



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. Бершадский\*, 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 Беларуси”,  
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  $^{15}\text{N}$ -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  $\alpha$ -спиральной структуры. Полученная система продукции может быть использована для наработки высокоочищенных препаратов тотально  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -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 протетической 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), каталитических 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:  $\delta$ -ALA –  $\delta$ -аминолевулиновая кислота; HSQC – гетероядерная корреляция через одно-квантовую когерентность (heteronuclear single quantum coherence experiment); Ngb – нейроглобин; Cyt c – цитохром с; КД-круговой дихроизм.

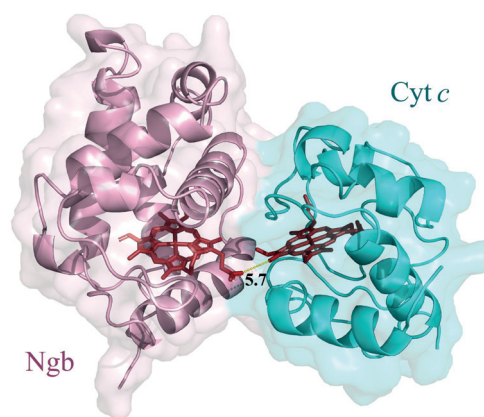
# Автор для связи: (тел.: +7 (903) 772-86-54; эл. почта: cherita@inbox.ru).

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 межмембранного 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  $\alpha$ -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  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -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 измене-

ние структуры и динамических характеристик при комплексообразовании, так и интерфейс белок-белкового взаимодействия неизвестны [20]. Вместе с тем, методами молекулярного докинга [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 гибелью 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.

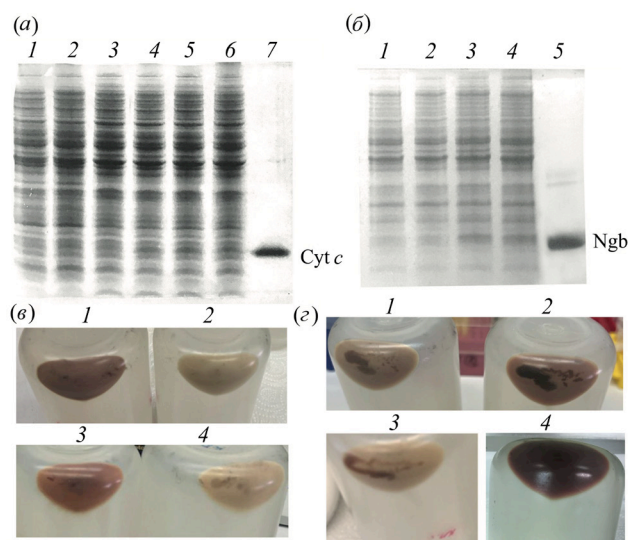
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Система продукции изотопно-меченых гемсодержащих белков.** Протокол экспрессии Ngb и Cyt c в бактериальной системе *Escherichia coli* на минимальной среде М9 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. 2а,в). Были подобраны оптимальные условия культивирования на каждом из этапов (богатая среда/минимальная среда) (табл. 1). При использовании питательных сред ТВ 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 $\delta$ -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



