

УДК 575.111

СТРУКТУРА НЕЙРОГЛОБИНА ХОЛОДНОВОДНОЙ ГУБКИ *Halisarca dujardinii*

© 2020 г. К. И. Адамейко^а, О. И. Кравчук^{а, *}, А. Д. Фиошин^а, А. Н. Бончук^б,
А. А. Георгиев^с, В. С. Михайлов^а, Н. Г. Горностаев^а, К. В. Михайлов^{с, d},
А. В. Бачева^с, М. И. Индейкина^е, А. Е. Бугрова^е, Г. Р. Газизова^а,
О. С. Козлова^а, О. А. Гусев^{г, s}, Е. И. Шагимарданова^а, Ю. В. Люпина^а

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^бИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^dИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051 Россия

^еИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^гКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

^sKFU-RIKEN Translational Genomics Unit, RIKEN, Yokohama, 230-0045 Japan

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Поступила в редакцию 23.10.2019 г.

После доработки 22.11.2019 г.

Принята к публикации 02.12.2019 г.

Железосодержащий белок нейроглобин (Ngb), участвующий в транспорте кислорода, считается предшественником всех глобиновых белков животных. В настоящей работе изучена структура Ngb холодноводной губки *Halisarca dujardinii*. У губок, древнейших многоклеточных организмов, ген *Ngb* содержит три интрона, и его промотор в отличие от *Ngb* человека содержит ТАТА-бокс, а не СG-богатые участки. Белок Ngb *H. dujardinii* состоит из 169 аминокислотных остатков, имеет относительно низкое сходство с ортологами у млекопитающих и не содержит консервативных остатков Glu и Arg, необходимых для предотвращения апоптоза, вызванного гипоксией. При этом имеются проксимальные и дистальные консервативные гем-связывающие остатки гистидина. Первичная структура нейроглобина *H. dujardinii*, предсказанная секвенированием мРНК, подтверждена масс-спектрометрией рекомбинантного Ngb, экспрессированного в клетках *Escherichia coli*. Высокий уровень экспрессии *Ngb* в тканях губки указывает на его участие в газообмене и, возможно, в других метаболических процессах.

Ключевые слова: нейроглобин, *Halisarca dujardinii*, структура гена

DOI: 10.31857/S0026898420030039

Нейроглобин (Ngb) – железосодержащий гемопроtein, участвующий в транспорте кислорода. Впервые нейроглобин обнаружили в 2000 году в нервной системе позвоночных [1]. Оказалось, что этот белок способен обратимо связывать кислород и участвовать в его транспорте. Сродство Ngb позвоночных к кислороду выше, чем у гемоглобина, однако его содержание в мозге мало и поэтому значение в транспорте кислорода невелико. Предполагается, что Ngb человека может участвовать в защите мозга от повреждений в условиях гипоксии или ишемии [2], связывании свободных радикалов [3], защите от апоптоза [4], регуляции нитритредуктазы [5] и обмене кислорода в сетчатке [6]. Определена пространственная структура нейроглобина человека [7] и мыши [8].

Ранее Ngb считали белком, характерным для позвоночных. Однако за последнее десятилетие Ngb обнаружили у различных многоклеточных

животных, в том числе у губок (*Amphimedon queenslandica* и *Carterospongia foliascens*) [9]. Примерный возраст Ngb, который считается возможным предшественником всех глобиновых белков животных [9], составляет 550 млн лет [10], т.е. это древний белок, функции которого могли сильно меняться на протяжении эволюции [11].

Губки (Porifera) – одни из древнейших многоклеточных организмов. Изучение белков губок, интересное с эволюционной точки зрения, помогает узнать как функционировали клетки первых многоклеточных. С использованием секвенирования ДНК и РНК нами изучена структура гена нейроглобина холодноводной морской губки *Halisarca dujardinii*. Получен также рекомбинантный белок Ngb *H. dujardinii*, предсказанная аминокислотная последовательность которого подтверждена с помощью спектрометрического и хромато-масс-спектрометрического анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы губок. Образцы губок *H. dujardinii* собраны на Беломорской биологической станции МГУ в ноябре 2017 г (66°34' N 33°08' E).

