БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 5, с. 627 – 641

УДК 539.26

ФОРМИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ВО ВНУТРЕННЕЙ ПОЛОСТИ ФЕРРИТИН-ПОДОБНОГО БЕЛКА Dps. ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ АНОМАЛЬНОЙ ДИСПЕРСИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

© 2022 Э.В. Штыкова[1]*, М.В. Петухов[1,2], А.А. Можаев[1,3,4,5]

[1] *Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333 Москва, Россия; электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru*

[2] *Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия*

[3] *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

[4] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия*

[5] *Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 12.04.2022
После доработки 26.04.2022
Принята к публикации 26.04.2022

Особое место среди додекамерных мини-ферритинов занимает белок Dps, важнейшей функцией которого является защита генома бактерий от различных видов разрушительного внешнего воздействия путем *in cellulo* Dps–ДНК сокристаллизации. Следствием такой защитной реакции является возникновение бактериальной резистентности к антибиотикам и другим лекарственным средствам. Поэтому исследованию геномзащитных свойств Dps уделяется огромное внимание. Однако не менее важна другая сторона функциональных особенностей Dps. Будучи ферритин-подобным, этот белок выступает в качестве депо для резервного хранения железа и защищает бактериальные клетки от окислительного повреждения, инициируемого его избытком. Исследование этого явления также является весьма актуальным, и данная работа посвящена изучению процессов формирования наночастиц оксида железа во внутренней полости додекамера Dps. В качестве основного метода исследования был выбран метод аномального малоуглового рассеяния, который позволяет изучать структуру металлсодержащих биологических макромолекул и определять распределение по размерам образовавшихся в них металлических наночастиц. Вклады белковой и металлической составляющих в общее рассеяние разделяются путём вариации энергии падающего рентгеновского излучения вблизи края полосы поглощения атомами металла, в данном случае *K*-полосы поглощения железа. Были исследованы образцы Dps, содержащие 50, 500 и 2000 атомов железа на додекамер белка. Анализ полученных распределений по размерам показал, что в зависимости от содержания железа в растворе внутри белковой молекулы формируются наночастицы с размерами 2–4 нм и рост металлических наночастиц ограничен размером центральной полости белка. Было также показано, что некоторое количество ионов железа содержится в поверхностном слое Dps. Этот слой очень важен для выполнения белком своих защитных функций, поскольку находящиеся здесь *N*-концевые домены определяют характер взаимодействия Dps с ДНК. В целом, полученные в данной работе результаты могут быть полезными в качестве очередного шага в изучении феномена Dps, а также с практической точки зрения при создании биосовместимых и стабилизированных в растворе металлических наночастиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ферритин-подобные белки, белок Dps, оксид железа, аномальное малоугловое рентгеновское рассеяние, распределение по размерам.

DOI: 10.31857/S0320972522050049, **EDN:** ATBBAO

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что приблизительно одна треть белков и почти половина ферментов из тех, которые уже были изучены, содержат от одного до нескольких ионов различных металлов [1, 2]. Среди них железо является одним из наиболее жизненно важных и распространённых химических элементов. Чаще всего этот металл обнаруживается в белках в составе гема или железосерных простетических групп [2, 3]. Биологическое значение железа определяется его способностью обратимо окисляться и восстанавли-

Принятые сокращения: АМУРР – аномальное малоугловое рентгеновское рассеяние; *ММ* – молекулярная масса; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние.

* Адресат для корреспонденции.

ваться. В виде двухвалентных или трёхвалентных ионов железо необходимо для жизненных процессов всех эукариот и большинства прокариот. Оно участвует в таких метаболических процессах, как транспорт кислорода, синтез ДНК, транспорт электронов для производства энергии и является универсальным микроэлементом, который обеспечивает нормальное функционирование всех систем организма на клеточном уровне.

С другой стороны, избыток этого металла катализирует повреждение ДНК, белков и липидов, приводя к нарушению клеточного гомеостаза. Существующие эволюционные механизмы детоксикации и удаления железа из цитозоля включают окисление избыточных ионов двухвалентного железа до трёхвалентного состояния в соответствии с реакцией Фентона [4]:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^{-}. \quad (1)$$

Накопление образовавшихся ионов трёхвалентного железа происходит в живых организмах в ферритин-подобных белках. Ферритины, как белковое суперсемейство, эволюционно развилось для секвестрации железа в растворимой, нетоксичной и биодоступной форме [5]. В составе этих белков неиспользованное железо выступает в качестве резервного и хранится в нереакционноспособном месте отдельно от клеточных процессов, и, соответственно, клетки оказываются защищёнными от окислительного повреждения, инициированного этим металлом [6, 7]. Ферритин – это сложный белковый комплекс, выполняющий роль основного внутриклеточного депо железа у человека и животных и содержащийся практически во всех органах и тканях. Апоферритин млекопитающих (т.е. макромолекула, не содержащая железа) представляет собой тетракозамерный белок с общей молекулярной массой (*MM*) ~450 кДа. Каждая из 24 полипептидных субъединиц имеет *MM* ~20 кДа. Структурно, ферритин – это глобулярный белок с центральной полостью, в которой хранится примерно 4500 ионов гидратированного оксида трёхвалентного железа ($Fe_2O_3 \cdot H_2O$) вместе с переменным количеством фосфатов. Внешний диаметр белка составляет 12–13 нм, а диаметр внутренней полости – 7–8 нм [7, 8]. Белковая оболочка ферритина имеет многочисленные поры, через которые осуществляется транспорт железа [9].

Существуют также по крайней мере три типа ферритин-подобных прокариотических белков: бактериальный ферритин, бактериоферритин и додекамерный ферритин (мини-ферритин). Эти бактериальные белки родственны ферритинам, обнаруженным у эукариот. Бактериальный ферритин и бактериоферритин так же, как ферритин млекопитающих, представляют собой структуру, состоящую из 24 субъединиц с центральной полостью, которая может содержать ~2500 атомов железа в случае бактериального ферритина [10] и ~1800 атомов железа – для бактериоферритина [10, 11]. Существенное отличие бактериоферритина от других форм ферритина состоит в наличии в его структуре гема (протопорфирина IX железа), расположенного между каждыми двумя субъединицами белка и соединённого с метионином каждой из этих субъединиц. Таким образом, одна молекула бактериоферритина содержит 12 групп гема, роль которых, однако, до конца неясна [12–14].

Среди додекамерных мини-ферритинов особое место занимает белок Dps (DNA-binding protein from starved cells), одной из наиболее значимых функций которого является защита генома от таких пагубных факторов, как голодание, термическое воздействие, УФ-и γ-облучение, токсины, химический шок и окислительный стресс. Dps связывается с ДНК, в результате чего формируется устойчивый кристаллический комплекс Dps–ДНК, защищающий дезоксирибонуклеиновую кислоту от повреждений [15–17]. Важным следствием такой защитной реакции является возникновение бактериальной резистентности к антибиотикам и другим лекарственным средствам. Именно поэтому в течение последних двух десятилетий формирование защитных комплексов Dps–ДНК в стресс-индуцированных бактериальных клетках привлекает внимание многих научных групп. Среди публикаций на эту тему наиболее известными являются работы А. Минского и соавторов, которые впервые представили экспериментальные доказательства этого явления [18–20].

В бактериальной клетке Dps обычно содержится в незначительных количествах, а его синтез индуцируется во время стационарной фазы роста бактерии, голодания или окислительного стресса [21]. Известно, что додекамер Dps не содержит каких-либо модулей в своей структуре, предназначенных для распознавания конкретных нуклеотидных последовательностей. Взаимодействие с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК предположительно осуществляется за счёт электростатических связей с богатыми лизином *N*-концевыми доменами мономеров Dps [15, 22–24]. Однако точный механизм, с помощью которого происходит связывание белка с ДНК, неизвестен [25].

Первичная структура мономера Dps представляет собой полипептидную цепь из 167 аминокислотных остатков с *MM* 18,7 кДа и содер-

жит высоко консервативную последовательность, состоящую из четырёх α-спиралей [26]. Додекамер имеет *MM* 224,4 кДа, обладает симметрией типа 23, внешний диаметр белка равен 8–9 нм, а диаметр внутренней полости – 4–5 нм. Будучи ферритин-подобным белком, каждый мономер которого может связать до 40 атомов железа, Dps способен накапливать приблизительно 500 ионов Fe^{+3} в своей центральной полости [27].

