



РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА, ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ХОЛОФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО НЕЙРОГЛОБИНА И ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА¹

© 2023 г. М. А. Семенова*, Ж. В. Бочкова*, **, О. М. Смирнова*, А. А. Игнатова*,
Е. Ю. Паршина**, Р. Х. Зиганшин*, Э. В. Бочаров*, Н. А. Браже**, Г. В. Максимов**,
М. П. Кирпичников*, ***, Д. А. Долгих*, ***, Р. В. Чертова*.*

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

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Разработана и оптимизирована эффективная система биосинтеза, выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина человека, позволяющая наработать белок в количествах, достаточных для исследования его свойств. Согласно данным УФ-видимой, ИК-, КД- и ЯМР-спектроскопии, рекомбинантный нейроглобин представляет собой структурированную холоформу белка. Данные хромато-масс-спектрометрического анализа позволили сделать вывод о наличии в структуре окисленной формы белка правильно замкнутой дисульфидной связи. При помощи спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния с лазерным возбуждением 532 нм показано, что гем в восстановленной и окисленной формах нейроглобина имеет колебательные степени свободы, типичные для гемов *b*-типа, а атом железа гексакоординирован. С использованием спектроскопии комбинационного рассеяния с лазерным возбуждением 633 нм выявлено, что в восстановленном нейроглобине присутствуют восстановленные –SH-группы, которые образуют дисульфидный мостик в окисленном нейроглобине. Полученные результаты служат основой для детальных исследований механизма функционирования нейроглобина в качестве нейропротектора, в частности при его взаимодействии с окисленным цитохромом *c*, транслоцирующимся из митохондрий в цитозоль при нарушениях их функционирования и/или морфологии.

Ключевые слова: нейроглобин, рекомбинантные белки, гемсодержащие белки, глобины

DOI: 10.31857/S013234232303020X, **EDN:** PEAUKB

ВВЕДЕНИЕ

Гемсодержащий белок нейроглобин (Ngb) из семейства глобинов, ближайший структурный аналог миоглобина (Mb), обнаружен в нейронах центральной и периферической нервной системы млекопитающих около двадцати лет назад [1]. В тканях общая концентрация нейроглобина существенно ниже, чем миоглобина, однако может достигать значительно более высоких concentra-

ций в нейронах гипоталамуса [2] и в стержневых клетках сетчатки (до ~100 мкМ) [3]. Нейроглобин представляет собой мономерный белок из 151 а.о., массой ~17 кДа, состоящий из восьми α -спиралей (A–H), с известной пространственной структурой и внутримолекулярной дисульфидной связью (Cys46–Cys55) [1, 4]. Полипептидная цепь Ngb связана координационными связями с кофактором – гемопорфирином IX. Основная характерная особенность, отличающая Ngb от гемоглобина и Mb, – преимущественно гексакоординированная форма (в отсутствие внешних лигандов), хотя известна форма с пятью координационными связями между гемопорфирином и полипептидной цепью, придающая белку типичную глобиновую реактивность [5]. Аминокислотные последовательности Ngb позвоночных отличаются высокой межвидовой консервативностью и схожи с нейроглобинами

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: САА – хлорацетамид; Сут *c* – митохондриальный цитохром *c*; Mb – миоглобин; Ngb – нейроглобин; ТСЕР – трис(2-карбоксиэтил)фосфин; ГКР – гигантское комбинационное рассеяние; КД – круговой дихроизм; КР – комбинационное рассеяние.

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

беспозвоночных [6], что свидетельствует о специфической и важной роли этого глобина в нервной системе животных *in vivo*. Подобно гемоглобину и миоглобину, Ngb обратимо связывает O_2 и другие газообразные лиганды. Дезоксиформа восстановленного Ngb мыши превращает нитрит в NO со скоростью, аналогичной скорости Mb [7], но Ngb человека, по-видимому, медленнее катализирует эту реакцию [8]. Физиологическую роль Ngb подробно исследовали в ранних работах, и было обнаружено, что в нейронах головного мозга этот белок играет нейропротекторную роль, снижает количество апоптотических клеток, т.е. проявляет свойства антиапоптотического фактора [9–11].

Таким образом, Ngb обладает существенным потенциалом практического применения в качестве основы для рационального дизайна биомедицинских препаратов с улучшенными антиапоптотическими свойствами, действие которых направлено на ингибирование гибели нейрональных клеток. Подобные препараты могут быть чрезвычайно востребованы в качестве терапевтических средств как при патологических состояниях (нейродегенеративных заболеваниях, инсультах, ишемиях и гипоксиях различного генеза), так и для замедления физиологического старения. Препараты на основе Ngb могут найти применение в терапии дегенеративных заболеваний глаз, таких как глаукома, а также при различных травмах, связанных с нарушением целостности нервных тканей. Кроме того, исследования Ngb могут открыть новые перспективы и в других активно развивающихся областях применения гемосодержащих и электронтранспортных белков, например, в биомолекулярной электронике, а также для создания различных детекторов и сенсорных систем.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе нейропротекторной функции Ngb, выступают предметом больших споров [12, 13] и остаются малоизученными по сей день. Одна из гипотез механизмов антиапоптотической функции нейроглобина базируется на взаимодействии Ngb с цитохромом *c* (Cyt *c*) — гемосодержащим белком, в норме выступающим переносчиком электронов между комплексами III и IV дыхательной цепи (электронтранспортной, ЭТЦ) митохондрий и выходящим в цитоплазму при нарушении их работы. В результате взаимодействия Ngb и Cyt *c* блокируется запуск апоптоза по Cyt *c*-зависимому пути [12]. При этом ни точные механизмы этого взаимодействия, ни структура реакционного комплекса Ngb—Cyt *c* не установлены. Таким образом, актуальна задача выяснения механизмов взаимодействия Ngb с Cyt *c* как основы антиапоптотической функции Ngb. Для осуществления данной задачи необходима высокоэффективная система биосинтеза для наработки препаративных количеств водорастворимой холоформы Ngb с подтвержденными физико-химическими свойствами.

Цель настоящего исследования — разработка и оптимизация эффективной системы биосинтеза, выделения и очистки холоформы рекомбинантного Ngb человека в препаративных количествах и исследование физико-химических свойств полученного белка методами спектроскопии: в УФ-видимой области, кругового дихроизма (КД), комбинационного рассеяния и гигантского комбинационного рассеяния (КР и ГКР соответственно), инфракрасной (ИК), ЯМР и хромато-масс-спектрометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез, схема выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина. К настоящему моменту известны несколько систем биосинтеза рекомбинантного Ngb [1, 5, 14, 15] в бактериальных штаммах-продуцентах. Однако они не в полной мере учитывают необходимость получения белка Ngb с корректно замкнутой дисульфидной связью (Cys46—Cys55), в связи с чем в работах исследуют либо мутант Ngb с заменой а.о. Cys46, Cys55, Cys120 на Gly и Ser [4, 5, 16], либо Ngb мыши [1, 5, 17], который отличается от Ngb человека отсутствием дисульфидного мостика в связи с заменой Cys46 на Gly [1]. Молекула Ngb содержит 3 а.о. цистеина: Cys46, Cys55 и Cys120, два из которых образуют внутримолекулярную дисульфидную связь (Cys46—Cys55), при этом Cys120 остается свободным [1, 4, 18]. Образование других внутримолекулярных дисульфидных связей в Ngb с участием Cys120 и Cys46 или Cys55 стерически невозможно [18, 19]. Несомненное значение дисульфидной связи Ngb человека определяется ее участием в формировании правильной вторичной структуры CD-петли и модулированием функциональной активности данного белка. В отсутствие дисульфидного мостика происходит укрепление связи между гемом и дистальным гистидином (His64), что снижает эффективность связывания внешних лигандов Ngb, т.к. диссоциация His64 от гемовой группы — необходимая и лимитирующая стадия реакции связывания Ngb с внешними лигандами [18]. Кроме того, S—S-связь Ngb значительно влияет на термодинамические параметры реакции восстановления гемового железа Ngb, таким образом модулируя активность Ngb как участника окислительно-восстановительных реакций [15].