Выделение РНК, конструирование библиотек кДНК и секвенирование. РНК выделяли с использованием TRI Reagent (“Molecular Research Center, Inc.”, США), обрабатывали ДНКазой I (“Ambion”, США) и очищали с помощью Ribo-zero rRNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat) (“Illumina”, США). Фрагменты кДНК для библиотек получали с использованием NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina® (“New England Biolabs”, США), проверяли, используя Agilent 2100 DNA High Sensitivity Kit, и секвенировали на Illumina Hiseq2500 с парноконцевыми чтениями длиной 125 п.н. мРНК для одноконцевых прочтений длиной 50 п.н. выделяли из суммарной РНК с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (“New England Biolabs”). Далее проводили конструирование библиотек кДНК и их секвенирование на приборе Illumina Hiseq2500.

Сборка транскриптома и анализ дифференциальной экспрессии. На основе парноконцевых прочтений проводили сборку транскриптома *de novo* с помощью программы Trinity v.2.8.4 [12]. По собранным транскриптам с помощью TransDecoder v.5.5 проводили предсказание белковых продуктов. Гомологи нейроглобина искали с помощью программ Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и Exonerate (<https://www.ebi.ac.uk/about/vertebrate-genomics/software/exonerate>). Выравнивание аминокислотных последовательностей нейроглобина *H. dujardinii* и нейроглобинов других организмов проводили в программе Jalview 2.11.0. Последовательности для выравнивания брали из базы GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Одноконцевые прочтения (в двух повторях) для губки и диссоциированных клеток картировали на транскриптомную сборку. Уровень экспрессии генов рассчитывали после удаления генов с низкой экспрессией с помощью программы *edgeR* [13]. Использовали коррекцию значений М (усеченное среднее – trimmed mean TMM) и определяли количество прочтений на миллион (CPM).

RACE-анализ. Полноразмерную кДНК нейроглобина *H. dujardinii*, фланкированную адаптерными последовательностями, получали по технологии Mint с использованием набора Mint RACE cDNA amplification set (“Евроген”, Россия) [14]. Первую цепь кДНК использовали в ПЦР (Step-

Out PCR) [15] со специфическим праймером и набором Step-Out primer mix (“Евроген”). Полученный ПЦР-продукт клонировали в плазмиду pAL2-T (“Евроген”) и секвенировали.

Секвенирование ДНК. ДНК выделяли из образцов *H. dujardinii*. Геномные библиотеки готовили с помощью NebNext UltraDirectional II kit (NEB) и секвенировали на платформе Illumina Hiseq 4000.

Получение белка. ПЦР-фрагмент получали на матрице кДНК *Ngb* с праймерами, специфичными к кодирующей последовательности (5'-atgctc-ssaagacaactcagtg-3' и 5'-ttactc-aaattgatggctct-3'). ПЦР-фрагмент клонировали в плазмиду pET32v9, обработанную рестриктазами *VamNI* и *XhoI*, и трансформировали полученной плазмидой клетки *E. coli* штамм BL21. Белок *Ngb H. dujardinii* экспрессировали и выделяли с использованием хроматографии на Ni-NTA-агарозе (pET System Manual, “Novagen,” Великобритания), как описано ранее [16].

Регистрация спектра. Спектры белка регистрировали на спектрофотометре U-2800A Hitachi (Япония). Раствор нейроглобина (500 мкл, 0.25 мг/мл) в 20 мМ Трис-НСl-буфере pH 7.4, содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол, помещали в кварцевую кювету и регистрировали изменение оптической плотности раствора в диапазоне длин волн 200–500 нм. В качестве раствора сравнения использовали тот же буфер.

Масс-спектрометрия. Спектры белка, обработанного трипсином, получены с помощью время-пролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI/TOF) на спектрометре Ultraflex-treme BRUKER (Германия). Идентификацию белков проводили с помощью программного обеспечения Mascot (www.matrixscience.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В сборке транскриптома губки *H. dujardinii* идентифицированы несколько последовательностей мРНК *Ngb* разной длины. 5'-Область мРНК гена *Ngb* клонирована и секвенирована при помощи RACE-анализа. Полученная полная нуклеотидная последовательность РНК депонирована в GenBank (идентификационный номер MK520984) и выровнена на черновой сборке генома (idbras.ru/lab/files33/file62.zip, неопубликованные данные) (рис. 1a). В отличие от промоторной области гена *Ngb* млекопитающих, содер-

