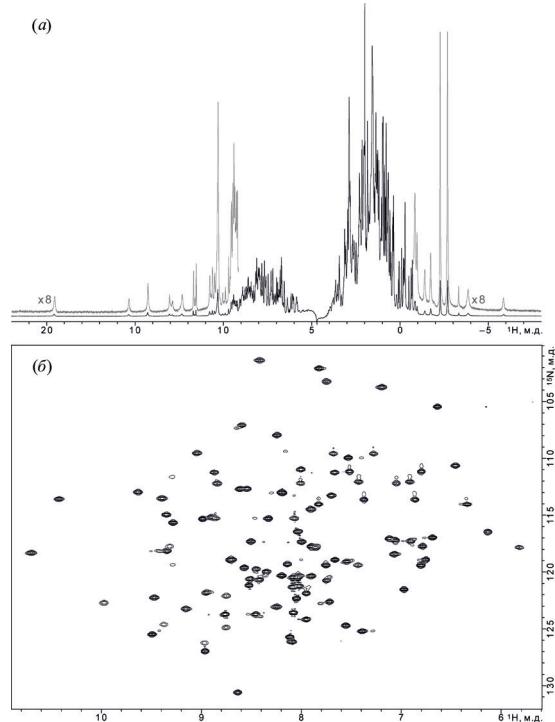


Рис. 8. Одномерный ¹H- (а) и двумерный ¹H/¹⁵N-HSQC (б) ЯМР спектры ¹⁵N-Cyt c. Дополнительно в (а) над ЯМР ¹H спектром показаны области с отдельно стоящими ¹H-резонансами групп гема, увеличенные по интенсивности в 8 раз (выделены серым цветом).

состоянии (Fe^{3+}). В целом спектры ЯМР полученного *Cyt c* практически совпадают со спектрами, приведенными в многочисленных литературных источниках. В $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC спектре *Ngb* присутствует двойной набор кросс-пиков в соотношении 65 : 35, что указывает на присутствие двух форм *Ngb* с разной ориентацией гемовой группы. Самые крайние кросс-пики в низком поле соответствуют NH сигналу H96 из работы [28] для *Ngb* мыши. Вектор NH связи координирующего остатка H96 достаточно близко расположен к Fe^{3+} гема, поэтому испытывает один из максимальных парамагнитных сдвигов, что в свою очередь соответствует нативной конфигурации холоформы *Ngb*. Таким образом, спектры ЯМР указывают на то, что оба рекомбинантных белка *Ngb* и *Cyt c* со встроенным гемом свернуты предположительно в нативную конформацию, обогащенную α -спиральной структурой. При условии $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -изотопного мечения белков в дальнейшем возможно проведение ЯМР-исследований для получения детальной структурно-динамической информации на атомном уровне как отдельных белков, так и их комплекса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали компоненты питательных сред, хлорамфеникол (AppliChem, Германия), δ -аминолевулиновую кислоту (δ -ALA), хлорид аммония, ^{15}N -хлорид аммония, соли, входящие в состав раствора микроэлементов (Sigma-Aldrich, США), соли для приготовления буферных растворов (Servicebio, Китай), маркер молекулярных весов для белков, сорбенты для хроматографии (Bio-Rad, США; Pharmacia, Швеция), ампициллин, D-глюкозу (neoFroxx GmbH, Германия), рибофлавин-мононуклеотид (Фармстандарт-УфаВИТА, Россия), пиридоксин (Биосинтез, Россия), тиамина хлорид (Ереванская химико-фармацевтическая фирма, Армения). Для приготовления всех растворов и буферов использовали воду, очищенную с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Штаммы бактерий и ростовые среды. В работе использовали штаммы бактерий *E. coli*: JM-109 (Promega, США), SHuffle T7 (NEB, США), BL21(DE3) и BL21(DE3) *pLysS* (Novagen, Германия). Для трансформации штаммов *E. coli*, подращивания бактериальных клеток использо-

вали среду LB, плотная среда содержала 1.5% агара. Для экспрессии генов рекомбинантных белков клетки штамма-продуцента выращивали в среде M9 (46.9 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 17 mM NaCl, 1.3 mM MgSO₄, 0.6 mM CaCl₂, 46 мкМ тиамина, 25 мкМ пиридоксина, 10.6 мкМ рибофлавина, 0.02% раствора микроэлементов (0.1 M $\text{FeCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 M ZnCl_2 , 8.4 mM $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 8.3 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 6.8 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 7.6 mM $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3.2 mM H_3BO_3 , 10% HCl). В среды добавляли антибиотики: ампициллин (120–150 мкг/мл) для культивирования трансформированных клеток, а также дополнительно хлорамфеникол (35 мкг/мл) для штамма BL21(DE3) *pLysS*.