Биосинтез рекомбинантного Ngb осуществляли в бактериальной системе *Escherichia coli*, для этого был выбран штамм SHuffle T7. Отличительная черта этого штамма — возможность наработки рекомбинантных белков с корректно замкнутыми дисульфидными связями [20], образование которых в клетках этого штамма достигается за счет делеций генов глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы. В норме продукты этих генов содержатся в цитоплазме клеток бактерий и препятствуют образованию дисульфидных связей. Кроме то-

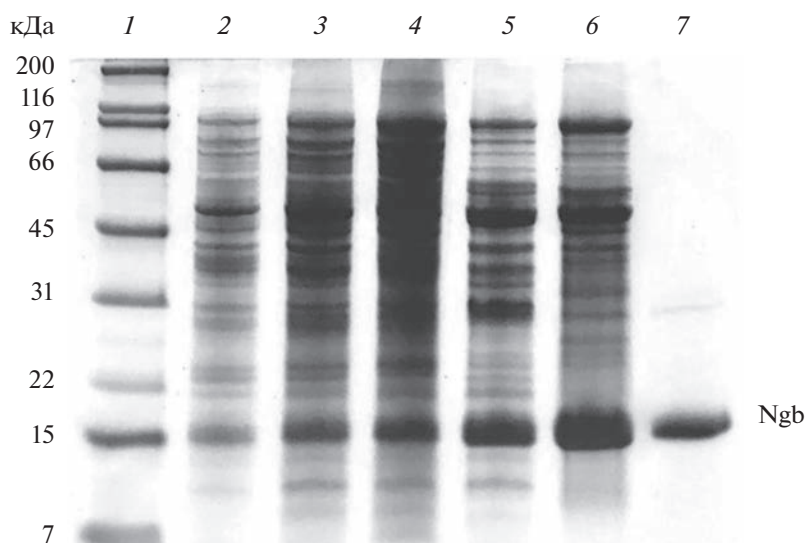


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 12%-ном SDS-ПААГ (Tris-трициновая буферная система): 1 — стандарт молекулярных масс 7–200 кДа (Bio-Rad, США); 2 — суммарный белок клеток штамма-продуцента Ngb по окончании экспрессии; 3 — клеточный лизат после гомогенизации; 4 — ресуспендированный суммарный белок после высаливания; 5 — объединенные фракции с Ngb после анионообменной хроматографии; 6 — объединенные фракции с Ngb после повторного высаливания; 7 — очищенный препарат Ngb после гель-фильтрации.

го, штамм SHuffle T7 конститутивно продуцирует дисульфидизомеразу DsbC, которая способствует корректному замыканию S–S-связей, а также обладает шапероноподобными свойствами. Таким образом, этот штамм оптимален для продукции рекомбинантного Ngb, содержащего функционально активную дисульфидную связь.

В ходе оптимизации биосинтеза водорастворимой холоформы белка в бактериальных клетках проведен ряд экспериментов, в которых варьировались такие параметры, как состав ростовой среды, температура (25–37°C) и продолжительность инкубирования культуры штамма-продуцента (18–48 ч) (данные не приведены). В результате были подобраны оптимальные условия экспрессии гена Ngb: температура инкубирования 28°C, продолжительность экспрессии 24 ч, среда культивирования ТВ (в отсутствие индуктора экспрессии), при которых наблюдался высокий уровень наработки рекомбинантного Ngb (рис. 1, дорожка 2; рис. 2, врезка). При увеличении/уменьшении температуры или продолжительности инкубирования культуры клеток наблюдалось значительное снижение выхода белка.

На основе литературных данных [1, 5, 14, 15] разработан и оптимизирован протокол выделения и очистки рекомбинантного Ngb в виде холоформы. После гомогенизации клеточной биомассы с последующим удалением клеточного дебриса Ngb осаждали из супернатанта (рис. 1, дорожка 3) с помощью процедуры высаливания сульфатом аммония до 60%-ного насыщения (рис. 1, дорожка 4). На следующей стадии очистки белка ис-

пользовали анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом МР HQ (рис. 1, дорожка 5). После этого проводили повторную процедуру высаливания с целью концентрирования препарата белка для нанесения на гель-фильтрационную колонку с Sephadex G-75 (рис. 1, дорожка 6). Выход белка, полученного при помощи разработанной схемы, в среднем составлял 8–10 мг с 1 л культуры клеток штамма-продуцента.

Гомогенность белка была подтверждена с помощью гель-электрофоретического анализа (рис. 1, дорожка 7) и спектрофотометрически в УФ-видимой области. Получены характерные спектры поглощения окисленной и восстановленной форм Ngb с максимумами при 412 и 424 нм соответственно (рис. 2), что подтверждает наличие правильно встроенного в белковую молекулу гемопорфирина.

КД-спектроскопия. На рис. 3а приведен КД-спектр Ngb в дальней УФ-области (190–250 нм) при двух разных концентрациях (1.0 и 0.2 мг/мл). Ранее было показано [21], что при низких концентрациях Ngb (~0.2 мг/мл) содержание α -спиралей, рассчитанное по полученным КД-спектрам, соответствует теоретически ожидаемому, тогда как при высоких концентрациях (~1.0 мг/мл) содержание α -спиралей уменьшается более чем вдвое. Авторы связывали данное явление с образованием димеров Ngb, мешающих получению корректных спектров. Однако нами эти результаты не были подтверждены: содержание α -спиралей при разных концентрациях существенно не изменялось и составляло 72.8% при концентрации 1.0 мг/мл и 70.3% при концентрации 0.2 мг/мл, что соответ-