Рис. 1. Структура нейроглобина губки *H. dujardinii*. a – Структура гена *Ngb*. ТАТА-бокс и Inr обведены рамками. Интроны показаны пунктирной линией. б – Выравнивание аминокислотных последовательностей белков *Ngb* человека (HS), губок *H. dujardinii* (HD) и *A. queenslandica* (AQ). Идентификационные номера последовательностей, депонированных в GenBank – NP_067080.1, MK520984 и XP_003387899.1 соответственно. Белыми стрелками обозначены консервативные остатки гистидина, звездочками – аминокислоты, участвующие в защите клеток позвоночных от апоптоза в условиях гипоксии. в – Аминокислотная последовательность белка и пептиды, определенные с помощью масс-спектрометрии (серые линии). г – Спектр поглощения белка *Ngb*.

a

TATAAAACGG TCAGTTTTGT CGCCAGCTGC AGCCAGTTTC TCAACACAAG CGACCGACAA CAAATTTATA GACACTTGCT GGTACAGTAA AGCCGTCTCA
 ATATTTTCGC AGTCAAACA GCGGTCGACG TCGTCAAAG AGTTGTGTTT GCTGGCTGTT GTTTAAATAT CTGTGAACGA CCAITGCAIT TCGGCAGAGT

+1

Met
 AGGACAATG
 TCCTGTTAC

Ser Gln Asp Asn Ser Val Pro Arg Leu Thr Glu Glu Asp Val Gln Asn Val Ile Ser Ser Trp Lys Val Val Gln Glu Ile Gly Leu Gln Glu Ala Gly Val
 CCAAGACAAC TCAGTGCACC GCCTCACCGA AGAAGATGTG CAGAAGCTCA TTAGCAGTTG GAAAGTTGTT CAGGAAATCG GCCTGCAAGA AGCCGGGGTC
 GGTTCTGTTG ATCACCGGGG CCGAGTGGCT TCTTCTACAC GCTTGCAGT AATCGTCAAC CTTTCAACAA GTCTTTTAGC CGGACGTTCT TCGGCCCCAG

Ile Val Phe Lys Arg
 ATAGTCTTCA AAAGG
 TATCAGAAGT TTTC

Leu Phe Glu Thr Thr Pro Met Leu Lys Glu Lys Phe Lys Phe Leu Arg Gly Glu Glu Glu Leu Ser Asp Asp Asn Glu His Leu Gln Lys His
 CT ATTTGAAACC ACGCCAATGC TCAAAGAGAA GTTCAAGTTC CTCAGAGGCG AGGAAGAAGT CTCGGACGAC AACGAACACT TGCAGAAGCA
 GA TAAACTTTGG TCGGTTIACG AGTTTCTCTT CAAGTCAAG GAGTCTCCGC TCTTCTTGA GAGCCTGCTG TTGCTTGTGA ACGTCTTCTG

His Ser Leu Thr Val Met Ser Thr Ile Asp Met Ala Val Glu Arg Val Arg Glu Arg Ala Leu Gly Asp Leu Ser Glu Asp Leu Leu Asp Val Gly Val Ala
 CTCACTAACT GTCATGTCGA CCATTGACAT GGCCGTGGAA AGAGTGCAGC AAAGGGCTCT GGGCGATTG TCCGAGGACC TGCTAGACGT CCGAGTTGCG
 GAGTGATTGA CAGTACAGT GGTAACTGTA CCGGCACCTT TCTCACGCGC TTTCCCGAGA CCCGCTAAC AGGCTCTGAG ACGATCTGCA GCCTCAAAGC

His His Val His Asn Ile Ser Gln Ala Asp Phe Ala
 CACCAGTCC ACAACATCAG CCAGGCAGAT TTTGCG
 GTGGTGCAGG TGTGTAGTC GGTCCGCTA AAACGC

Pro Val Gly Glu Ala Ile Leu Tyr Thr Leu
 CCTGTGGGGG AGGCCATCTT GTACACTCTG
 GGACACCCCC TCCGGTAGAA CATGTGAGAC