Таким образом, Dps выполняет одновременно две важнейших для жизнедеятельности бактериальных клеток функции: (1) – формируя кристаллический комплекс с ДНК, он сохраняет генетический материал бактерии от воздействия внешних неблагоприятных факторов; (2) – служит депо для резервного хранения железа и защищает клетки от окислительного повреждения, инициированного его избытком. Обе эти функции тесно связаны между собой. Так, анализируя повреждения ДНК *in vitro*, Zhao et al. [27] показали, что ДНК *Escherichia coli* расщепляется при воздействии сочетания $FeSO_4$ и H_2O_2, но не повреждается в присутствии Dps. То есть образование комплекса белка с ДНК и способность обезвреживать перекись водорода во время взаимодействия с железом приводит к сохранению генома *E. coli* в условиях стресса [28].

Несмотря на то что Dps *E. coli* не содержит канонических ферроксидазных сайтов, присутствующих в бактериоферритине *E. coli* или бактериальном ферритине, Fe^{2+} может окисляться в некоторых областях белковой макромолекулы и затем накапливаться в виде Fe^{3+} в центральной полости белка [27]. Предположительно, ферроксидазные участки Dps состоят из железосвязывающих аминокислот, включая аспартат, глутамат и гистидин [28, 29]. Например, *N*-концевой домен экспрессированного из бактерии *Deinococcus radiodurans* Dps (DrDps1) содержит область (остатки 30–55), в которой находится сайт связывания с металлами (с мотивом $Asp_{36}x_2His_{39}x_{10}His_{50}x_4Glu_{55}$), расположенный на внешней поверхности додекамера. Разрушение этого сайта влияет на самосборку белка, а также снижает его способность связывания с ДНК, т.е. снижает его защитные функции [30].

В отличие от Dps, далеко не все бактериальные додекамерные мини-ферритины могут одновременно защищать организм от окислительного стресса, образуя кристаллический комплекс с ДНК, и в то же время быть источником железа при его дефиците [31]. Именно поэтому уникальные особенности Dps привлекают такое внимание. Кроме того, в необходимости и важности исследования свойств этого белка присутствует и технологический аспект. Накопление в достаточном количестве ионов металла во внутренней полости Dps предполагает наличие магнитных свойств, и эти белковые молекулы можно рассматривать как естественные биосенсоры электромагнитного излучения. Dps способен передавать полученный сигнал на ДНК и, следовательно, является чрезвычайно перспективным в качестве основы для создания логических элементов нового поколения. Таким образом, изучение процессов формирования наночастиц железа в стабилизирующей белковой оболочке Dps имеет не только научный, но и практический интерес.

Для того чтобы методом малоуглового рассеяния исследовать структуру металлсодержащих образцов и распределение по размерам образовавшихся в них металлических наночастиц, вклады этих двух составляющих в общее рассеяние следует разделить. Для изучения структуры исходного образца до формирования в нём частиц металла, т.е. матрицы, используется традиционное малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) [32]. Стандартный метод вычитания рассеяния исходной матрицей из общего рассеяния от металлсодержащего образца возможен только в тех случаях, когда матрица не меняет свою структуру в процессе формирования в ней частиц металла. В том же случае, когда структурные изменения в исходном образце, предположительно, имеют место, используется метод аномального малоуглового рассеяния (АМУРР) [33–36]. В этом методе экспериментальные кривые МУРР от металлсодержащего образца измеряются при разных энергиях рентгеновского пучка: вблизи края полосы поглощения атомами данного металла, т.е. регистрируется рассеяние только от матрицы, и вдали от него, когда снимается общее рассеяние. Полученная разность относится к рассеянию только от наночастиц, содержащих атомы данного металла. Анализ вклада каждой из составляющих позволяет, таким образом, рассчитать распределение по размерам наночастиц металла и исследовать структуру металлсодержащего образца в процессе его взаимодействия с металлом.

В настоящей работе процесс накопления оксида железа во внутренней полости ферритин-подобного белка Dps изучался с помощью аномальной дисперсии рентгеновских лучей, т.е. методом аномального малоуглового рассеяния.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов Dps, содержащих железо. Экспрессия и очистка белка Dps проводи-

лись по ранее разработанной методике [37, 38]. Очищенный белок концентрировали на центрифужном концентраторе Amicon («Merck Millipore», США) с порогом молекулярной массы 10 кДа до концентрации 3 мг/мл, а затем подвергали диализу в буфере 50 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Чистоту анализировали методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле, а концентрацию белка определяли спектрофотометрически при A280 с использованием молярного коэффициента абсорбции [39].

К раствору очищенного Dps с концентрацией 3 мг/мл в буфере 50 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) добавляли свежеприготовленный раствор $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в количестве, соответствующем 50, 500 и 2000 атомам железа на додекамер. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученные таким образом железосодержащие образцы далее обозначены в тексте как Dps-Fe50, Dps-Fe500 и Dps-Fe2000 соответственно.

Эксперимент и анализ данных малоуглового рассеяния. ***Традиционное малоугловое рассеяние.*** Исследования структуры белка Dps с помощью традиционного малоуглового рентгеновского рассеяния были проведены на синхротроне Petra III (DESY, Германия) на линии P12 [40]. Линия P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений волновых векторов $0{,}08 < s < 3$ нм$^{-1}$, где $s = (4\pi\sin\theta)/\lambda$ – вектор рассеяния, 2θ – угол рассеяния, и $\lambda = 0{,}124$ нм – длина волны излучения. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния для контроля возможных радиационных повреждений. Радиационного повреждения обнаружено не было.

Первичная обработка кривых рассеяния была проведена с использованием программы PRIMUS [41]. Анализ, интерпретация полученных данных и структурное моделирование проводили с использованием программного комплекса ATSAS [42].

Радиусы инерции (R_g) рассеивающих частиц определялись по начальному участку кривой рассеяния в области самых малых значений s с помощью формулы:

$$I_{\exp}(s) = I(0)\exp\left(-s^2R_g^2/3\right), \qquad (2)$$

которая справедлива в области $(sR_g) < 1{,}3$. Из наклона прямолинейного участка графика Гинье – $\ln I(s)$ от s^2 – определяли интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$, которая пропорциональна молекулярной массе рассеивающей объекта, и радиус инерции R_g.

Молекулярные массы рассчитывали по данным МУРР двумя методами: с помощью подхода Байеса (MM_{Bayesian}) [43] и из значения исключенного объёма V_p (породовского объема), недоступного растворителю [44], используя эмпирическое соотношение между V_p и MM_p, которое для белков равно 1,65 [45].

Для построения функции распределения по расстояниям $p(r)$, которая необходима для восстановления формы белка Dps в растворе по данным МУРР, использовалась компьютерная программа GNOM [46]. Функции распределения по расстояниям $p(r)$ определялись с помощью косвенного Фурье-преобразования интенсивности рассеяния в соответствии с интегральным уравнением:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2}\int_0^\infty srI(s)\sin(sr)ds, \qquad (3)$$

где $I(s)$ – интенсивность рассеяния. При этом максимальный размер частицы ($D_{\max}$) находится из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$.

Ab initio метод восстановления формы низкого разрешения белка Dps основан на алгоритме имитации отжига и реализован в программе DAMMIN [47], с помощью которой происходит построение структурных моделей с минимизацией невязки χ^2 между экспериментальным данными и рассеянием, полученным от моделей:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1}\sum_j\left[\frac{I_{\exp}(s_j) - cI_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)}\right]^2, \qquad (4)$$

где N – число экспериментальных точек, $I_{\exp}(s_j)$ и $\sigma(s_j)$ – экспериментальные интенсивности и их ошибки, $I_{\text{calc}}(s_j)$ – интенсивность, вычисленная от модели, c – шкалирующий множитель.

Для определения структуры белка, содержащего атомы железа, был использован метод мультифазного моделирования *ab initio*, что позволило определить не только структуру низкого разрешения белковой составляющей комплекса, но и расположение атомов железа в белковой матрице. Построение двухкомпонентной (двухфазной) модели проводилось с использованием программы MONSA [47]. В программе учитывается различие электронных плотностей белковой и металлической составляющих комплекса, а также соотношение их объёмов. Для получения двухфазной модели белок–металл были использованы кривые малоуглового рассеяния от исходного белка и белка, содержащего атомы железа. Теоретическая интенсивность рассеяния построенных моделей рассчитывалась программой CRYSOL [48].