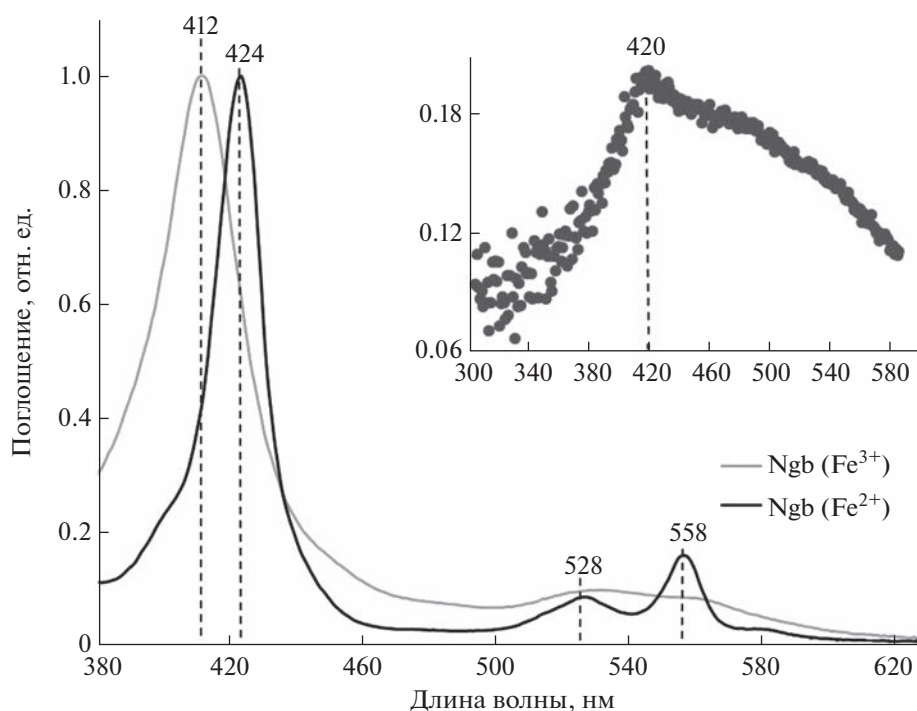


Рис. 2. Спектры поглощения в УФ-видимой области окисленной и восстановленной форм рекомбинантного Ngb. На врезке показан спектр поглощения, представляющий собой разность между спектром поглощения клеточной суспензии *E. coli* штамма-продуцента, активно синтезирующего Ngb, и спектром поглощения клеточной суспензии *E. coli* нетрансформированного штамма.

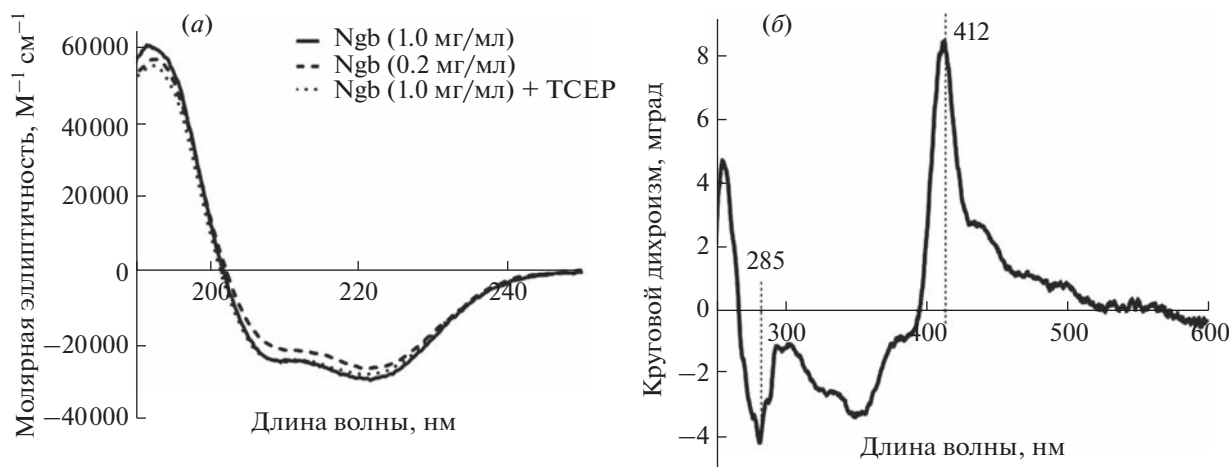


Рис. 3. Спектры КД рекомбинантного Ngb: (а) — в дальней УФ-области; (б) — в ближней УФ- и видимой областях.

ствуется расчетным данным для вторичной структуры Ngb (табл. 1). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что разработанная нами система наработки Ngb позволяет снизить содержание димеров Ngb по сравнению с системами, предложенными ранее.

Добавление к препарату Ngb восстановительного агента ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфин) (рис. 3а), в результате чего происходит разрыв как неспецифических межмолекулярных, так

и внутримолекулярных дисульфидных связей, вызывало изменение состава вторичной структуры Ngb (рис. 3а, табл. 1). После восстановления при помощи ТСЕР содержание α -спиралей снизилось с 72.8 до 69.1%, а содержание неупорядоченной структуры и β -поворота, напротив, повысилось с 17.1 до 19.2% и с 8.0 до 9.1% соответственно (табл. 1). Известно, что внутримолекулярная дисульфидная связь Ngb Cys46–Cys55 (CD5–D5) способствует укладке CD-петли в α -спираль. В

Таблица 1. Анализ вторичной структуры рекомбинантного Ngb

Образец	α -Спираль, %	β -Складчатый слой, %	β -Поворот, %	Неупорядоченная структура, %	NRMSD*
Ngb (1.0 мг/мл)	72.8	2.2	8.0	17.1	0.02
Ngb (0.2 мг/мл)	70.3	3.6	8.9	17.2	0.01
Ngb (1.0 мг/мл) + TCEP	69.1	2.6	9.1	19.2	0.01

* 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. [22], значение NRMSD в расчетах должно быть <0.1 , что свидетельствует о высокой достоверности расчетов.

случае восстановленной S—S-связи CD-петля представляет собой сочетание β -поворота и неупорядоченной структуры [15]. Таким образом, данные результаты могут свидетельствовать о наличии S—S-связи в структуре рекомбинантного Ngb.

На рис. 3б приведен КД-спектр Ngb в ближней УФ и видимой областях (250–600 нм). Известно, что пик при 285 нм на КД-спектрах гемоглобинов имеет положительные значения в случае, когда белок связан с лигандом (например, молекулярный кислород), и отрицательные при отсутствии связи с лигандом [23]. Наличие данного пика определяется положением ароматических аминокислот; в случае Ngb, вероятнее всего, наибольший вклад вносит остаток Туг44, положение которого относительно гемовой впадины влияет на доступность гема для внешних лигандов [18]. Для Ngb пик при 285 нм имеет отрицательное значение, что соответствует его окисленному состоянию без лиганда. Пик в области 412 нм дополнительно подтверждает наличие правильно встроенной гемовой группы в белковой молекуле рекомбинантного Ngb. Таким образом, полученные результаты согласуются с данными о вторичной структуре Ngb [4, 21] и косвенно подтверждают наличие дисульфидной связи в структуре рекомбинантного Ngb.

Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния. При помощи спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) была исследована конформация гемовой части изолированного рекомбинантного Ngb в восстановленной и окисленной формах соответственно (рис. 4). Как и в случае цитохромов, окисленный Ngb обладает сигналом КР низкой интенсивности, поэтому для усиления его КР были использованы плазмонные серебряные наноструктурированные поверхности, полученные при помощи метода, описанного ранее [24, 25]. При возбуждении лазером с длиной волны 532 нм на спектрах КР и ГКР, полученных для растворов Ngb (Fe^{2+}) и Ngb (Fe^{3+}) соответственно, выявлены характерные пики, связанные с колебаниями атомов в восстановленном и окисленном геме (табл. 2) (указаны положения максимумов пиков): 748 (колебания всех связей в геме), 1129–1130 (колебания метиль-

ных радикалов), 1306, 1342 и 1586 см^{-1} (колебания метиновых мостиков). Пики 1306 и 1342 см^{-1} — специфические пики, они присущи только гемам *b*-типа, что отличает спектры КР/ГКР белков, содержащих гем *b*-типа, от спектров белков, содержащих гем *c*-типа [31–33]. Кроме того, в КР-спектрах восстановленного Ngb присутствует характерный пик с положением максимума 1368 см^{-1} (“дыхание” пирролов), который сдвигается в положение 1375 см^{-1} в спектре окисленного Ngb. Также в спектре окисленного Ngb присутствует пик с положением максимума 1638 см^{-1} (колебания метиновых мостиков), который сдвигается в более низкочастотную область при восстановлении Ngb и сливается с более широким пиком с максимумом 1586 см^{-1} . Подобный сдвиг пиков при изменении редокс-состояния хорошо известен для гемсодержащих белков типа цитохромов, миоглобина и гемоглобина. Особенностью спектров Ngb также выступает то, что интенсивности пиков с положениями максимумов 748, 1129–1130, 1306, 1342 и 1586 см^{-1} существенно увеличиваются при восстановлении Ngb. Подобный эффект наблюдается для восстановленных цитохромов *c*- и *b*-типов, но не для мио- или гемоглобинов [31, 33].

Пик 1499 см^{-1} на спектрах Ngb (Fe^{2+}) характерен для гексакоординированного низкоспинового состояния гемового железа. Дополнительно гексакоординированность гемового железа подтверждает отсутствие пика в области 200–250 см^{-1} , характерного для пентакоординированного состояния [34, 35].

При возбуждении лазером с длиной волны 633 нм детектируются сигналы от белковой части Ngb, поскольку гемы *b*-типа не дают КР-спектр при возбуждении данным лазером. На рис. 5 показан разностный спектр, полученный путем вычитания КР-спектра окисленного Ngb из КР-спектра восстановленного Ngb. Такой подход был использован в связи с тем, что КР-спектры белка Ngb при данной длине волны возбуждения обладают низкой интенсивностью, а разностный спектр позволяет более точно локализовать области, в которых наблюдаются отличия. В исследуемом спектральном диапазоне наблюдаются пики с положениями максимумов 670 и 747 см^{-1} . Пик 670 см^{-1} ха-

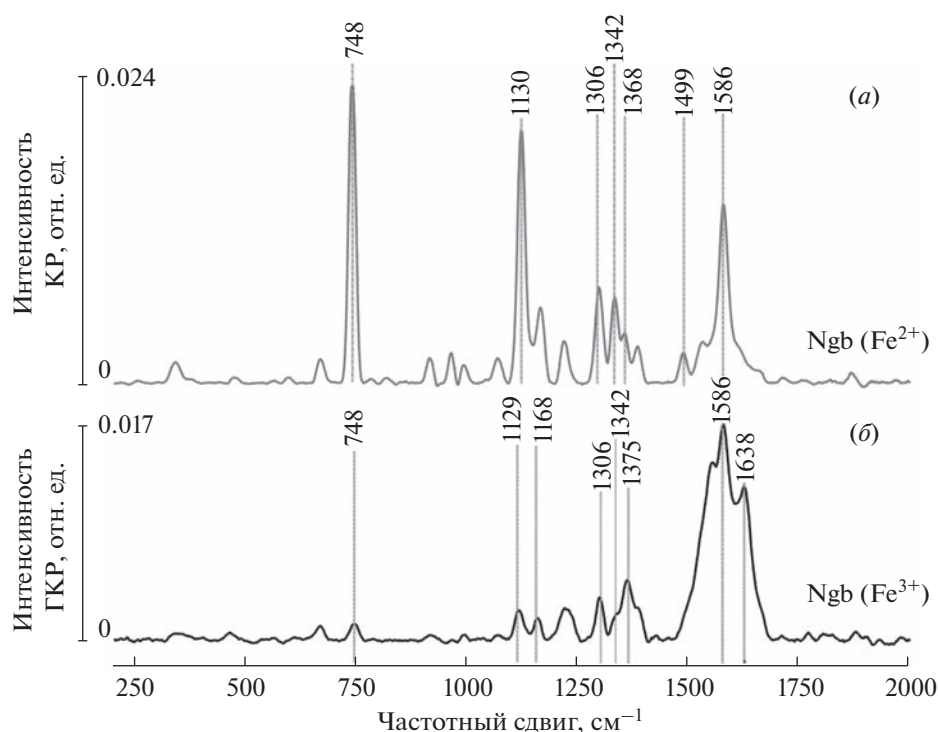


Рис. 4. (а) – Спектр ГКР нейроглобина (Fe^{3+} , 0,25 мМ), (б) – спектр КР нейроглобина (Fe^{2+} , 1,0 мМ) при лазерном возбуждении 532 нм. Для более удобного представления спектры нормированы на суммарную интенсивность соответствующего спектра.

Таблица 2. Описание основных пиков на спектре ГКР нейроглобина (Fe^{3+}) и на спектре КР нейроглобина (Fe^{2+}) при возбуждении лазером 532 нм

Значение частотного сдвига, см^{-1}		Характеристика	Источник
окисленная форма Ngb	восстановленная форма Ngb		
748 (w)	748 (vs)	Все связи в геме, “дыхание” порфирина	[26, 27]
1129 (m)	1130 (vs)	Колебание боковых радикалов C_bCH_3	[27]
1168 (w)	1168 (s)	Асимметричное колебание пиррольных колец	[27]
1342	1342 (s)	Все связи в геме, характерен только для гема b-типа	[28, 29]
Отсутствует	1368 (w)	“Дыхание” пирролов, симметричные колебания групп C_aN , C_aC_b в восстановленном геме (Fe^{2+})	[30]
1375 (m)	Отсутствует	“Дыхание” пирролов, симметричные колебания групп C_aN , C_aC_b в окисленном геме (Fe^{3+})	[27, 30]
1586 (vs)	1586 (vs)	Колебания метиновых мостиков: групп C_aC_m , $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$	[30]
1638 (vs)	Отсутствует	Колебания групп C_aC_m , $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$, C_aC_b в окисленном геме	[28]

Примечание: vs – очень интенсивный пик, s – интенсивный пик, m – пик средней интенсивности, w – пик низкой интенсивности. C_a – атом углерода в пиррольном кольце, связанный с азотом; C_b – атом углерода в пиррольном кольце, связанный с радикалами; C_m – атом углерода в метиновом мостике, связанный с углеродами пиррольных колец.