Gly Gly Ala Leu Gly Asp Lys Phe Thr Asp Ser Val Lys Glu Ser Trp Ile Arg Leu Tyr Thr Met Val Gln Val Gly Met Thr Pro Gly Met Glu Lys Gly
 GGTGGAGCGC TGGGTGACAA GTTCACAGAC TCTGTCAAAG AATCTCGGAT ACGCCTCTAC ACCATGGTAC AGGTCCGGAT GACACCCGGC ATGGAGAAGG
 CCACCTCCGC ACCCACTGTT CAAGTGTCTG AGACAGTTTC TTAGGACCTA TCGCGAGATG TGGTACCATG TCCAGCCCTA CTGTGGGGCC TACCTCTTCC

GlyMet Glu Gly Glu Pro Ile Asn Leu Glu ***
 GGATGGAAGG AGAGCCCATC AATTGGAGT AA
 CCTACCTTCC TCTCGGGTAG TTAACCTCA TT

b

HS -----MERPEPEL I RQSWRAVRS - PLEHGTVL FARLFALEPDL LPLFQ - YNCRQFSSPEDCLSSPEFLDH I RKMVLV I DAAVTNV - EDLSSLEEYLA SLGRKHRAVGVKL
 HD MSQDNSVPRL TEEDVQNV I SSKVVQGE - IGLQEAGV I VFKRLFETTPMLKEKFK - FLRGE - ELSDDNEHLQKHS LTMVST I DMAVERVRE RALGDLSED LLDVGVAAHVHNI SQ
 AQ -----MSL TSAQVAL I ESTWVKVKK - LQAGNIMFLKLFQ I DVSVRDKFP - FRDVPY - EELEDSESLKHS LQVMET I DLA I TLLG GEMEKLVEALVDLGMAMQGLKP

↑

HS 104 SFSFSTVGESLLYMLEKLGPAFTPATRAAWSQLYGA VVQAMSRGWGE-----
 HD 113 ADFAPVGEA I LYTLLGALGDKF TDSVKESWIRLYTMVQVGMTPGMEKGMEEPI NLE
 AQ 105 EDFDHVGEALVHALGVALGKEFNDEAKKAWTLLYSVVTAKMKEGLKEAGED-----

b

1 MSQDNSVPRL TEEDVQNVIS SWKVVQEIGL QEAGVIVFKR LFETTPMLKE KFKFLRGEEL LSDDNEHLQK HSLTMVSTID MAVERVRERA

91 LCDLSEDLDD VGVAAHVHNI SQADFAPVGE AILYTLCCAL GDKFTDSVKE SWIRLYTMVQ VCMTPCMEKC MECEPINLE

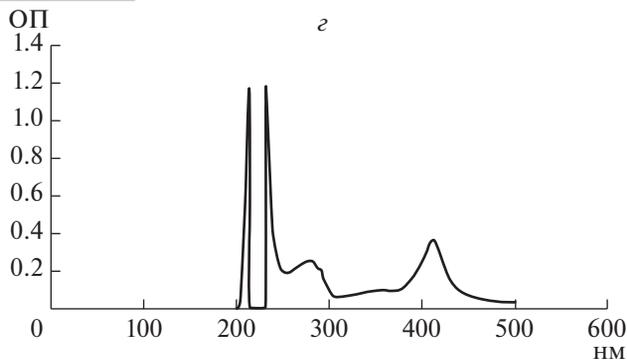


Таблица 1. Уровень экспрессии *Ngb* и *ADGB* в интактных губках и в суспензии клеток (опыт проведен в двух биологических повторах)

Ген	Губка		Клеточная суспензия	
	1	2	1	2
<i>Ngb</i>	47.31	55.01	27.01	32.14
<i>ADGB</i>	25.13	21.88	15.99	15.00

Примечание. Уровень экспрессии определен в СРМ.