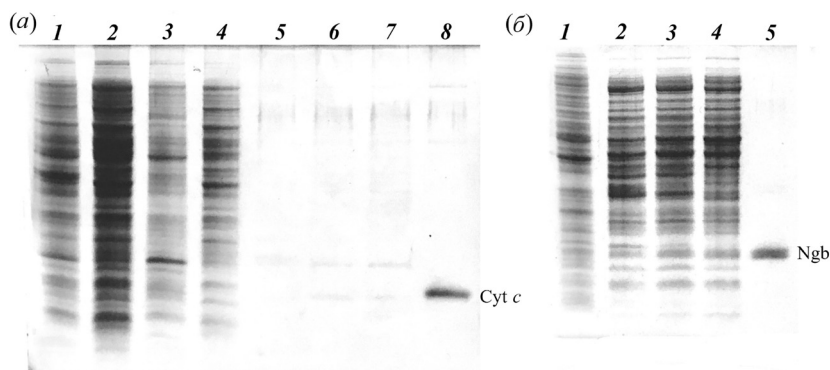
**Рис. 2.** Подбор оптимальных условий культивирования гемсодержащих белков на минимальной среде. Электрофоретический анализ в 12% Трис-трицин SDS-ПААГ клеточного белка после экспрессии на М9: (а) – Cyt c (1 – клетки JM-109, 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ  $\delta$ -ALA; 2 – клетки JM-109, 1 мМ  $\delta$ -ALA; 3 – клетки BL21(DE3), 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ  $\delta$ -ALA; 4 – клетки BL21(DE3), 0.1 мМ  $\delta$ -ALA; 5 – клетки BL21(DE3), 0.5 мМ  $\delta$ -ALA; 6 – клетки BL21(DE3), 1 мМ  $\delta$ -ALA; 7 – Cyt c); (б) – 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 М9: (в) – Cyt c (1 – BL21(DE3), 1 мМ  $\delta$ -ALA; 2 – BL21(DE3), 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ  $\delta$ -ALA; 3 – JM-109, 1 мМ  $\delta$ -ALA; 4 – JM-109, 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ  $\delta$ -ALA); (г) – Ngb (1 – BL21(DE3), 0.25 мМ  $\delta$ -ALA; 2 – BL21(DE3), 0.5 мМ  $\delta$ -ALA; 3 – BL21(DE3), 0.0002% дрожжевого экстракта, 0 мМ  $\delta$ -ALA; 4 – BL21(DE3), 0.8 мМ  $\delta$ -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:  $^{13}\text{C}$  – глюкозы ( $2-5$  г/л) и  $^{15}\text{N}$  – хлорида аммония ( $0.6-2$  г/л), подбор концентраций осуществляли с использованием немеченых реактивов. 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 гема или его биосинтетического предшественника в среде культивирования. В ходе подбора условий в качестве источника гема использовали дрожжевой экстракт в низких концентрациях ( $0.0002\%$ ) или  $\delta$ -аминолевулиновую кислоту ( $\delta$ -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 МР 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

$\delta$ -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  $\delta$ -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  $\delta$ -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  $\delta$ -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  $\delta$ -ALA): (а) – *Cyt c* (1 – клетки BL21(DE3) после экспрессии на М9, 2 – клеточный лизат, 3 – клеточный осадок, 4 – белки не связавшиеся с сорбентом МР HS, 5–7 – фракции с МР HS, 8 – *Cyt c*); (б) – 1 – клетки BL21(DE3) после экспрессии на М9, 2–4 – фракции с Q50, 5 – *Ngb*).



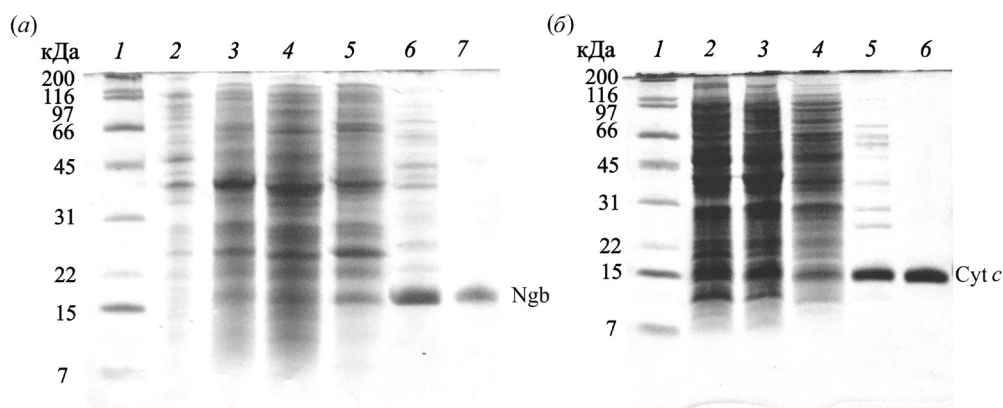
ходимостью совместной экспрессии гена *Cyt c* и гена холоцитохром-с-синтазы (гем-лиазы). Гем-лиаза – фермент, способствующий образованию ковалентных связей между гемом и белковой частью *Cyt c*, что необходимо для биосинтеза холоформы *Cyt c*, свернутой в нативную конформацию. Несмотря на то, что аминокислотные 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 М9 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  $^{15}\text{N}$ -*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-