рактизует колебания связей C–S или S–H в цистеиновых остатках Ngb. Данная особенность разностного спектра свидетельствует о том, что в восстановленном Ngb Cys46 и Cys55 находятся в

свободном состоянии, тогда как в окисленной форме между ними образуется дисульфидный мостик Cys46–Cys55 [36]. Наличие пика с положением 747 см^{-1} в разностном спектре говорит об

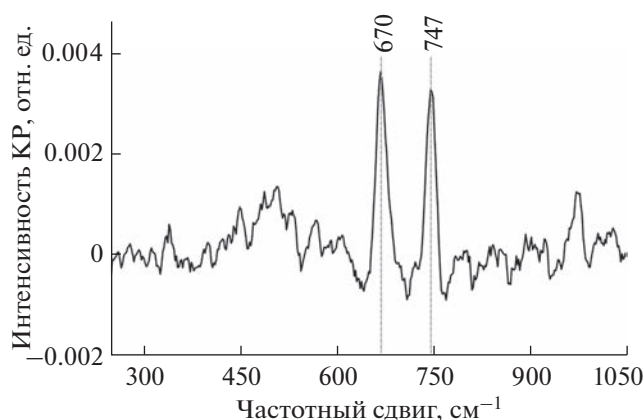


Рис. 5. Разностный спектр КР нейроглобина (1.0 мМ) при лазерном возбуждении 633 нм, полученный вычитанием нормированного КР-спектра Ngb (Fe³⁺) из нормированного КР-спектра Ngb (Fe²⁺).

отличиях в колебании связей C—N в белковой части восстановленного и окисленного Ngb, что может быть связано с отличием в конформации белка или в изменении взаимного расположения α -спиралей при переходе Ngb между редокс-формами.

ИК-спектроскопия. На рис. 6 представлен ИК-спектр растворенного в фосфатном буфере изолированного рекомбинантного Ngb. Пик 1651 см⁻¹ (Амид I) обусловлен колебаниями связей C=O в полипептидной цепи и характерен для α -спиральной укладки белка [37]. Характерный пик 1552 см⁻¹ в области полосы Амида II, соответствующий N—H- и C—N-колебаниям пептидных связей, несимметричным колебаниям карбоксильных групп (COO⁻) [38, 39], также может свидетельствовать в пользу α -спиральной структуры [40]. Пик 1244 см⁻¹ в области Амида III соответствует колебаниям длины пептидных связей C—N, а также деформационным колебаниям боковых цепей OH и NH аминокислотных остатков [41, 42]. Изменение интенсивности данных пиков на ИК-спектрах, а также их смещение наблюдается при межмолекулярных взаимодействиях белков [41].

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Установление порядка замыкания S—S-связей в рекомбинантном нейроглобине проводили с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа Cys-содержащих пептидных фрагментов, полученных путем трипсинолиза рекомбинантного Ngb, модифицированного хлорацетамидом (CAA). Остатки Cys в Ngb карбамидометилировали как в отсутствие, так и в присутствии восстановителя дисульфидных связей ТСЕР. Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа пептидных продуктов трипсинолиза приведены в табл. 3. Нетрудно заметить, что в отсутствие восстановителя ТСЕР содержание CAA-модифицированного пептида CLGPAFTPATR (Cys120–130)

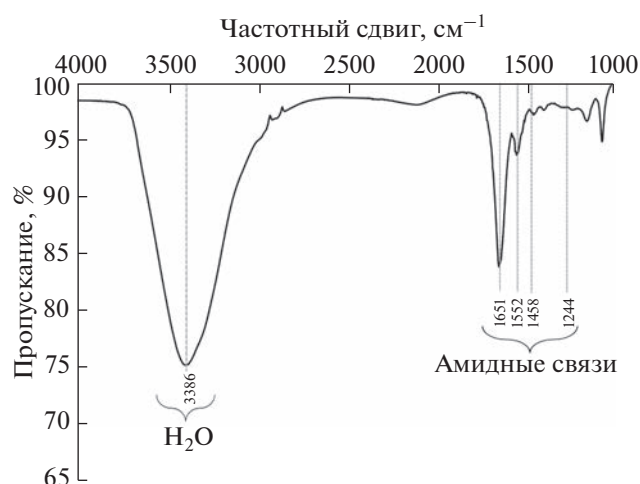


Рис. 6. ИК-спектр окисленного Ngb (1.0 мМ). В ИК-спектре присутствуют характерные пики в области колебаний пептидных связей: полоса Амид I (1651 см⁻¹), Амид II (1552–1458 см⁻¹) и Амид III (1244 см⁻¹).

существенно превышает содержание пептидов: QFSSPEDCLSSPEFLDHIR (48-Cys55–66) — в 2.5 раза и QFSSPEDCLSSPEFLDHIRK (48-Cys55–67) — в 110 раз. В то же время в присутствии ТСЕР содержание пептида (Cys120–130) ниже на 3 порядка, чем пептида (48-Cys55–66), и на 2 порядка, чем пептида (48-Cys55–67). С учетом того, что образование дисульфидных связей между Cys120 и двумя оставшимися Cys55 и Cys46 стерически невозможно [18, 19], данные результаты свидетельствуют о том, что Cys55 в отсутствие восстановителя находится в связанном S—S-связью состоянии с Cys46, в то время как Cys120 не участвует в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей.

ЯМР-спектроскопия. Характерная дисперсия ЯМР-сигналов на представленных на рис. 7 одномерном ¹H- и двумерном ¹H/¹H-спектрах указывает на то, что рекомбинантный Ngb со встроенным гемом свернут предположительно в нативную конформацию, обогащенную α -спиральной структурой. Вместе с тем присутствие в ЯМР-спектрах одного набора сигналов означает отсутствие белковых примесей и однородность рекомбинантного препарата, что при условии ¹³C, ¹⁵N-изотопного мечення белка позволяет в дальнейшем провести ЯМР-исследования для получения детальной структурно-динамической информации на атомном уровне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы производства фирм AppliChem (Германия), Sigma-Aldrich (США), Serva (США), Fermentas (Латвия), Bio-Rad (США) и Химмед (Россия). Дистиллирован-

Таблица 3. Характеристики идентифицированных Cys-содержащих триптических фрагментов рекомбинантного Ngb, модифицированного хлорацетамидом (CAA)

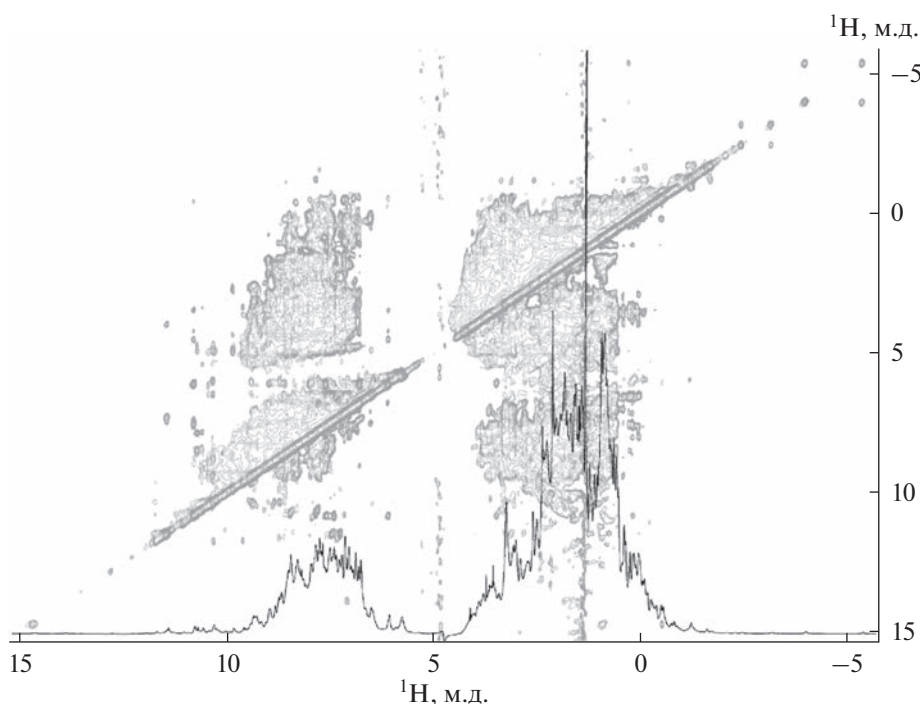
Последовательность пептида	$-10\lg P^{**}$	M	М.д.***	Площадь пика в образце (TCEP + CAA)	Площадь пика в образце (CAA)	Старт [#]	Стоп [#]
LFALPDLLPLFQYNC(+57.02)*R	46.86	2108.076	2.2	1.50×10^6	—	31	47
QFSSPEDC(+57.02)LSSPEFLDHIRK	80.10	2391.117	2.0	7.87×10^8	1.03×10^7	48	67
QFSSPEDC(+57.02)LSSPEFLDHIR	78.16	2263.022	2.8	6.87×10^9	4.58×10^8	48	66
C(+57.02)LGPAFTPATR	62.46	1189.591	2.3	5.39×10^7	1.14×10^9	120	130