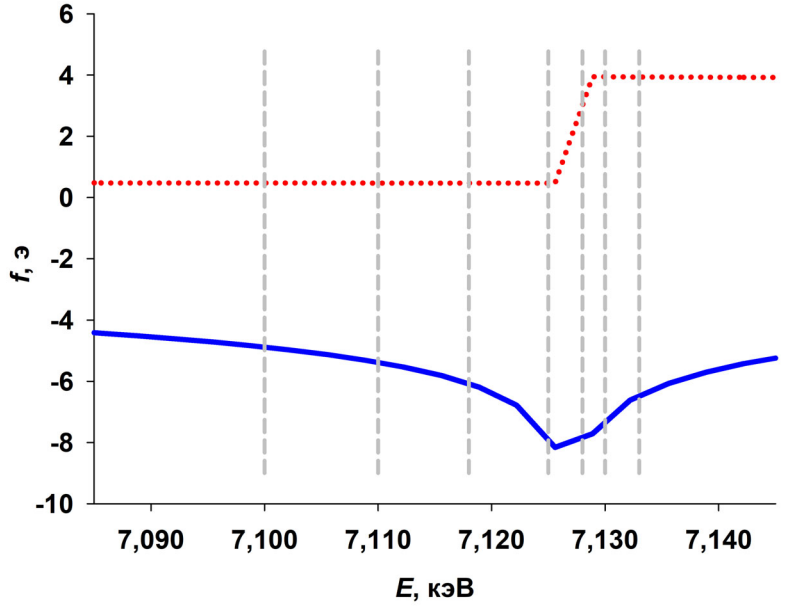

Рис. 1. Изменение действительной и мнимой компонент аномального рассеяния рентгеновского излучения $f'(E)$ (синяя сплошная линия) и $f''(E)$ (красная пунктирная кривая) в зависимости от энергий фотонов E вблизи K – полосы поглощения атомами Fe – E = 7,125 кэВ. Вертикальными пунктирными линиями обозначены энергии излучения, при которых проводились измерения аномального рассеяния. Расчетные данные дисперсионных поправок для атомов железа были взяты с сайта открытого доступа (http://skuld.bmsc.washington.edu/)

Аномальное малоугловое рассеяние. Эксперименты по аномальному рассеянию также проводились на синхротроне Petra III на линии P12 и заключались в измерении кривых рассеяния рентгеновского излучения при разных длинах волн λ, т.е. при разных энергиях падающего пучка E. Измерения были проведены для исходного белка Dps и образцов Dps, содержащих 50 (Dps-Fe50), 500 (Dps-Fe500) и 2000 (Dps-Fe2000) атомов железа на додекамер. Данные рассеяния регистрировали при нескольких различных энергиях фотонов E_k, при этом энергия E_0 (10 000 кэВ, λ = 0,124 нм) находится достаточно далеко от края поглощения Fe, и поэтому она была выбрана для изучения структуры исходной макромолекулы Dps, т.е. в этом случае использовался традиционный метод МУРР, как описано выше. Полученные данные МУРР и АМУРР были скорректированы на фоновое рассеяние, флуоресценцию и обработаны с помощью программного комплекса ATSAS [42] и недавно разработанной стратегии сбора данных и обработки аномального малоуглового рассеяния [49].

Рассеивающий фактор атома определяется следующим образом:

$$f(E) = f_0 + f'(E) + if''(E), \quad (5)$$

где дисперсионные поправки $f'(E)$ и $f''(E)$ становятся существенными вблизи края полосы поглощения резонансного атома. В данном случае измерения проводились вблизи K – полосы поглощения атомами Fe, т.е. при энергии фотонов E = 7,125 кэВ (λ = 0,174 нм). На рис. 1 приведена кривая изменения дисперсионных поправок $f'(E)$ и $f''(E)$ в зависимости от энергий фотонов E, используемых в данной работе.

Для каждого образца были измерены кривые рассеяния $I(s, E_k)$ при 7 различных энергиях падающего излучения $E_{1\text{-}7}$: 7,100, 7,110, 7,118, 7,125, 7,128, 7,130 и 7,133 кэВ в районе края K – полосы поглощения атомами Fe (E = 7,125 кэВ). Аномальные поправки для E = 7,125 кэВ составили –8,13 и 0,48 соответственно. Разность между кривыми рассеяния, полученными при разных энергиях $\Delta_k(s) = I(s, E_0) - I(s, E_k)$, пропорциональна рассеянию резонансными атомами [33–36]. Эти разностные кривые были использованы при вычислении объёмных функций распределения по размерам $D_V(R)$. Интегральное уравнение

$$I(s) = (\Delta\rho)^2 \int_{R_{\min}}^{R_{\max}} D_V(R) m^2(R) i_0(sR) dR \quad (6)$$

было решено относительно $D_V(R)$ с помощью компьютерной программы GNOM [46] в предположении сферичности образованных наночастиц. В этом уравнении R – радиус сферы, $R_{\min}$ и $R_{\max}$ – минимальный и максимальный размеры, $i_0(x) = \{[sin(x) - x\ cos(x)]/x^3\}^2$ и

$m(R) = (4\pi/3)R^3$ – соответственно форм-фактор сферы и её объём. Плотность рассеивающей длины аномальных атомов определяется как $\Delta\rho = (N_0^2 - N_k^2)e/v_{at}$, где N_0 и N_k – число электронов, вносящих вклад в рассеяние вдали от резонанса и при $E = E_k$, e – заряд электрона и v_{at} – атомный объём.

Был также использован альтернативный метод анализа распределений по размерам наночастиц Fe, образующихся в белке Dps, реализованный в программе MIXTURE [41]. В этом подходе интенсивность рассеяния $I(s)$ от смеси k разных компонентов разного размера представлена в виде линейной комбинации:

$$I(s) = \sum_{k=1}^{K} v_k I_k(s), \quad (7)$$

где v_k – объёмная доля компонента k, I_k – интенсивность рассеяния этого компонента, K – количество компонентов. Программа MIXTURE моделирует рассеяние от смесей, содержащих K – число разных по форме и размерам рассеивающих объектов, при этом используется теоретическое рассеяние от простых тел (сфер, полых сфер, эллипсоидов, цилиндров и т.д.), каждое из которых характеризуется своей объёмной долей, средним размером, шириной полидисперсного распределения, контрастом и, опционально, возможностью межчастичных взаимодействий. Экспериментальная картина рассеяния аппроксимируется взвешенной комбинацией расчётных индивидуальных (парциальных) кривых от компонентов для минимизации невязки χ^2 между экспериментальными и модельными данными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование структуры белка Dps методом традиционного малоуглового рентгеновского рассеяния. Исследование структуры белка Dps в растворе и определение таких инвариантов малоуглового рассеяния, как радиус инерции R_g, породовской объём V_p, функция распределения по расстояниям $p(r)$ и максимальный размер D_{max}, а также молекулярная масса *MM*, было проведено с помощью традиционного МУРР. Предварительными измерениями было показано, что в растворе в интервале концентраций Dps от 1,0 мг/мл до 3,0 мг/мл не наблюдалось концентрационной зависимости и образования агрегатов. Поэтому для измерений и дальнейшей обработки и интерпретации данных МУРР был выбран образец с концентрацией 3,0 мг/мл, в результате чего кривая малоуглового рассеяния была достаточно информативной и малошумящей в интервале угловых векторов $0{,}25 < s < 3{,}0$ нм$^{-1}$ с хорошо выраженным форм-фактором (рис. 2, кривая *1*).

Кривая МУРР от белка Dps, представленная на рис. 2, характерна для раствора монодисперсного белка сферической формы. О сферичности белка свидетельствует также рассчитанная с помощью программы GNOM [46] функция распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 2, вставка), которая описывает форму рассеивающего объекта [32] и используется в программе DAMMIN для восстановления структуры низкого разрешения по данным МУРР [47]. Из профиля функции $p(r)$ можно также сделать вывод о том, что в данном случае сферическое тело является полым – функция распределения по размерам ассиметрична, и её максимум смещён вправо. Кроме того, поскольку амплитуда функции $p(r)$ пропорциональна электронной плотности отдельных частей рассеивающего объекта, можно предположить, что в белке имеется более разреженный поверхностный слой, так как на профиле $p(r)$ в интервале размеров ~8–9,6 нм присутствует слабо рассеивающий «хвост». Из литературных данных и наших предыдущих исследований следует, что это рассеяние соответствует рассеянию гибкими *N*-концевыми доменами белка [24, 50, 51].