жащей два GC-боксы [17], в промоторной области *Ngb H. dujardinii* в положении –30 от старта транскрипции находится ТАТА-бокс [18]. В положении –1 от начала транскрипции находится остаток цитозина, а в положении +1 – аденина. Они фланкированы пиримидиновыми нуклеотидами, что соответствует мотиву инициации транскрипции (Inr) [18]. В промоторной области гена нейроглобина губки *A. queenslandica* (GenBank, идентификационный номер NW_003546451.1) находится также АТ-богатая последовательность, похожая на ТАТА-бокс, но не найден мотив Inr. Структура промоторной области гена *Ngb* указывает на то, что в инициации его транскрипции должны принимать участие ТАТА-связывающий белок (ТВР) и факторы транскрипции ТFIІА, ТFIІD, ТFIІE, ТFIІF и ТFIІH. В отличие от губок, промоторная область гена нейроглобина млекопитающих не содержит ТАТА-бокс – древний промоторный мотив эукариот. Последовательности, сходные с ТАТА-боксом, найдены даже у протистов, тогда как у позвоночных ТАТА-бокс распространен не столь широко. Ген *Ngb H. dujardinii* содержит три интрона, что соответствует структуре генов *Ngb* других организмов [19]. В 3'-области гена находится длинная (4330 п.н.) не-транслируемая область. Нуклеотидная последовательность гена *Ngb* губки сильно отличается от *Ngb* млекопитающих и губки *A. queenslandica* (ген *Ngb H. dujardinii* более чем в 2 раза длиннее гена *Ngb A. queenslandica* в основном за счет более протяженных интронов). Молекула нейроглобина состоит из 169 аминокислотных остатков, что на 18 больше, чем у *Ngb* человека и мыши (151 аминокислотный остаток). Значение идентичности (identity) аминокислотных последовательностей белков *Ngb H. dujardinii* и *A. queenslandica* (XP_003387899.1) равно 39%. При сравнении с *Ngb* других беспозвоночных и позвоночных значение идентичности составляло около 30%. При этом идентичность аминокислотной последовательности *Ngb* человека и мыши достигает 94%, что выше, чем между ортологами гемоглобина и миоглобина, а также многих других белков у этих видов [1]. Белок *Ngb*

H. dujardinii, несмотря на низкую консервативность его аминокислотной последовательности, содержит проксимальный и дистальный остатки гистидина, необходимые для связывания гема (рис. 1б). В *Ngb H. dujardinii* не найдены консервативные остатки глутамата (Glu) и аргинина (Arg), необходимые для защиты клеток позвоночных от апоптоза (программированной клеточной гибели) в условиях гипоксии [11].

С целью изучения свойств нейроглобина губки *H. dujardinii* мы получили конструкции для продукции белка *Ngb* в клетках *E. coli*. Белок был выделен и очищен, а его последовательность, предсказанная по результатам секвенирования мРНК и генома, подтверждена с помощью масс-спектрометрии (рис. 1в). В спектре поглощения нейроглобина *H. dujardinii* обнаружен пик при 412 нм (рис. 1з), что соответствует спектру гемсодержащего белка. Эти результаты подтверждают, что полученный белок *H. dujardinii* является нейроглобином. В дальнейшем мы планируем исследовать его свойства и определить пространственную структуру.

Поиск других генов глобинов в сборке транскриптома *H. dujardinii* привел к обнаружению гена андроглобина (*ADGB*), представленного в геноме многих беспозвоночных, в том числе губки *A. queenslandica*. Экспрессия андроглобина в интактной губке и в клеточной суспензии была в 2 раза ниже, чем у *Ngb* (табл. 1).

Относительно более высокая, по сравнению с *ADGB*, экспрессия *Ngb* говорит о его более значительном вкладе в газообмен и, возможно, в другие метаболические процессы у *H. dujardinii*.

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН. Хромато-масс-спектрометрический анализ выполнен на оборудовании ЦКП ИБХФ РАН “Новые материалы и технологии”.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-34-50002) и государственным заданием ИБР РАН.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 407, 520–523.