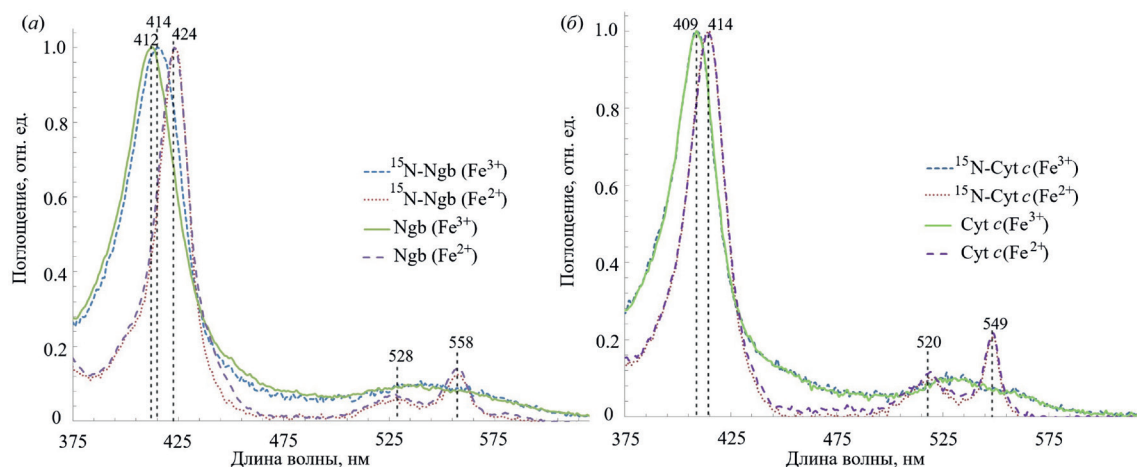
дукента для Ngb (в среднем 16–20 мг с 1 л культуры штамма продуцента на среде ТВ) и до 6 мг с 1 л культуры штамма-продукента для *Cyt c* (в среднем 7–10 мг с 1 л культуры штамма-продукента на среде SB).

Согласно разработанным схемам  $^{15}\text{N}$ -Ngb и  $^{15}\text{N}$ -*Cyt c* наработаны, выделены и очищены в препаративных количествах. Отсутствие примесей в полученных белковых препаратах подтверждено с помощью электрофоретического (рис. 4а, дорожка 7 и 4б, дорожка 6) и спектрофотометрического анализов (рис.5). Анализ спектров поглощения в УФ-видимой области восстановленной и окисленной форм  $^{15}\text{N}$ -меченых Ngb и *Cyt c* позволил сделать вывод, что спектры редокс-форм  $^{15}\text{N}$ -*Cyt c* не отличались от таковых немеченых форм белка, наработанных на богатой среде, тогда как для окисленного  $^{15}\text{N}$ -Ngb наблюдали смещение пика в области Core (380–440 нм) на 2 нм в красную область по сравнению с Ngb, наработанном на богатой среде (рис. 5а). Такие спектральные изменения ранее наблюдали для Ngb с точечными мутациями а.о. из гемового микроокружения (Е60К и К95Е) [33, 34].

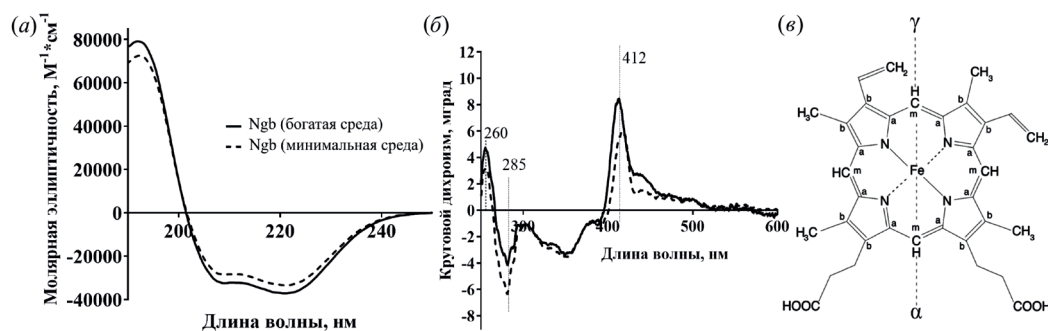
**КД-спектроскопия.** На рис. 6а представлены спектры КД в дальней УФ-области (190–250 нм) образцов рекомбинантного  $^{15}\text{N}$ -Ngb, наработанного на минимальной среде М9, и на богатой среде ТВ, по методике, описанной в [30]. КД-спектры образцов Ngb имеют форму, характерную для белков с преобладанием  $\alpha$ -спиральной струк-