* C(+57.02) – карбамидометилованный остаток Cys.

** $-10\lg P$ – величина, характеризующая достоверность идентификации пептида, где P – абсолютная вероятность.

*** М.д. – миллионные доли, отличие массы идентифицированного пептида от ее теоретических значений.

[#] Старт и Стоп – номер N - и C -концевых остатков соответственно пептидного фрагмента в последовательности белка.

**Рис. 7.** Одномерный ^1H - и двумерный $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектры рекомбинантного Ngb (0.5 мМ).

ную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Штаммы бактерий и ростовые среды. В работе использовали штаммы бактерий *E. coli*: SHuffle T7 (NEB, США) и JM-109 (Promega, США). Клетки *E. coli* выращивали в средах LB или TB [23] в зависимости от поставленной задачи. Твердые среды содержали 1.5% агара. При необходимости в среду добавляли антибиотик ампициллин (100–120 мкг/мл).

Генно-инженерные методы. Адаптированная для экспрессии в бактериальных штаммах (*E. coli*) последовательность гена, кодирующего Ngb че-

ловека [43], синтезирована из олигонуклеотидных праймеров в ЗАО “Евроген” (Россия). Полученный ген Ngb встраивали в плазмидный вектор pET-17b (Novagen, США) по сайтам рестрикции Kpn I и Nde I. Выделение плазмидной ДНК, электрофоретический анализ образцов ДНК и трансформацию бактериальных штаммов выполняли по стандартным методикам [44].

Экспрессия рекомбинантного гена. Клетки штамма *E. coli* SHuffle T7, трансформированные плазмидой pET-17b-Ngb, содержащей ген, кодирующий Ngb человека, выращивали в среде Terrific Broth (TB) (12 г/л бактотриптона, 24 г/л

дрожжевого экстракта, 0.04% глицерина и 1/10 объема раствора фосфатов: 0.17 М KH_2PO_4 , 0.72 М K_2HPO_4 , pH 7.4) до значения OD_{595} 0.5–0.6. Экспрессию осуществляли без добавления индуктора при 28°C и встряхивании (220 об/мин) в течение 24 ч, после чего биомассу клеток осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 6000 g.

Выделение и очистка рекомбинантного белка Ngb. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса (25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ NaN_3). Клеточную суспензию гомогенизировали под высоким давлением с помощью установки French Press (Spectronic Instruments, Inc., США). После этого гомогенат центрифугировали при 95000 g и 4°C в течение 20 мин для осаждения клеточного дебриса. Далее Ngb осаждали из супернатанта путем высаливания сульфатом аммония до 60%-ного насыщения и центрифугировали при 50000 g и 4°C в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ NaN_3) и проводили интенсивный диализ против того же буфера. На следующих стадиях очистки белка использовали систему жидкостной хроматографии АКТА FPLC (GE Healthcare, США). Анионообменную хроматографию проводили на колонке с сорбентом MP HQ (Bio-Rad, США). 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 NaN_3 , pH 7.0, и наносили на гель-фильтрационную колонку GL 10/500 (Pharmacia, Швеция) с сорбентом Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеция). Очищенный белок диализовали против буфера 10 мМ NH_4HCO_3 , pH 7.9, затем лиофилизировали и хранили при –20°C.

Аналитические методы. Концентрацию Ngb определяли по поглощению, измеряемому при длине волны 412 нм с использованием спектрофотометра Cary-50 (Varian, США) с учетом расчетного молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{412} = 129000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45]. Для получения спектра клеток штамма-продуцента клетки предварительно отмывали от компонентов среды культивирования в 0.1 М калий-фосфатном буфере, затем ресуспендировали в том же буфере [46]. Регистрировали следующие спектры: 1) спектры суспензии клеток *E. coli* SHuffle T7, активно продуцирующих Ngb; 2) спектры суспензии клеток *E. coli* SHuffle T7, выращенных при тех же условиях, но не трансформированных вектором pET-17b-Ngb. Далее производили вычитание спектра 2 из спектра 1. При этом OD_{595} суспензий клеток *E. coli* SHuffle T7, активно продуцирующих Ngb и не трансформированных вектором, были равными.

Все этапы наработки, выделения и очистки белков контролировали с помощью электрофоре-

за в 12%-ном SDS-ПААГ в Tris-трициновой буферной системе [47].

Спектры КД получали на спектрополяриметре J-810 (JASCO, Япония) в диапазоне 190–250 нм в кювете толщиной 0.01 см, а также в диапазоне 250–600 нм в кювете толщиной 1.0 см при комнатной температуре. Концентрации Ngb в исследуемых образцах составляли 1.0 и 0.2 мг/мл (при измерениях в дальнем УФ) и 0.4 мг/мл (в ближнем УФ и в видимой области). Измерения проводили в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.2. Запись спектров осуществляли с шагом 0.2 нм (скорость сканирования 20 нм/мин) и шириной оптической щели 1 нм, выполняли усреднение по четырем спектрам. Для расчета вторичной структуры использовали программу CONTINLL (пакет CDPPro, Colorado State University, США).

Спектры КР и ГКР получали на КР-микроспектрометре NTEGRA Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия), соединенном с инвертированным микроскопом IX-71 (Olympus, Япония). Лазерное возбуждение 532 нм использовали для регистрации резонансного КР/ГКР от гема восстановленного или окисленного Ngb, а лазерное возбуждение 633 нм — для регистрации КР-спектров от белковой части окисленного и восстановленного Ngb. Мощности лазеров были не более 1 и 3 мВт соответственно. Для получения ГКР-спектра окисленного Ngb раствор белка с концентрацией 0.25 мМ в объеме 30–50 мкл помещали в чашку Петри со стеклянным дном и сверху накрывали стеклом с нанесенной серебряной наноструктурированной поверхностью. Фокусировали лазер на слое жидкости около наноструктурированной поверхности, при этом использовали объектив $\times 20$ с числовой апертурой 0.45; время измерения составляло 30–120 с, диаметр лазерного пятна ~800 нм. Измеряли образцы Ngb с концентрацией 0.25–1 мМ в 30 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6.5, при комнатной температуре. Для получения спектров гема восстановленной формы Ngb на дно стеклянной чашки Петри помещали 30 мкл раствора окисленного Ngb, а затем добавляли избыток кристаллов NADPH. О полном восстановлении Ngb судили по исчезновению пика с положением максимума при 1375 cm^{-1} . Обычно на полное восстановление нейроглобина уходило 1–2 мин после добавления NADPH. В химическом окислении Ngb для получения спектров окисленной формы Ngb не было необходимости, т.к. рекомбинантный Ngb выделяли в полностью окисленном виде. Спектры КР белковой части Ngb получали для исходного раствора окисленного Ngb и для раствора восстановленного Ngb (полученного из окисленного нейроглобина при добавлении NADPH) путем помещения растворов на стеклянное дно чашки Петри без дополнительного использования наноструктур. Для обработки спектров использовали открытое программное обеспечение Pyraman [48].