Структура низкого разрешения Dps (шариковая модель) была восстановлена по кривой малоуглового рассеяния с использованием программы DAMMIN [47]. Восстановление формы основано на алгоритме имитации отжига в пределах сферы, диаметр которой равен максимальному размеру макромолекулы белка D_{max}, который, в свою очередь, определялся из функции распределения по расстояниям и был равен 9,6 нм. Результаты восстановления представлены на рис. 2, *б* серыми шариками. Коэффициент невязки χ^2 с экспериментальными данными равен 1,9, что свидетельствует о хорошем соответствии экспериментальной кривой МУРР и кривой рассеяния от полученной формы низкого разрешения (рис. 2, *а*, кривая *2*). Шариковая модель структуры Dps имеет центральную полость и соответствует известной кристаллической структуре белка (PDB ID: 1DPS) (рис. 2, *б*), хотя шариковая модель несколько больше по размеру за счёт рассеяния *N*-концевыми доменами, которые отсутствуют в структуре атомного разрешения 1DPS из-за гибкости и невозможности их кристаллизации [26].

Основные структурные характеристики Dps, полученные непосредственно по кривой малоуглового рассеяния без применения моделирования (инварианты МУРР), представлены в табл. 1.

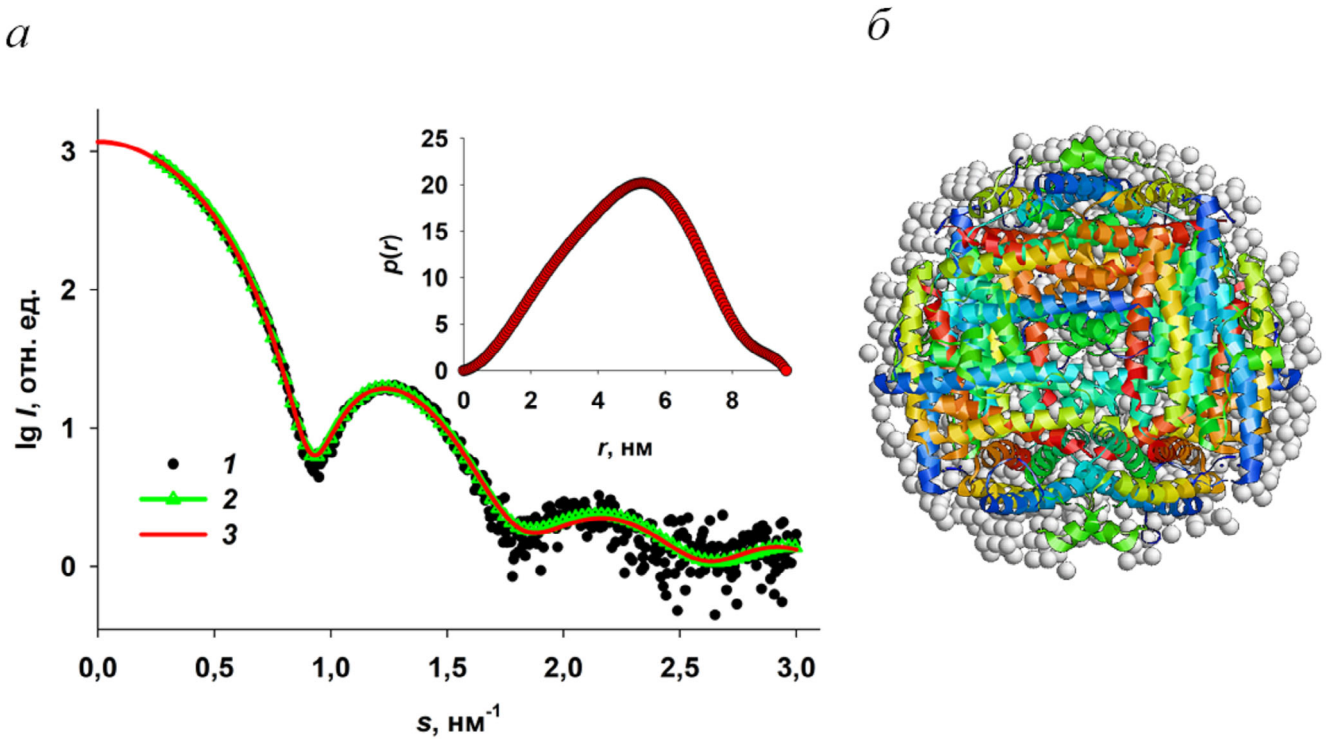

Рис. 2. Восстановление формы низкого разрешения белка Dps. *а* – Экспериментальная кривая малоуглового рентгеновского рассеяния (*1*); теоретическая кривая рассеяния, рассчитанная от шариковой модели, полученной с помощью программы DAMMIN (*2*); теоретическая кривая рассеяния, рассчитанная от функции распределения по расстояниям *p*(*r*) (*3*). Вставка: функция распределения по расстояниям *p*(*r*). *б* – Наложение кристаллической структуры Dps (цветные спирали) на шариковую модель, полученную с помощью программы DAMMIN (серые шарики)

Данные табл. 1 вместе с восстановленной формой низкого разрешения белка свидетельствуют о нативном состоянии Dps, соответствуют характеристикам этого белка, известным из литературы [26, 50, 51] и дают возможность его дальнейшего использования в исследовании процессов накопления атомов железа во внутренней полости белкового додекамера.

Использование аномального малоуглового рассеяния для изучения формирования наночастиц железа в Dps. Экспериментальные кривые аномального малоуглового рассеяния, измеренные при разных энергиях излучения, приведены на рис. 3.

Анализ кривых рассеяния от образцов с разным содержанием ионов Fe^{3+}, измеренных при разных энергиях излучения $E_{1\text{-}7}$, позволяет выявить следующие особенности процесса взаимодействия белка Dps с ионами железа.

1. Кривые рассеяния при энергии E_0 вдали от полосы поглощения железа (10 000 кэВ, λ = 0,124 нм) и при энергиях $E_{1,\ 2}$ (7,100 и 7,110 кэВ) практически совпадают для всех Fe-содержащих образцов. По этой причине кривые МУРР, измеренные при E_0, не показаны на рис. 3, чтобы не перегружать его.

2. Низкое содержание железа (50 атомов на молекулу Dps) не влияет на общие структурные характеристики белка при энергиях относительно далеких от *K*-полосы поглощения железа. Важно ещё раз подчеркнуть, что предварительный структурный анализ исходного белка Dps при энергии E_0 показал, что белок находится в состоянии, пригодном для использования его в качестве матрицы для формирования наночастиц железа.

3. В отличие от образца с низким содержанием железа (Dps-Fe50), образцы Dps-Fe500 и Dps-Fe2000 демонстрируют значительное увеличение интенсивности рассеяния в самых малых углах, т.е. проявляют высокую полидисперсность за счёт способности железа, как переходного металла, образовывать устойчивые ком-

Таблица 1. Основные структурные характеристики белка Dps

Образец	R_g, нм	V_P, нм^3	D_{max}, нм	MM_{Porod}, кДа	$MM_{Bayesian}$, кДа
Dps	3,9 ± 0,2	330 ± 30	9,6	190 ± 20	210

плексы, например с азотом аминогрупп белка, стягивая между собой белковые цепи соседних макромолекул. Таким образом, белковая матрица существенно меняется при взаимодействии с соединением железа, и применение в данном случае аномального малоуглового рассеяния является сугубо необходимым.

4. В образцах с высоким содержанием ионов железа (Fe500 и Dps-Fe2000) следует ожидать наличия крупных металлических наночастиц за счёт образования белковых агрегатов, содержащих металл.

5. Кривые рассеяния, измеренные при разных энергиях фотонов $E_{1\text{-}7}$, показывают определённую зависимость от энергии падающего пучка в интервале угловых векторов $0{,}5 < s < 1{,}3$ нм$^{-1}$ с минимумом при $s = 0{,}95$ нм$^{-1}$ (рис. 3). Хотя эта зависимость наиболее заметна для образца Dps-Fe2000, тем не менее для всех железосодержащих образцов появляется возможность вычислить разность между кривыми рассеяния, полученными при различных энергиях $\Delta_k(s) = I(s, E_1) - I(s, E_k)$, которая пропорциональна рассеянию резонансными атомами Fe и