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ  $^{15}\text{N}$ -меченых белков в 12% Трис-трицин SDS-ПААГ. (а) – Стадии наработки, выделения и очистки  $^{15}\text{N}$ -Ngb (1 – стандарт молекулярных масс (Bio-Rad, США), 2 – клетки после стадии подращивания на LB, 3 – клетки после экспрессии на М9, 4–6 – стадии выделения и очистки Ngb, 7 – очищенный препарат  $^{15}\text{N}$ -Ngb); (б) – стадии наработки, выделения и очистки  $^{15}\text{N}$ -*Cyt c* (1 – стандарт молекулярных масс (Bio-Rad, США), 2 – клетки после стадии подращивания на LB, 3 – клетки после экспрессии на М9, 4–5 – стадии выделения и очистки *Cyt c*, 6 – очищенный препарат  $^{15}\text{N}$ -*Cyt c*).



**Рис. 5.** Спектры поглощения в УФ-видимой области  $^{15}\text{N}$ -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 ( $^{15}\text{N}$ -меченый) и на богатой средах: (а) – в дальней УФ-области; (б) – в ближней УФ-видимой области. На (в) представлена структура гема Ngb с указанием  $\alpha, \gamma$ -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	$\alpha$ -Спираль, %	$\beta$ -Складчатый слой, %	$\beta$ -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  $180^\circ$  вокруг  $\alpha, \gamma$ -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 характерны для несвязанной с лигандом (например,  $O_2$ , CO и другие газообразные лиганды) формы Ngb [42].

**ЯМР-спектроскопия.** В результате анализа одномерных  $^1H$ - и двумерных  $^1H/^{15}N$ -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 парамагнитный псевдоконтактный сдвиг, вызванный атомом железа гемовой группы в окисленном

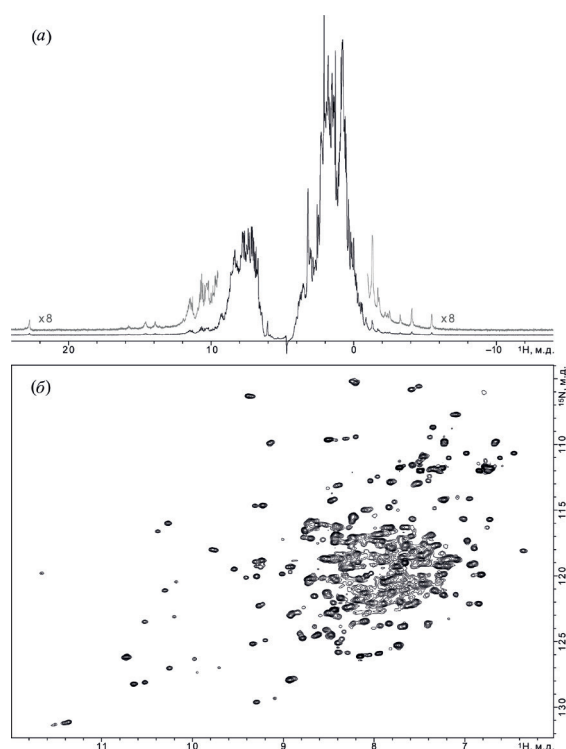


Рис. 7. Одномерный  $^1H$ - (а) и двумерный  $^1H/^{15}N$ -HSQC (б) ЯМР спектры  $^{15}N$ -Ngb. Дополнительно в (а) над ЯМР  $^1H$  спектром показаны области с отдельно стоящими  $^1H$ -резонансами групп гема, увеличенные по интенсивности в 8 раз (выделены серым цветом).