Синтез наноструктур типа серебряных колец осуществляли по методике, разработанной ранее [25]. Для синтеза растворяли 2.93 г нитрата серебра в 40 мл воды Milli-Q. Также растворяли 7 г NaOH в 30 мл воды и затем приливали тонкой струей при перемешивании к раствору нитрата серебра, при этом выпадал темный осадок. Осадок трижды промывали водой Milli-Q по 100 мл, затем растворяли в 25 мл Milli-Q и 5 мл концентрированного раствора аммиака до исчезновения осадка. Покровные стекла, отмытые в детергенте и выдержанные в течение 5 мин в ультразвуковой ванне, высушивали на воздухе и помещали в термически устойчивый стеклянный стакан на 1 л. Стакан устанавливали на нагревающую поверхность, предварительно разогретую до 380°C. Раствор аммиачного комплекса серебра (30 мл) переливали в емкость ультразвукового распылителя (Альбеда, Россия) и распыляли на поверхность покровных стекол медленными круговыми движениями при нагревании до 380°C, делая перерывы по 5 мин через каждые 3 мин. Расстояние сопла распылителя до покровных стекол составляло 1.5–2.0 см. После распыления стекла выдерживали 15 мин при 400°C, после чего охлаждали и упаковывали в светонепроницаемые капсулы. В результате на стеклах формировались сложные иерархические структуры из металлического серебра. Полученные таким способом наноструктуры сохраняли стабильность в течение нескольких месяцев.

ИК-спектры окисленного Ngb получали на ИК-спектрометре Spectrum Two FT-IR (Perkin Elmer, США). Измеряли образцы окисленного Ngb с концентрацией 1.0 мМ в 30 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6.5, при комнатной температуре. Для вычитания базовой линии и дальнейшей обработки спектров использовали программу SpectraGryph (США). Спектр Ngb получали вычитанием нормированного по пику 3386 см⁻¹ спектра воды из нормированного спектра раствора Ngb.

Получение Cys-САА-модифицированных триптических фрагментов рекомбинантного Ngb. Навески по 10 мкг рекомбинантного Ngb растворяли в буферных растворах, содержащих следующие компоненты: 1) 100 мМ Tris, pH 8.5, 10 мМ ТСЕР и 20 мМ хлорацетамида (САА); 2) 100 мМ Tris, pH 8.5, 20 мМ САА. После инкубации в течение 1 ч при 37°C к образцам добавляли трипсин в весовом соотношении 1 : 100 по отношению к гидролизуемому белку. После инкубации рекомбинантного белка при 37°C в течение ночи полученный гидролизат анализировали методом хромато-масс-спектрометрии.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Исследуемые образцы загружали на изготовленную в лаборатории предколонку 50 × 0.1 мм, упакованную сорбентом Inertsil ODS3 3 μm (GL Sciences, Япония), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% H₂O, 0.1% ТФУ, при скорости потока 4 мкл/мин и разделяли при комнатной

температуре на колонке из плавленного кварца 300 × 0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и упакованной в лаборатории сорбентом Reprosil PUR C18AQ 1.9 (Dr. Maisch, Германия). Обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific, США). Для хроматографического разделения пептидов использовали системы растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3% Б 3 мин, 3–6% Б за 2 мин; 6–30% Б за 50 мин, 30–55% Б за 10 мин, 55% Б 2 мин, 55–99% Б за 0.1 мин, 99% Б 2 мин, 99–3% Б за 0.1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN = 10) со следующими настройками прибора: MS1-сканирование — разрешение 70000, диапазон сканирования 200–1600 *m/z*, максимальное время инъекции ионов 35 мс, уровень AGC 3 × 10⁶, MS2-сканирование — разрешение 17500, HCD-фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов 80 мс, уровень AGC 1 × 10⁵.