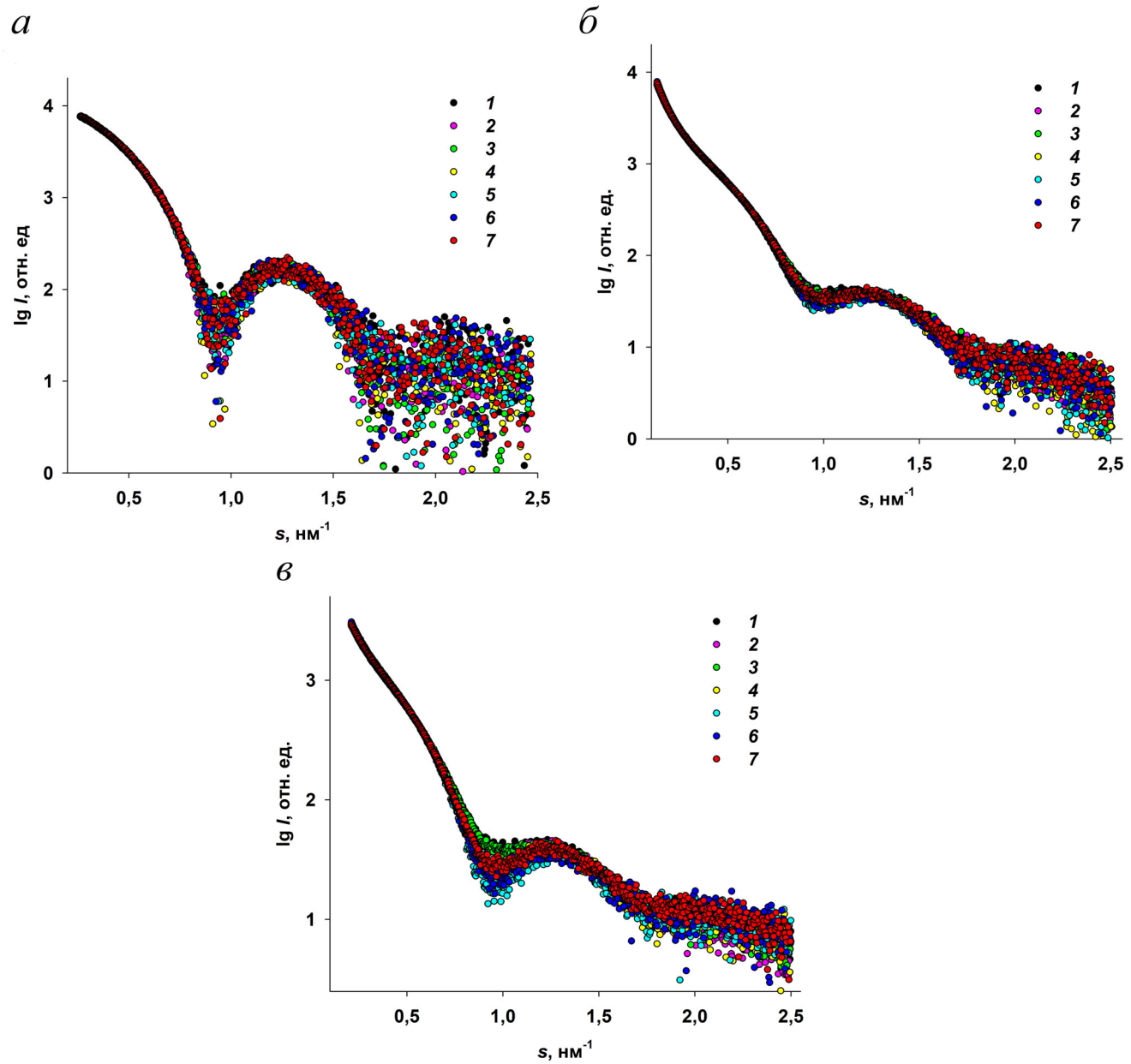

Рис. 3. Экспериментальные кривые рассеяния от трёх Fe-содержащих образцов белка Dps, измеренные при различных энергиях фотонов: Dps-Fe50 (*а*); Dps-Fe500 (*б*); Dps-Fe2000 (*в*). Номера кривых рассеяния соответствуют номерам энергий излучения E_{1-7}: 7,100; 7,110; 7,118; 7,125; 7,128; 7,130 и 7,133 кэВ

может быть использована для анализа распределений по размерам образованных в белковой матрице наночастиц металла.

6. Максимум аномального сигнала для всех Fe-содержащих образцов зарегистрирован при энергии фотонов E_5 = 7,128 кэВ, т.е. вблизи *K*-полосы поглощения Fe (рис. 1). Соответственно, кривая рассеяния при этой энергии использовалась для получения резонансного сигнала $\Delta_5(s) = I(s, E_1) - I(s, E_5)$ только от наночастиц железа, образующихся во внутреннем пространстве белка Dps. Критерием того, что разностный сигнал действительно вызван исключительно рассеянием частицами Fe, является отсутствие на полученных кривых аномального сигнала рассеяния от белковой матрицы, т.е. от формфактора Dps. Этому критерию удовлетворяли все Fe-содержащие образцы (рис. 4, *а*).

Полученные кривые аномального сигнала использовались затем для расчёта объёмных функций распределения по размерам $D_V(R)$ наночастиц оксида железа, образующихся во внутренних полостях додекамера Dps (рис. 4, *б*). Важно отметить, что кривые аномального рассеяния достаточно хорошо выражены для образцов Dps-Fe500 и Dps-Fe2000, в то время как для образца Dps-Fe50 этот сигнал слабый и зашумлённый. Поэтому функцию распределения по размерам, рассчитанную по этой кривой, следует рассматривать только как оценочную.

Анализируя полученные объёмные распределения по размерам (рис. 4, *б*), можно отследить следующие закономерности. При малом содержании ионов железа формируются преимущественно мелкие наночастицы с размерами ~2 нм. При увеличении содержания железа до 500 атомов на молекулу белка также появляются наночастицы размером 4–5 нм (плечо на графике функции $D_V(R)$) и более крупные формирования размером до 20 нм, относящиеся к наночастицам оксида железа в белковых агрегатах. Последних, однако, при таком содержании ионов железа формируется совсем немного. И, наконец, при концентрации железа 2000 атомов на додекамер исчезают частицы размером 2 нм и преимущественно образуются частицы размером 4–5 нм, а также крупные Fe-содержащие структуры. То есть при высоких концентрациях железа внутренние полости белка практически полностью заполняются наночастицами ионов металла. Их размер ограничивается и определяется размером внутренней полости додекамера Dps и концентрацией железа в растворе, что имеет значение с точки зрения возможного использования матрицы этого белка для формирования стабилизированных в растворе металлических наночастиц.

Таблица 2. Фракционный состав наночастиц железа в белке Dps

Образец	Интервал $D_{min} - D_{max}$, нм	D_{result}, нм	Объёмная доля, %
Dps-Fe50	1,8–3,0	1,3	94
	4,0–6,0	4,6	1,0
	8,0–15,0	12,6	5,0
Dps-Fe500	1,8–3,0	2,0	44
	4,0–6,0	4,0	43
	8,0–15,0	8,0	13
Dps-Fe2000	1,8–3,0	1,5	44
	4,0–6,0	4,0	40
	8,0–15,0	9,0	16

Похожие результаты были получены альтернативным методом определения фракционного состава наночастиц железа в додекамере белка с помощью программы MIXTURE в предположении сферичности образованных наночастиц. Для каждого образца были заданы по три фракции с достаточно широким интервалом размеров $D_{min} - D_{max}$. Для каждой фракции программа MIXTURE рассчитала средний размер частиц и объёмную долю фракций (табл. 2).

Как и в случае определения объёмных распределений по размерам $D_V(R)$ с помощью интерактивной программы GNOM, в случае использования программы MIXTURE во всех образцах доминирующей фракцией оказываются наночастицы с размерами 2–4 нм и присутствует небольшое количество более крупных образований. Поскольку в обоих методах определяются объёмные доли наночастиц, то в количественном выражении число крупных частиц невелико даже для высокой концентрации атомов железа в исходном растворе, но из-за своего размера такие большие частицы вносят существенный вклад в рассеяние в самых малых углах, что хорошо видно на рис. 3, *б* и *в*.

Кривые малоуглового рассеяния, рассчитанные по указанным в табл. 2 фракционным составам каждого образца, хорошо соответствуют полученным аномальным сигналам (рис. 5).