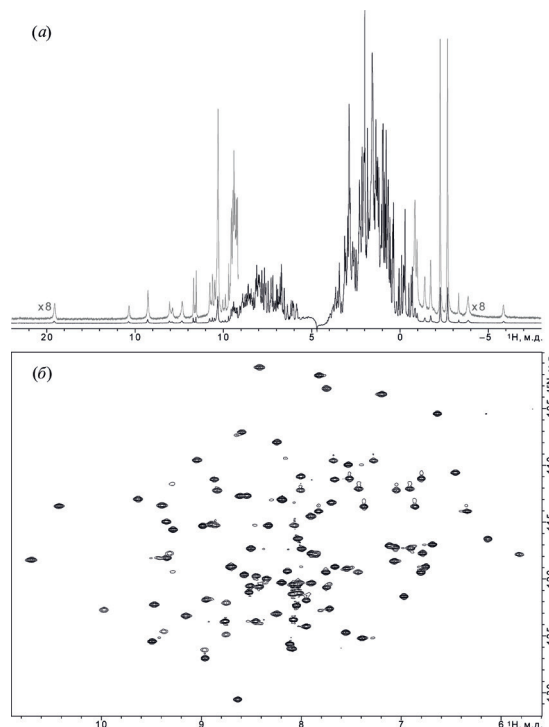


Рис. 8. Одномерный  $^1H$ - (а) и двумерный  $^1H/^{15}N$ -HSQC (б) ЯМР спектры  $^{15}N$ -Cyt c. Дополнительно в (а) над ЯМР  $^1H$  спектром показаны области с отдельно стоящими  $^1H$ -резонансами групп гема, увеличенные по интенсивности в 8 раз (выделены серым цветом).

состоянии ( $\text{Fe}^{3+}$ ). В целом спектры ЯМР полученного Cyt с 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  $\text{Fe}^{3+}$  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 с со встроенным гемом свернуты предположительно в нативную конформацию, обогащенную  $\alpha$ -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),  $\delta$ -аминолевулиновую кислоту ( $\delta$ -ALA), хлорид аммония,  $^{15}\text{N}$ -хлорид аммония, соли, входящие в состав раствора микроэлементов (Sigma-Aldrich, США), соли для приготовления буферных растворов (Servicelbio, 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17 mM  $\text{NaCl}$ , 1.3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 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  $\text{ZnCl}_2$ , 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  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10%  $\text{HCl}$ ). 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 с 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  $\times$  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  $\times$  4) и подращивали еще в течение 8 ч при тех же условиях. Клетки штамма BL21(DE3), трансформированные плазмидой pBP(CYCS/CYC3), содержащей гены Cyt с человека и дрожжевой холоцитохром-с-синтазы (гем-лиазы), подращивали в питательной среде LB (250 мл  $\times$  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 ресуспендировали в 1 л среды M9, разливали по колбам Эрленмейера объемом 2 л по 500 мл (Ngb) или 250 мл (Cyt с) 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  $\delta$ -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 ресуспендировали в буфере для лизиса (для Ngb 25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , либо 25 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 мМ  $\text{NaNH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 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 АКТА 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 ресуспендировали в буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ ) и проводили диализ против двухсоткратного объема того же буфера. Проводили анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом Sepromax Q50 (Galax, 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 ресуспендировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 мМ  $\text{NaNH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 мМ  $\text{NaNH}_2\text{PO}_4$ , 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0) для дальнейшей очистки на гидроксиапатите СНТ-1. Белок элюировали линейным градиентом 500 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaNH}_2\text{PO}_4$  со скоростью 2 мл/мин.

Очищенные белки трижды диализовали против четырехсоткратного объема буфера 10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.9, затем лиофилизировали и хранили при –20°C.

**Аналитические методы.** Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по максимуму поглощения в области Core, с учетом молярного коэффициента экстинкции  $\epsilon_{412} = 129000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для окисленного Ngb [44] и  $\epsilon_{414} = 125000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{409} = 106000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  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  $^{15}\text{N}$ -меченых рекомбинантных белков с концентрацией 0.4 мМ в 20 мМ фосфатном буфере, pH 6.5, содержащем 10 мМ NaCl и 5%  $\text{D}_2\text{O}$ , 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 нарабатывать изотопно-меченые 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., Doti 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-Creuza V., Aerts T., Marden M.C., Cau-bergs 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., Ishi-mori 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., Der-gousova 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., Usa-nov 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., Del-beq 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., Паришина Е.Ю., Зиганин 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., Kir-pichnikov 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., Re-vin V.V., Kudryashova K.S., Yusipovich A.I., Bra-zhe 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., Mar-den 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., Bolognes 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., Ovchin-nikov 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  $^{15}\text{N}$ -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  $\alpha$ -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