2. Burmester T., Gerlach F., Hankeln T. (2007) Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* **618**, 169–180.
3. Li W., Wu Y., Ren C., Lu Y., Gao Y., Zheng X., Zhang C. (2011) The activity of recombinant human neuroglobin as an antioxidant and free radical scavenger. *Proteins*. **79**, 115–125.
4. Brittain T., Skommer J., Henty K., Birch N., Raychaudhuri S. (2010) A role for human neuroglobin in apoptosis. *IUBMB Life*. **62**, 878–885.
5. 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. (2011) Human neuroglobin functions as a redoxregulated nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **286**, 18277–18289.
6. Lechaue C., Augustin S., Cwerman-Thibault H., Bouaita A., Forster V., Célier C., Rustin P., Marden M.C., Sahel J.A., Corral-Debrinski M. (2012) Neuroglobin involvement in respiratory chain function and retinal ganglion cell integrity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1823**, 2261–2273.
7. Pesce A., Dewilde S., Nardini M., Moens L., Ascenzi P., Hankeln T., Burmester T., Bolognesi M. (2003) Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure*. **11**, 1087–1095.
8. Vallone B., Nienhaus K., Brunori M., Nienhaus G.U. (2004) The structure of murine neuroglobin: novel pathways for ligand migration and binding. *Proteins*. **56**, 1087–1095.
9. Lechaue C., Jager M., Laguerre L., Kiger L., Correc G., Leroux C., Vinogradov S., Czjzek M., Marden M.C., Bailly X. (2013) Neuroglobins, pivotal proteins associated with emerging neural systems and precursors of metazoan globin diversity. *J. Biol. Chem.* **8**, 6957–6967.
10. Casado B., Pannell L.K., Whalen G., Clauw D.J., Baraniuk J.N. (2005) Human neuroglobin protein in cerebrospinal fluid. *Proteome Sci.* **3**, 2.
11. Wakasugi K., Takahashi N., Uchida H., Watanabe S. (2011) Species-specific functional evolution of neuroglobin. *Mar. Genomics*. **4**, 137–142.
12. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 644–652.
13. McCarthy D.J., Chen Y., Smyth G.K. (2012) Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucl. Acids Res.* **40**, 4288–4297.
14. Schmidt W.M., Mueller M.W. (2012) CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **27**, e31.
15. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. (1999) Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucl. Acids Res.* **27**, 1558–1560.
16. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. (2011) Drosophila BTB/POZ domains of “ttk group” can form multimers and selectively interact with each other. *J. Mol. Biol.* **412**, 423–436.
17. Zhang W., Tian Z., Sha S., Cheng L.Y., Philipsen S., Tan-Un K.C. (2011) Functional and sequence analysis of human neuroglobin gene promoter region. *Biochim. Biophys. Acta*. **1809**, 236–244.
18. Smale S.T., Kadonaga J.T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 449–479.
19. Dröge J., Pande A., Englander E.W., Makałowski W. (2012) Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins. *PLoS One*. **7**, e47972.

STRUCTURE OF NEUROGLOBIN FROM COLD-WATER SPONGE

Halisarca dujardinii

K. I. Adameyko¹, O. I. Kravchuk^{1,*}, A. D. Finoshin¹, A. N. Bonchuk², A. A. Georgiev³, V. S. Mikhailov¹, N. G. Gornostaev¹, K. V. Mikhailov^{3,4}, A. V. Bacheva³, M. I. Indeykina⁵, A. E. Bugrova⁵, G. R. Gazizova⁶, O. S. Kozlova⁶, O. A. Gusev^{6,7}, E. I. Shagimardanova⁶, and Y. V. Lyupina¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

⁴Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

⁵Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

⁶Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

⁷KFU-RIKEN Translational Genomics Unit, RIKEN National Science Institute, Yokohama, 230-0045 Japan

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

The iron-containing protein (Ngb) involved in the transport of oxygen is generally considered as a precursor of all animal globins. In this report, we characterized the Ngb protein of the cold-water sponge *Halisarca du-*

jardinii. In sponges, the oldest multicellular organisms, the *Ngb* gene contains three introns. In contrast to human *Ngb*, its promoter contains a TATA-box, rather than the CG-rich motifs. In sponges, Ngb protein consists of 169 amino acids showing rather low identity with its mammalian orthologues. It lacks Glu and Arg residues in positions required for prevention of the hypoxia-related apoptosis. Nevertheless, Ngb contains both proximal and distal conserved heme-binding histidines. The primary structure of *H. dujardinii* neuroglobin predicted by sequencing was confirmed by the mass-spectrometry analysis of the recombinant Ngb expressed in *E. coli*. High level of *Ngb* expression in sponge tissues suggests its possible involvement into the gas metabolism and presumably in other key metabolic processes in *H. dujardinii*.

Keyword: neuroglobin, *Halisarca dujardinii*, gene structure