Генно-инженерные методы. Для трансформации клеток штаммов *E. coli* использовали плазмидные векторы pET-17b (Novagen, США) с геном *Ngb* встроенным по сайтам рестрикции *Kpn* I и *Nde* I и pBP(CYCS/CYC3), в который был переклонирован ген человеческого *Cyt c* из полученного ранее вектора pET-24a по сайтам рестрикции *Bam*H I и *Xho* I.

Выделение плазмидной ДНК, электрофоретический анализ образцов ДНК, клонирование ДНК и трансформацию бактериальных штаммов выполняли по стандартным методикам [43].

Экспрессия рекомбинантного гена. Клетки штамма BL21(DE3) *E. coli*, трансформированные плазмидой pET-17b-*Ngb*, содержащей ген *Ngb* человека, подращивали в питательной среде LB (5 мл × 4) с добавлением 10 г/л D-глюкозы при 37°C и перемешивании при 180 об/мин в течение 18 ч. После чего переносили клетки в больший объем среды LB с D-глюкозой (500 мл × 4) и подращивали еще в течение 8 ч при тех же условиях. Клетки штамма BL21(DE3), трансформированные плазмидой pBP(CYCS/CYC3), содержащей гены *Cyt c* человека и дрожжевой холоцитохром-с-сингтазы (гем-лиазы), подращивали в питательной среде LB (250 мл × 4) при 37°C и перемешивании при 180 об/мин в течение 18 ч. После этого биомассу клеток осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 6000g и 24°C в стерильных центрифужных стаканах. Полученные клеточные осадки ресусцинировали в 1 л среды M9, разливали по колбам Эрленмейера объемом 2 л по 500 мл (*Ngb*) или 250 мл (*Cyt c*) на колбу. Далее инкубировали клеточные суспензии в течение 90 мин при тех же условиях, после чего

добавляли стерильно отфильтрованные 2–4 г/л D-глюкозы, 0.6 г/л $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Инкубировали засеянные культуры при 37°C и перемешивании при 180 об/мин в течение 1 ч и затем в течение 30 мин при 28°C и перемешивании при 200 об/мин. Добавляли δ -ALA до конечной концентрации 0.5–0.8 мМ и индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ (до конечной концентрации 0.15 мМ). Экспрессию на минимальной среде осуществляли при 28°C, перемешивании при 200 об/мин, в течение 16 ч для наработки Ngb и при 37°C, перемешивании при 220 об/мин, в течение 24 ч для наработки Cyt c. Биомассу клеток осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 6000g.

Выделение и очистка рекомбинантных белков. Полученный клеточный осадок ресуспенсировали в буфере для лизиса (для Ngb 25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ NaN₃, либо 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ NaN₃, pH 6.0 для Cyt c). Проводили гомогенизацию клеток под высоким давлением с помощью установки “French Press” (Spectronic Instruments, Inc., США). После этого гомогенат центрифугировали при 95 000g и 4°C в течение 30 мин для осаждения клеточного дебриса. На следующих стадиях очистки белков использовали систему жидкостной хроматографии AKTA FPLC (GEHealthcare, США). Схемы очистки Ngb и Cyt c подробно описаны в [30, 31, 33].

Ngb осаждали из супернатанта путем высаливания сульфатом аммония до 60%-ного насыщения и центрифугировали при 50 000g и 4°C в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспенсировали в буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ NaN₃) и проводили диализ против двухсоткратного объема того же буфера. Проводили анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом Sepromax Q50 (Galak, Китай). Белок элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl со скоростью 2 мл/мин в том же буфере. Фракции, обогащенные целевым белком, концентрировали путем повторного высаливания, после чего осадок ресуспенсировали в 50 мМ натрий-fosфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 1 мМ NaN₃, pH 7.0, и наносили на гель-фильтрационную колонку GL 10/500 (Pharmacia, Швеция) с сорбентом Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеция).

Для очистки Cyt c человека клеточный лизат диализовали против двухсоткратного объема буфера 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ NaN₃, pH 6.0 перед катионообменной хромато-

графией на колонке с сорбентом MP HS (Bio-Rad, США). Белок элюировали в линейном градиенте концентрации 1М NaCl со скоростью 2 мл/мин. Фракции, обогащенные целевым белком, диализовали против буфера для адсорбционной хроматографии (10 мМ Na₂HPO₄, 10 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ NaN₃, pH 7.0) для дальнейшей очистки на гидроксиаплатите CHT-I. Белок элюировали линейным градиентом 500 мМ Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄ со скоростью 2 мл/мин.