ЯМР-спектроскопия. Готовили раствор рекомбинантного Ngb с концентрацией 0.5 мМ в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 20 мМ NaCl и 5% D₂O, и помещали в 5-мм ЯМР-ампулу. Одномерный ¹H- и двумерный ¹H/¹H-NOESY- (время смешивания 100 мс) спектры накапливали при 30°C на спектрометре AVANCE 600 (Bruker, Германия) с рабочей частотой на протонах 600 МГц, оборудованном криогенно охлаждаемым датчиком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и оптимизирована эффективная система биосинтеза, выделения и очистки рекомбинантного нейроглобина человека, которая позволила наработать Ngb в количествах, достаточных для анализа его физико-химических свойств, а также дальнейшего детального исследования функциональных свойств. Согласно данным УФ-видимой, ИК- и КД- и ЯМР-спектроскопии, рекомбинантный Ngb представляет собой правильно структурированную холоформу белка. Получены характеристические спектры КР и ГКР гема для восстановленной и окисленной форм Ngb соответственно. Данные результаты служат основой для дальнейших исследований механизма нейротекторной функции Ngb при его взаимодействии с митохондриальным Cyt c.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00985).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T.* // *Nature*. 2000. V. 407. P. 520–523. <https://doi.org/10.1038/35035093>
2. *Hundahl C.A., Allen G.C., Hannibal J., Kjaer K., Rehfeld J.F., Dewilde S., Nyengaard J.R., Kelsen J., Hay-Schmidt A.* // *Brain Res.* 2010. V. 17. P. 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.056>
3. *Bentmann A., Schmidt M., Reuss S., Wolfrum U., Hankeln T., Burmester T.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 20660–20665. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501338200>
4. *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)
5. *Dewilde S., Kiger L., Burmester T., Hankeln T., Baudin-Creux V., Aerts T., Marden M.C., Caubergs R., Moens L.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 38949–38955. <https://doi.org/10.1074/jbc.m106438200>
6. *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>
7. *Petersen M.G., Dewilde S., Fago A.* // *J. Inorg. Biochem.* 2008. V. 102. P. 1777–1782. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.05.008>
8. *Tiso M., Tejero J., Basu S., Azarov I., Wang X., Simplaceanu V., Frizzell S., Jayaraman T., Geary L., Shapiro C., Ho C., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 18277–18289. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.159541>
9. *Brittain T., Skommer J., Henty K., Birch N., Raychaudhuri S.* // *IUBMB Life*. 2010. V. 62. P. 878–885. <https://doi.org/10.1002/iub.405>
10. *Burmester T., Hankeln T.* // *Acta Physiol. (Oxf)*. 2014. V. 211. P. 501–514. <https://doi.org/10.1111/apha.12312>
11. *Guidolin D., Tortorella C., Marcoli M., Maura G., Agnati L.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 1817. <https://doi.org/10.3390/ijms17111817>
12. *Brittain C., Bommarco R., Vighi M., Barmaz S., Settele J., Potts S.G.* // *Agricult. For. Entomol.* 2010. V. 12. P. 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00485.x>
13. *Burmester T., Hankeln T.* // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. P. 1423–1428. <https://doi.org/10.1242/jeb.000729>
14. *Dewilde S., Mees K., Kiger L., Lechauve C., Marden M.C., Pesce S., Bolognesi M., Moens L.* // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 341–357. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(08\)36019-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(08)36019-4)
15. *Belleia M., Bortolotta C.A., Roccoa G.D., Borsarib M., Lancellottib L., Ranieria A., Solaa M., Battistuzzi G.* // *J. Inorg. Biochem.* 2018. V. 178. P. 70–86. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.005>
16. *Hamdane D., Kiger L., Dewilde S., Green B.N., Pesce A., Uzan J., Burmester T., Hankeln T., Bolognesi M., Moens L., Marden M.C.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 51713–51721. <https://doi.org/10.1074/jbc.m309396200>
17. *Fago A., Mathews A.J., Moens L., Dewilde S., Brettain T.* // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 4884–4888. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.003>
18. *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>
19. *Hamdane D., Kiger L., Dewilde S., Green B.N., Pesce A., Uzan J., Burmester T., Hankeln T., Bolognesi M., Moens L., Marden M.C.* // *Micron*. 2004. V. 35. P. 59–62. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.019>
20. *Lobstein J., Emrich C.A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P., Berkmen M.* // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. P. 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
21. *Chao Z., Lianzhi L., Li W., Haiwei J.* // *Chinese Sci. Bull.* 2006. V. 51. P. 2581–2585. <https://doi.org/10.1007/s11434-006-2144-7>
22. *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>
23. *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)
24. *Chertkova R.V., Firsov A.M., Brazhe N.A., Nikelshparg E.I., Bochkova Z.V., Bryntseva T.V., Semenova M.A., Baizhumanov A.A., Kotova E.A., Kirpichnikov M.P., Maksimov G.V., Antonenko Y.N., Dolgikh D.A.* // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 665. <https://doi.org/10.3390/biom12050665>
25. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Lebedev V.A., Goldt A.E., Sosnovtseva O.V., Savilov S.V., Egorov A.V., Brazhe A.R., Pershina E.Y., Luneva O.G., Maksimov G.V., Tretyakov Y.D.* // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. P. 24530–24544. <https://doi.org/10.1039/C2JM34686A>
26. *Rygula A., Majzner K., Marzec K.M., Kaczor A., Pilarczyk M., Baranska M.* // *J. Raman Spectrosc.* 2013. V. 44. P. 1061–1076. <https://doi.org/10.1002/JRS.4335>
27. *Brazhe N.A., Treiman M., Brazhe A.R., Find N.L., Maksimov G.V., Sosnovtseva O.V.* // *PLoS One*. V. 7. P. e41990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041990>
28. *Kakita M., Kaliaperumal V., Hamaguchi H.* // *J. Biophotonics*. 2011. V. 5. P. 20–24. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100087>
29. *Buzgar N., Buzatu A., Sanislav I.* // *An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi. Geol.* 2009. V. 55. P. 5–23.

30. Hu S., Morris I.K., Singh J.P., Smith K.M., Spiro T.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 12446–12458. <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>
31. Brazhe N.A., Treiman M., Faricelli B., Vestergaard J.H., Sosnovtseva O.V. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e70488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070488>
32. Chertkova R.V., Brazhe N.A., Bryntseva T.V., Nekrasov A.N., Dolgikh D.A., Yusipovich A.I., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P. // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0266695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266695>
33. Ogawa M., Harada Y., Yamaoka Y., Fujita K., Yaku H., Takamatsu T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 382. P. 370–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.028>
34. Couture M., Burmester T., Hankeln T., Rousseau D.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 36377–36382. <https://doi.org/10.1074/jbc.m103907200>
35. Couture M., Das T.K., Savard P.Y., Ouellet Y., Wittenberg J.B., Wittenberg B.A., Rousseau D.L., Guertin M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 4770–4780. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01531.x>
36. Bazylewski P., Divigalpitiya R., Fanchini G. // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 2964–2970. <https://doi.org/10.1039/C6RA25879D>
37. Dong A., Huang P., Caughey W.S. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 3303–3308. <https://doi.org/10.1021/bi00465a022>
38. Moss D., Nabadryk E., Breton J., Mantele W. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 187. P. 565–572. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15338.x>
39. Sun Y., Benabbas A., Zeng W., Kleingardner J.G., Bren K.L., Champion P.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 6570–6575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322274111>
40. Venyaminov S.Y., Kalnin N.N. // *Biopolymers*. 1990. V. 30. P. 1259–1271. <https://doi.org/10.1002/bip.360301310>
41. Тен Г.Н., Герасименко А.Ю., Щербакова Н.Е., Баранов В.И. // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2019. Т. 19. С. 43–57.
42. Nucara A., Maselli P., Giliberti V., Carbonaro M. // *SpringerPlus*. 2013. V. 2. P. 661. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-661>
43. STAT5A (NM_003152) Human Tagged ORF Clone. https://www.origene.com/catalog/cdna-clones/expression-plasmids/rc207482/neuroglobin-ngb-nm_021257-human-tagged-orf-clone
44. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989.
45. 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>
46. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F. // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 7207. <https://doi.org/10.3390/molecules26237207>
47. 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)
48. Brazhe A.R. <https://github.com/abrazhe/pyraman>

Development of a System for Biosynthesis, Isolation and Purification of Holoform of Recombinant Human Neuroglobin and Its Characteristics

M. A. Semenova*, Z. V. Bochkova*, **, O. M. Smirnova*, A. A. Ignatova*, E. Y. Parshina, R. H. Ziganshin*, E. V. Bocharov*, N. A. Brazhe**, G. V. Maksimov**, 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

**Biophysics Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

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

An efficient system for the biosynthesis, isolation and purification of recombinant human neuroglobin has been developed and optimized, which makes it possible to produce protein in quantities sufficient to study its properties. According to UV-visible, IR-, CD-, and NMR spectroscopy data, recombinant neuroglobin is a structured protein in the holoform state. The data of chromato-mass-spectrometric analysis made it possible to conclude that there is a correctly formed disulfide bond in the structure of the oxidized form of the protein. Using Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy with laser excitation at 532 nm, it was shown that heme in the reduced and oxidized forms of neuroglobin has vibrational degrees of freedom typical of *b*-type hemes, and the iron atom is six-coordinated. Using Raman spectroscopy with laser excitation at 633 nm, it was found that reduced –SH-groups were present in reduced neuroglobin, while in oxidized neuroglobin disulfide bridge was formed. The results obtained serve as the basis for detailed studies of the mechanism of the functioning of neuroglobin as a neuroprotector, in particular, during its interaction with oxidized cytochrome *c*, which is released from mitochondria in violation of their functioning and/or morphology.

Keywords: neuroglobin, recombinant proteins, heme-containing proteins, globins