Мультифазное *ab initio* моделировние по данным МУРР. Из анализа литературных данных известно, что сайты связывания ионов железа находятся не только во внутренней полости белка, но также и на поверхности додекамера Dps [28–30, 52]. В этом случае наночастицы не образуются, но поскольку на каждый мономер

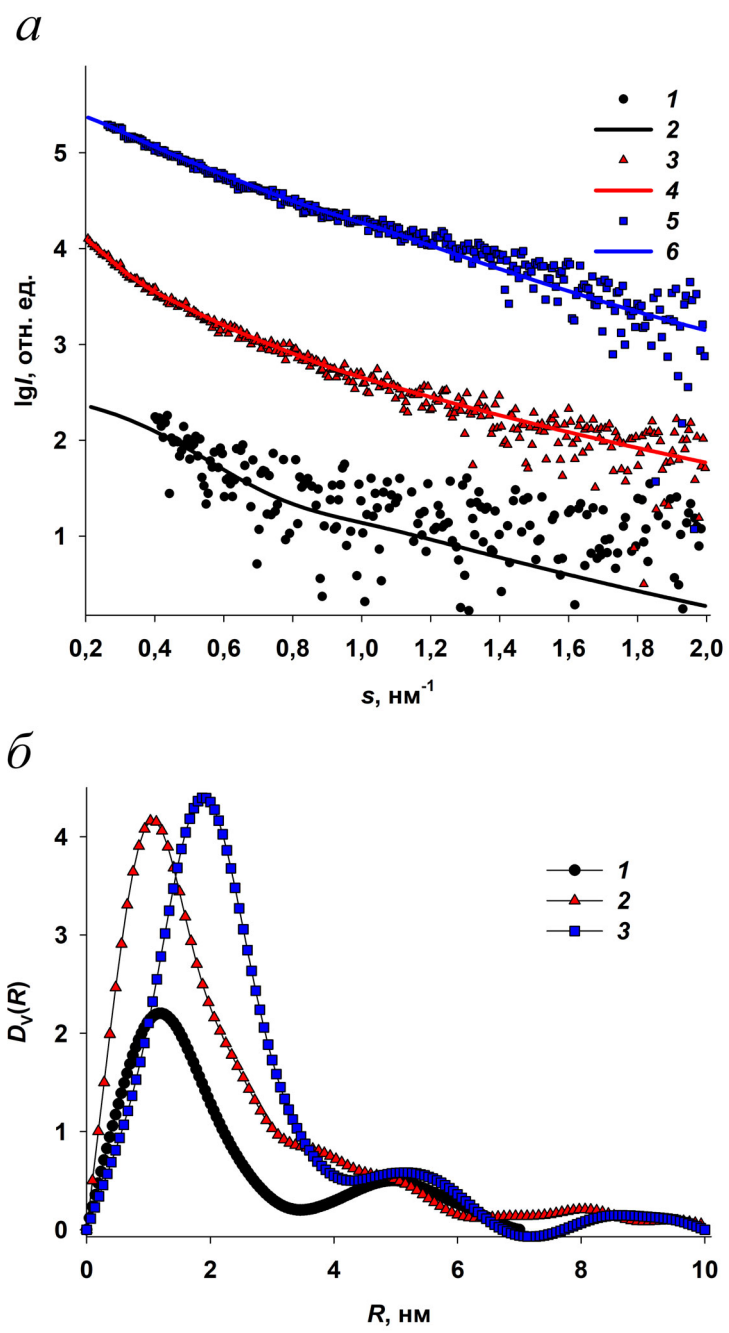

Рис. 4. Определение распределений по размерам наночастиц оксида железа по данным аномального малоуглового рассеяния. *а* – Разностные кривые (аномальный сигнал) $\Delta_5(s) = I(s, E_1) - I(s, E_5)$ и соответствующие расчётные кривые рассеяния от распределений по размерам наночастиц железа для образцов Dps-Fe50 (*1* и *2*); Dps-Fe500 (*3* и *4*) и Dps-Fe2000 (*5* и *6*). *б* – Объёмные распределения по размерам $D_V(R)$ наночастиц железа в образцах Dps-Fe50 (*1*), Dps-Fe500 (*2*) и Dps-Fe2000 (*3*), рассчитанные по кривым аномального сигнала программой GNOM

может приходиться до четырёх аминокислот, присоединяющих ионы металла в области *N*-концевых доменов белка, то в сумме эти атомы железа, благодаря своей высокой электронной плотности, вносят свой вклад в рассеяние всей макромолекулы в целом и в распределения по размерам в частности. В малоугловом рассеянии существует метод, позволяющий использовать различие в электронных плотностях отдельных частей рассеивающих объектов, чтобы локализовать те или иные особенности структуры, связанные с этим различием. Таким методом является *ab initio* метод мультифазного моделирования, который реализован в программе MONSA [47].

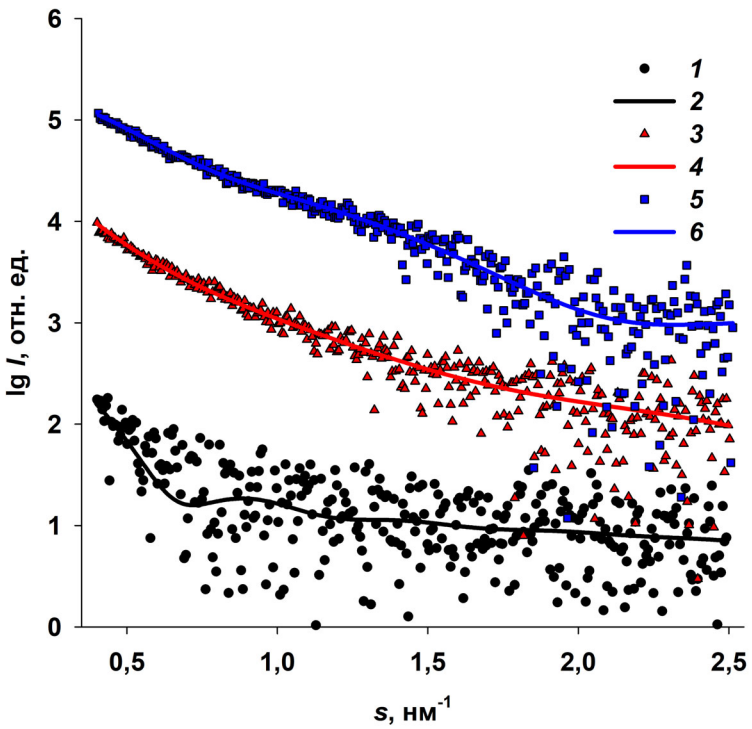

Рис. 5. Сравнение разностных кривых (аномальных сигналов) $\Delta_5(s) = I(s, E_1) - I(s, E_5)$ и соответствующих расчётных кривых рассеяния от распределений по размерам наночастиц, содержащих железо, для образцов Dps-Fe50 (*1* и *2*); Dps-Fe500 (*3* и *4*) и Dps-Fe2000 (*5* и *6*), полученных с помощью программы MIXTURE

Для решения структурной задачи в этом подходе необходимо учитывать различие электронных плотностей белковой и металлической составляющих комплекса, а также соотношение их объёмов. Для получения двухфазной модели белок–металл были использованы кривые малоуглового рассеяния от исходного белка и белка, содержащего атомы железа. Был выбран образец Dps-Fe500 со средним содержанием железа, когда можно надежно детектировать сформированные наночастицы во внутренней полости белка, но в то же время на фоне сильного рассеяния от этих наночастиц можно будет определить локализацию значительно более мелких металлсодержащих групп на поверхности додекамера. Результаты моделирования представлены на рис. 6.

Мультифазное моделирование позволило впервые визуализировать локализацию атомов железа в поверхностном слое белка и в то же время подтвердить расположение основной массы металла в центральной полости додекамера. При этом получено хорошее соответствие между экспериментальными данными и расчётными кривыми от шариковых моделей с $\chi^2 = 2{,}1$. Такая обобщённая модель даёт наиболее полную картину формирования наночастиц оксида железа в ферритин-подобном белке, имеющем также функцию защиты генетического материала бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хорошо известно, что не все мини-ферритины могут выполнять функцию защиты бактериального генома при окислительном стрессе и отнюдь не все нуклеоид-ассоциированные белки способны к детоксикации и накапливанию атомов железа. Поэтому многофункциональность ферритин-подобного белка Dps уникальна, и её следствием является устойчивая резистентность бактерий к лекарственным препаратам и антибиотикам. Безусловно, основное внимание исследователей привлекает способность Dps к *in cellulo* биокристаллизации с ДНК. Образовавшиеся таким образом персистирующие клетки микроорганизмов толерантны ко многим внешним воздействиям и могут сохранять жизнеспособность в течение очень долгого времени, а при наступлении благоприятных условий дают начало новой популяции, сохраняющей свои патогенные свойства [53]. Поэтому архивация ДНК в процессе *in cellulo* сокристаллизации с Dps требует внимания и глубокого изучения. Однако не менее важно исследовать спо-