Очищенные белки трижды диализовали против четырехсоткратного объема буфера 10 мМ NH₄HCO₃, pH 7.9, затем лиофилизовали и хранили при –20°C.

Аналитические методы. Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по максимуму поглощения в области Соре, с учетом молярного коэффициента экстинкции $\varepsilon_{412} = 129000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для окисленного Ngb [44] и $\varepsilon_{414} = 125000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, $\varepsilon_{409} = 106000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для восстановленной и окисленных форм Cyt c, соответственно.

Все этапы наработки, выделения и очистки белков контролировали с помощью электрофоретического анализа в 12%-ном SDS-ПААГ в Трис-трициновой буферной системе [45].

КД-спектроскопия. Растворы рекомбинантных белков в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.2 помещали в кювету толщиной 0.01 см для регистрации спектров в диапазоне 190–250 нм (концентрация Ngb 56 мкМ), либо в кювету толщиной 1.0 см для диапазона 250–600 нм (концентрация Ngb 16–19 мкМ). Спектры КД накапливали на спектрополяриметре J-810 (JASCO, Япония) при комнатной температуре с шагом 0.2 нм (скорость сканирования 20 нм/мин) и шириной оптической щели 1 нм, усреднение выполняли по четырем спектрам. Для расчета вторичной структуры использовали программу CONTINLL (пакет CDPro, Colorado State University, США), набор референсных спектров: SMP56.

ЯМР-спектроскопия. Растворы ^{15}N -меченых рекомбинантных белков с концентрацией 0.4 мМ в 20 мМ фосфатном буфере, pH 6.5, содержащем 10 мМ NaCl и 5% D₂O, помещали в 5-мм ЯМР-ампулу. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC спектры накапливали при 30°C на спектрометре AVANCE I (Bruker, Германия) с резонансной частотой 700 МГц для протонов, оборудованном криогенно охлаждаемым датчиком по тройному резонансу.

Моделирование комплекса Ngb-Cyt c. Модель реакционного комплекса Ngb-Cyt *c* сгенерировали с помощью ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 (Google, США) [46], в качестве входных данных использовали следующие аминокислотные последовательности – UniProt ID: P99999 – Cyt *c*, Q9NPG2 – Ngb. Было сгенерировано 20 моделей и из них выбрана одна, с наилучшими характеристиками (pLDDT, pTM, iPTM). Вставку гемов в модель белок-белкового комплекса осуществили за счет структурного выравнивания в PyMOL (ID PDB: 1HRC – Cyt *c*, 4MPM – Ngb), с последующей минимизацией энергии в силовом поле Amber14:EHT с помощью программы Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group ULC, Канада).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и оптимизирована высокоэффективная система продукции рекомбинантных гемсодержащих белков, которая позволяет наработать изотопно-меченные Ngb и Cyt *c* в количествах, достаточных для анализа структурно-динамических свойств данных белков и их комплекса методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-14-00436).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Paoli M., Marles-Wright J., Smith A.* // DNA Cell. Biol. 2002. V. 21. P. 271–80.
<https://doi.org/10.1089/104454902753759690>
2. *Smith L.J., Kahraman A., Thornton J.M.* // Proteins. 2010. V. 78. P. 2349–2368.
<https://doi.org/10.1002/prot.22747>
3. *Schweitzer-Stenner R.* // Molecules. 2022. V. 27. P. 8751.
<https://doi.org/10.3390/molecules27248751>
4. *Verde C., Giordano D., Bruno S.* // Antioxidants. 2023. V. 12. P. 321.
<https://doi.org/10.3390/antiox12020321>
5. *Rivera M., Caigan G.A.* // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 378. P. 1464–1483.
<https://doi.org/10.1007/s00216-003-2340-0>
6. *Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T.* // Nature. 2000. V. 407. P. 520–523.
<https://doi.org/10.1038/35035093>
7. *De Simone G., Sbardella D., Oddone F., Pesce A., Coletta M., Ascenzi P.* // Cells. 2021. V. 10. P. 3366.
<https://doi.org/10.3390/cells10123366>
8. *de Vidania S., Palomares-Perez I., Frank-García A., Saito T., Saido T.C., Draffin J., Szaruga M., Chavez-Gutierrez L., Calero M., Medina M., Guix F.X., Dotti C.G.* // Front. Neurosci. 2020. 14. P. 562581.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.562581>
9. *Fiocchetti M., Cracco P., Montalesi E., Fernandez V.S., Stuart J.A., Marino M.* // Arch. Biochem. Biophys. 2021. V. 701. P. 108823.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108823>
10. *Hankeln T., Ebner B., Fuchs C., Gerlach F., Haberkamp M., Laufs T.L., Roesner A., Schmidt M., Weich B., Wystub S., Saaler-Reinhardt S., Reuss S., Bolognesi M., De Sanctis D., Marden M.C., Kiger L., Moens L., Dewilde S., Nevo E., Avivi A., Weber R.E., Fago A., Burmester T.* // J. Inorg. Biochem. 2005. V. 99. P. 110–119.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.11.009>
11. *Brittain T., Skommer J., Raychaudhuri S., Birch N.* // Int. J. Mol. Sci. 2010. V. 11. P. 2306–2321.
<https://doi.org/10.3390/ijms11062306>
12. *Fago A., Mathews A.J., Brittain T.* // IUBMB Life. 2008. V. 60. P. 398–401.
<https://doi.org/10.1002/iub.35>
13. *Tejero J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 523. P. 567–572.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.089>
14. *Alvarez-Paggi D., Hannibal L., Castro M.A., Oviedo-Rouco S., Demicheli V., Tortora V., Tomasina F., Radi R., Murgida D.H.* // Chem. Rev. 2017. V. 117. P. 13382–13460.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00257>
15. *Ow Y.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9. P. 532–542.
<https://doi.org/10.1038/nrm2434>