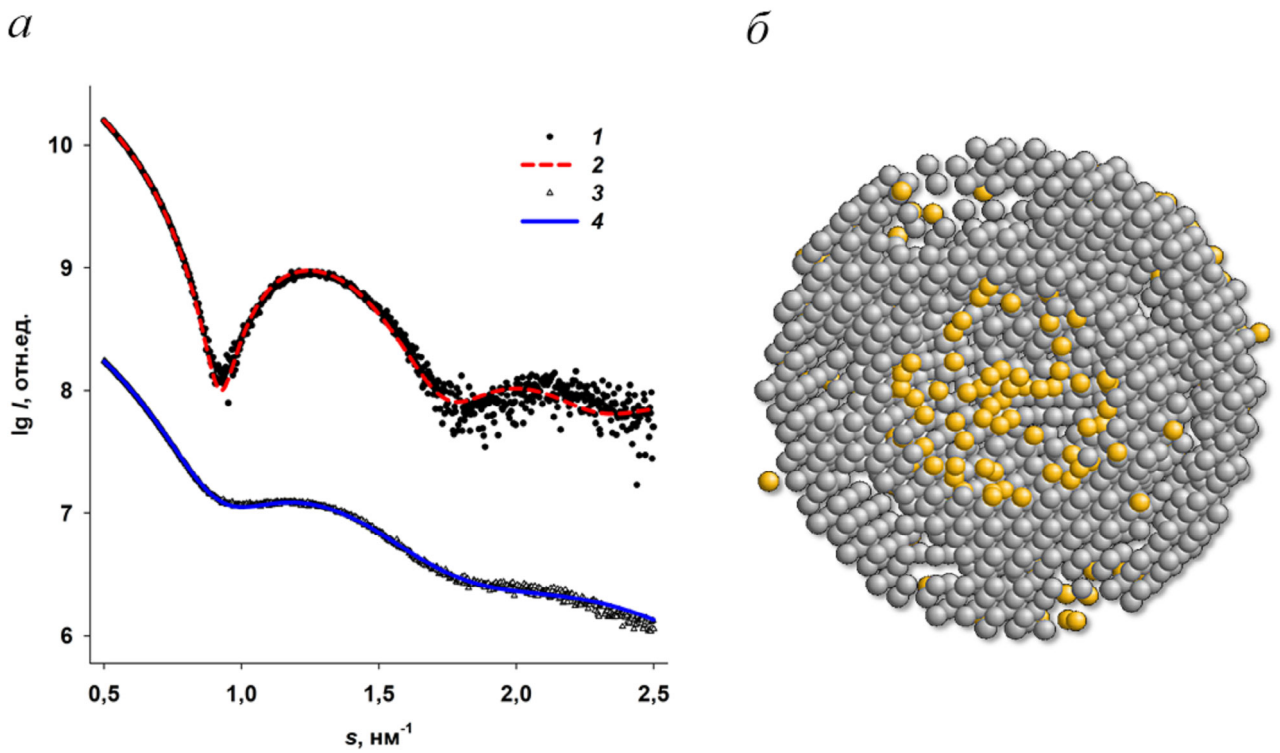

Рис. 6. Мультифазное моделирование комплекса Dps с железом с помощью программы MONSA. *а* – Экспериментальная кривая малоуглового рассеяния от исходного Dps (*1*); рассеяние от белковой части мультифазной модели (*2*); экспериментальные данные от комплекса Dps-Fe500 (*3*); рассеяние от полной мультифазной модели (*4*). *б* – Мультифазная модель. Серые шарики обозначают белок, желтые – кластеры железа. Модель показана в разрезе для лучшей визуализации

собность Dps к детоксикации и переработке Fe^{2+} в нетоксичную Fe^{3+}-форму с последующим накоплением ионов трёхвалентного железа во внутреннем пространстве белка, т.е. также в защищённом от внешних воздействий состоянии. Обе функции Dps тесно связаны между собой [30]. В наших предыдущих работах мы исследовали закономерности образования Dps–ДНК сокристаллов, в том числе при взаимодействии с двухвалентными ионами металлов [37, 38, 50]. В данной работе мы изучали вторую особенность функциональных свойств Dps, а именно: процесс накопления ионов железа во внутренней полости этого мини-ферритина. Применяя метод аномального малоуглового рассеяния, нам удалось показать, что в основном внутри белковой молекулы формируются наночастицы с размерами 2–4 нм, т.е. рост металлических наночастиц ограничен пространственными характеристиками внутренней полости белка. Однако некоторое количество ионов железа содержится также в поверхностном слое Dps. Этот слой очень важен для выполнения белком своих защитных функций, поскольку находящиеся здесь *N*-концевые домены определяют характер взаимодействия Dps с ДНК в растворе, и именно гибкие, богатые лизином *N*-концевые домены ответственны за взаимодействие с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом дезоксирибонуклеиновой кислоты [15, 22–24]. Соответственно, *N*-концевые домены белка должны быть доступны для связи с ДНК [50, 51, 53]. Однако атомы железа могут связываться с отрицательно заряженными аминокислотами Asp и Glu в тех же самых *N*-концевых областях Dps. Железо относится к переходным металлам и образует прочные комплексы, например с азотом (N), входящим в состав аминогрупп аминокислот. Поэтому двухвалентные атомы железа могут образовывать связи с соседними белковыми цепями, притягивая их друг к другу и стабилизируя поверхностные участки додекамера. В этом случае *N*-концевые домены оказываются прижатыми к поверхности белка и образование кристаллического комплекса Dps–ДНК не происходит [50, 54]. Однако присутствие в растворе хелатирующего агента, например ЭДТА, может разрушить эти связи железа с аминокислотами на поверхности додекамера, и это может стать способом восстановления взаимодействия Dps с ДНК, не затрагивая внутренних областей белка и сформированных там наночастиц. Таким образом, зарядовое состояние ионов железа в составе Dps (на поверхности

и в ядре) имеет большое значение и нуждается в глубоком изучении.

Структурные исследования с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния не позволяют определить валентное состояние железа. По определению, функция белков, подобных ферритину (в том числе Dps), состоит в окислении Fe^{2+} до трёхвалентного состояния с последующим накоплением этой нетоксичной формы в центральной полости белка. Однако имеются работы, показывающие, что механизм удаления двухвалентного железа из раствора и окисления его в соответствующих сайтах белка носит более сложный характер. Так, при использовании метода Мёссбауэровской спектроскопии для определения зарядового состояния ионов железа была показана неоднородность неорганической составляющей Dps. Оказалось, что железо в белке находится в форме магнетита $FeO \cdot Fe_2O_3$, т.е. представляет собой смесь ионов двухвалентного и трёхвалентного железа [55]. При этом авторами был сделан вывод, что именно такой состав неорганических ядер Dps способствует поддержанию додекамерной структуры белка.

В целом, процесс формирования внутри белковой полости Dps наночастиц, содержащих атомы металлов, и не только железа, но, например, кобальта и, возможно, других, представляет определённый практический интерес. Поэтому проведённые в данной работе исследования могут быть полезными не только в плане изучения уникальных свойств Dps, но также могут быть вкладом в разработку стабилизированных в растворе биосовместимых нанокапсул, обладающих магнитными свойствами. Пластичность и структурная устойчивость белковой матрицы Dps может служить определенным гарантом возможности разработки таких технологий [56].

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10071).

Благодарности. Авторы благодарят А. Грузинова, сотрудника Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), за проведение экспериментов по аномальному малоугловому рассеянию и ценную дискуссию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., and Robinson, N. J. (2009) Metalloproteins and metal sensing, *Nature*, **460**, 823-830.
2. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L., and Thornton, J. M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 1205-1218.
3. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science*, **277**, 653-659.
4. Fenton, H. J. H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc. Trans.*, **65**, 899-910.
5. Briat, J.-F. (1992) Iron assimilation and storage in prokaryotes, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2475-2483.
6. Andrews, S. C. (1998) Iron storage in bacteria, *Adv. Microbial. Physiol.*, **40**, 281-351.
7. Harrison, P. M., and Arosio, P. (1996) The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 161-203.
8. Theil, E. C. (1987) Ferritin, structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms, *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 289-315.
9. Levi, S., Salfeld, J., Franceschinelli, F., Cozzi, A., Dorner, M. H., et al. (1989) Expression and structural and functional properties of human ferritin L-chain from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **28**, 5179-5184.
10. Hudson, A. J., Andrews, S. C., Hawkins, C., Williams, J. M., Izuhara, M., et al. (1993) Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin, *Eur. J. Biochem.*, **218**, 985-995.
11. Andrews, S. C., Smith, J. M. A., Guest, J. R., and Harrison, P. M. (1990) Genetic and structural characterization of the bacterioferritin of *Escherichia coli*, *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 658-659.
12. Cheesman, M. R., Le Brun, N. E., Kadir, F. H. A., Thomson, A. J., Moore, G. R., et al. (1993) Haem and non-haem iron sites in *Escherichia coli* bacterioferritin: Spectroscopic and model building studies, *Biochem. J.*, **292**, 47-56.
13. Chasteen, N. D. (1998) Ferritin. Uptake, storage, and release of iron, *Met. Ions Biol. Syst.*, **35**, 479-514.
14. Romao, C. V., Louro, R., Timkovich, R., Lëubben, M., Liu, M.-Y., et al. (2000) Iron-coproporphyrin III is a natural cofactor in bacterioferritin from the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*, *FEBS Lett.*, **480**, 213-216.
15. Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., and Kolter, R. (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*, *Genes Dev.*, **6**, 2646-2654.
16. Nair, S., and Finkel, S. E. (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase, *J. Bacteriol.*, **186**, 4192-4198.
17. Frenkiel-Krispin, D., and Minsky, A. (2006) Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans*, *J. Struct. Biol.*, **156**, 311-319.
18. Frenkiel-Krispin, D., Ben-Avraham, I., Englander, J., Shimoni, E., Wolf, S. G., et al. (2004) Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria, *Mol. Microbiol.*, **51**, 395-405.
19. Reich, Z., Wachtel, E. J., and Minsky, A. (1994) Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria, *Science*, **264**, 1460-1463.
20. Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., et al. (1999) DNA protection by biocrystallization, *Nature*, **400**, 83-85.