16. Dewilde S., Kiger L., Burmester T., Hankeln T., Baudin-Creusa V., Aerts T., Marden M.C., Cauberg R., Moens L. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 38949–38955.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m106438200>
17. Blank M., Burmester T. // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. P. 3553–3561.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss164>
18. Sakamoto K., Kamiya M., Uchida T., Kawano K., Ishimori K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 398. P. 231–236.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.065>
19. Simonneaux G., Bondon A. // Chem. Rev. 2005. V. 105. P. 2627–2646.
<https://doi.org/10.1021/cr030731s>
20. Semenova M.A., Chertkova R.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. // Biomolecules. 2023. V. 13. P. 1233.
<https://doi.org/10.3390/biom13081233>
21. Bønding S.H., Henty K., Dingley A.J., Brittain T. // Int. J. Biol. Macromol. 2008. V. 43. P. 295–299.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.07.003>
22. Guidolin D., Agnati L.F., Tortorella C., Marcoli M., Maura G., Albertin G., Fuxe K. // Int. J. Mol. Med. 2014. V. 33. P. 111–116.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1564>
23. Tiwari B., Chapagain P.P., Üren A. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 10557.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28836-6>
24. Feng Y., Liu X.-C., Li L., Gao S.-Q., Wen G.-B., Lin Y.-W. // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 11510–11518.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01256>
25. Bochkova Z.V., Semenova M.A., Smirnova O.M., Maksimov G.V., Rubin, A.B., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Chertkova R.V., Brazhe N.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2025. V. 318. P. 145040.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145040>
26. Marley J., Lu M., Bracken C. J. // J. Biomol. NMR. 2001. V. 20. P. 71–75.
<https://doi.org/10.1023/a:1011254402785>
27. Britikov V.V., Bocharov E.V., Britikova E.V., Derigoussova N.I., Kulikova O.G., Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Varfolomeeva L.A., Tikhonova T.V., Timofeev V.I., Shtykova E.V., Altukhov D.A., Usanov S.A., Arseniev A.S., Rakitina T.V., Popov V.O. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 9969.
<https://doi.org/10.3390/ijms23179969>
28. Yang Y., Allemand F., Guca E., Vallone B., Delbecq S., Roumestand C. // Biomol. NMR Assign. 2015. V. 9. P. 153–156.
<https://doi.org/10.1007/s12104-014-9563-1>
29. Jeng W.-Y., Chen C.-Y., Chang H.-C., Chuang W.-J. // J. Bioenerg. Biomembr. 2002. V. 34.
<https://doi.org/10.1023/a:1022561924392>
30. Семенова М.А., Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Игнатова А.А., Паршина Е.Ю., Зиганшин Р.Х., Бочаров Э.В., Браже Н.А., Максимов Г.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Черткова Р.В. // Биоорг. химия. 2023. Т. 3. С. 319–330.
<https://doi.org/10.31857/S013234232303020X>
31. Pepelina T.Y., Chertkova R.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 90–96.
<https://doi.org/10.1134/s1068162010010097>
32. Chertkova R.V., Bryantseva T.V., Brazhe N.A., Revin V.V., Kudryashova K.S., Yusipovich A.I., Brazhe A.R., Rubin A.B., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Maksimov G.V. // Crystals. 2021. V. 11. P. 973.
<https://doi.org/10.3390/cryst11080973>
33. Semenova M.A., Smirnova O.M., Ignatova A.A., Parshina E.Y., Maksimov G.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Chertkova R.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 1483–1488.
<https://doi.org/10.1134/S1068162023060274>
34. Semenova M.A., Bochkova Z.V., Smirnova O.M., Maksimov G.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Brazhe N.A., Chertkova R.V. // Curr. Issues Mol. Biol. 2024. V. 46. P. 3364–3378.
<https://doi.org/10.3390/cimb46040211>
35. Guimaraes B.G., Hamdane D., Lechauve C., Marden M.C., Golinelli-Pimpaneau B. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2014. V. 70. P. 1005–1014.
<https://doi.org/10.1107/S1399004714000078>
36. Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1751. P. 119–139.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
37. Sebastiani F., Milazzo L., Exertier C., Becucci M., Smulevich G. // J. Raman Spectrosc. 2021. V. 52. P. 2536–2549.
<https://doi.org/10.1002/jrs.6105>
38. Nagai M., Nagai Y., Aki Y., Sakurai H., Mizusawa N., Ogura T., Kitagawa T., Yamamoto Y., Nagatomo S. // Chirality. 2016. V. 28. P. 585–592.
<https://doi.org/10.1002/chir.22620>
39. Vallone B., Nienhaus K., Brunori M., Nienhaus G.U. // Proteins. 2004. V. 56. P. 85–92.
<https://doi.org/10.1002/prot.20113>
40. Du W., Syvitski R., Dewilde S., Moens L., La Mar G.N. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 8080–8081.
<https://doi.org/10.1021/ja034584r>
41. Pesce A., Dewilde S., Nardini M., Moens L., Ascenzi P., Hankeln T., Burmester T., Bolognesi M. // Structure. 2003. V. 11. P. 1087–1095.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00166-7](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00166-7)
42. Geraci G., Parkhurst L.J. // Methods Enzymol. 1981. V. 76. P. 262–275.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)76127-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)76127-5)
43. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989.
44. Nicolis S., Monzani E., Ciaccio C., Ascenzi P., Moens L., Casella L. // Biochem. J. 2007. V. 407. P. 89–99.
<https://doi.org/10.1042/bj20070372>
45. Schagger H., Jagow G. // Anal. Biochem. 1987. V. 166. P. 368–379.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
46. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. // Nature Methods. 2022. V. 19. P. 679–682.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>

Development of a Bacterial Expression System for Producing $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Labeled Neuroglobin and Cytochrome C

M. A. Semenova*, O. M. Smirnova*, V. V. Britikov, E. V. Britikova**, A. P. Khodnenko*,
Y. V. Bershatsky*, A. A. Ignatova*, E. V. Bocharov*,***, M. P. Kirpichnikov*,****,
D. A. Dolgikh*,****, and R. V. Chertkova*,#**

Phone: +7 (903) 772-86-54; e-mail: cherita@inbox.ru

** Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho–Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

*** Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, ul. Akademika Kuprevicha 5/2, Minsk, 220084, Belarus*

**** Moscow Institute of Physics and Technology, Institutsky per., 9 Dolgoprudny, 141700 Russia*

***** Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia*

An effective system for producing isotopically labeled heme-containing proteins of human neuroglobin and cytochrome c has been developed. The corresponding producer strains have been obtained, and optimal cultivation conditions have been selected: temperature and duration of incubation, composition of media, and concentration of expression inducer. Using far- and near-UV-vis CD spectroscopy, it was shown that the secondary structure composition of ^{15}N -neuroglobin is close to the calculated one, and the orientation of the heme in the molecules is predominantly canonical. According to two-dimensional $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC NMR spectra of human neuroglobin and cytochrome c, the proteins are folded into a native conformation with a predominance of the α -helical structure. The resulting production system can be used to produce highly purified preparations of totally $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled proteins for structural-dynamic studies using modern high-resolution NMR spectroscopy methods.

Keywords: *neuroglobin, cytochrome c, NMR, heme proteins, recombinant proteins*