21. Stephani, K., Weichart, D., and Hengge, R. (2003) Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **49**, 1605-1614.
22. Azam, T. A., and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33105-33113.
23. Azam, T. A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid, *J. Bacteriol.*, **181**, 6361-6370.
24. Ceci, P., Cellai, S., Falvo, E., Rivetti, C., Rossi, G. L., et al. (2004) DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5935-5944.
25. Gupta, S., and Chatterji, D. (2003) Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5235-5241.
26. Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., and Hogle, J. M. (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 294-303.
27. Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., et al. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 27689-27696.
28. Ilari, A., Ceci, P., Ferrari, D., Rossi, G. L., and Chiancone, E. (2002) Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core, *J. Biol. Chem.*, **277**, 37619-37623.
29. Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., and Tsernoglou, D. (2000) The dodecameric ferritin from Listeria innocua contains a novel intersubunit iron-binding site, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 38-43.
30. Nguyen, K. H., and Grove, A. (2012) Metal binding at the *Deinococcus radiodurans* Dps-1N-terminal metal site controls dodecameric assembly and DNA binding, *Biochemistry*, **51**, 6679-6689.
31. Smith, J. L. (2004) The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **30**, 173-185.
32. Feigin, L. A., and Svergun, D. I. (1987) *Structure Analysis by Small-Angle x-Ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York.
33. Stuhrmann, H. B. (1980) Anomalous dispersion of small-angle scattering of horse-spleen ferritin at the Iron K absorption edge, *Acta Crystallogr. A*, **36**, 996-1001.
34. Stuhrmann, H. B., and Notbohm, H. (1981) Configuration of the four iron atoms in dissolved human hemoglobin as studied by anomalous dispersion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6216-6220.
35. Stuhrmann, H. B. (1985) Resonant scattering in macromolecular structure research, *Adv. Polym. Sci.*, **67**, 123-163.
36. Stuhrmann, H. B., Goerigk, G, and Munk, B. (1994) *Anomalous X-ray Scattering*, Elsevier, Amsterdam.
37. Dadinova, L. A., Chesnokov, Y. M., Kamyshinsky, R. A., Orlov, I. A., Petoukhov, M. V., et al. (2019) Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: An *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography, *FEBS Lett.*, **593**, 1360-1371.
38. Kamyshinsky, R., Chesnokov, Y., Dadinova, L., Mozhaev, A., Orlov, I., et al. (2020) Polymorphic protective Dps–DNA co-crystals by cryo electron tomography and small angle X-ray scattering, *Biomolecules*, **10**, 39.
39. Grimsley, G. R., and Pace, C. N. (2004) Spectrophotometric determination of protein concentration, *Curr. Protoc Protein Sci.*, **3**, doi: 10.1002/0471140864.ps0301s33.
40. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., et al. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY), *J. Appl. Crystallogr.*, **48**, 431-443.
41. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **36**, 1277-1282.
42. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., et al. (2021) ATSAS 3.0: Expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **54**, 343-355.
43. Hajizadeh, N. R., Franke, D., Jeffries, C. M., and Svergun, D. I. (2018) Consensus Bayesian assessment of protein molecular mass from solution X-ray scattering data, *Sci. Rep.*, **8**, 7204.
44. Porod, G. (1982) *Small Angle X-Ray Scattering*, Academic Press, London.
45. Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., et al. (2017) ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *J. Appl. Cryst.*, **50**, 1212-1225.
46. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495-503.
47. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886.
48. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRYSOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.*, **28**, 768-773.
49. Gruzinov, A. Y., Schroer, M. A., Manalastas-Cantos, K., Kikhney, A. G., Hajizadeh, N. R., et al. (2021) Anomalous SAXS at P12 beamline EMBL Hamburg: Instrumentation and applications, *J. Synch. Rad.*, **28**, 812-823.
50. Сошинская Е. Ю., Дадинова Л. А., Можаев А. А., Штыкова Э. В. (2020) Влияние состава буфера на конформационную подвижность N-концевых фрагментов Dps и характер взаимодействия с ДНК. Исследование методом малоуголового рентгеновского рассеяния, *Кристаллография*, **65**, 886-895.
51. Dubrovin, E. V., Dadinova, L. A., Petoukhov, M. V., Soshinskaya, E. Yu., Mozhaev, A. A., et al. (2021) Spatial organization of Dps and DNA–Dps complexes, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166930.
52. Minato, T., Teramoto, T., Kakuta, Y., Ogo, S., and Yoon, K. S. (2020) Biochemical and structural characterization of a thermostable Dps protein with His-type ferroxidase centers and outer metal-binding sites, *FEBS Open Bio*, **10**, 1219-1229.
53. Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016) Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure, *Science*, **354**, aaf4268.
54. Dadinova, L., Kamyshinsky, R., Chesnokov, Yu., Mozhaev, A., Matveev, V., et al. (2021) Structural rearrangement of Dps–DNA complex caused by divalent Mg and Fe cations, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6056.
55. Antipov, S., Turishchev, S., Purtov, Yu., Shvyreva, U., Sinelnikov, A., et al. (2017) The oligomeric form of the *Escherichia coli* Dps protein depends on the availability of iron ions, *Molecules*, **22**, 1904.
56. Zeth, K., Sancho-Vaello, E., and Okuda, M. (2019) Metal positions and translocation pathways of the dodecameric ferritin-like protein Dps, *Inorg. Chem.*, **58**, 11351-11363.

FORMATION OF IRON OXIDE NANOPARTICLES IN INTERNAL CAVITY OF FERRITIN-LIKE Dps PROTEIN. INVESTIGATION WITH ANOMALOUS DISPERSION OF X-RAYS

E. V. Shtykova[1]*, M. V. Petoukhov[1,2], and A. A. Mozhaev[1,3,4,5]

[1] *Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; e-mail: shtykova@ns.crys.ras.ru*

[2] *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

[3] *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

[4] *Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia*

[5] *National Research University Higher School of Economics, 101000 Moscow, Russia*

DNA-binding protein of starvation (Dps) plays a special role among dodecamer miniferritins. Its most important function is to protect the bacterial genome from various types of destructive external influences by means of *in cellulo* Dps-DNA co-crystallization. The consequence of such a protective reaction is the emergence of bacterial resistance to antibiotics and other drugs. Therefore, great attention is paid to the study of the genome-protective properties of Dps. However, the other side of Dps functionality is equally important. Being ferritin-like, this protein acts as an iron storage depot and protects bacterial cells from oxidative damage initiated by its excess. The study of this phenomenon is also very relevant, and this work is devoted to the study of the formation of iron oxide nanoparticles in the internal cavity of the Dps dodecamer. The method of anomalous small-angle scattering was chosen as the main research method, which makes it possible to study the structure of metal-containing biological macromolecules and determine the size distribution of metal nanoparticles formed in them. The contributions of the protein and metal components to the total scattering are separated by varying the energy of the incident X-ray radiation near the edge of the absorption band by metal atoms, in this case the *K*-absorption band of iron. Dps samples containing 50, 500, and 2000 iron atoms per protein dodecamer were examined. An analysis of the obtained size distributions showed that, depending on the iron content in the solution, nanoparticles with sizes of 2-4 nm are formed inside the protein molecule, and the growth of metal nanoparticles is limited by the size of the central cavity of the protein. It was also shown that some amount of iron ions is contained in the surface layer of Dps. This layer is very important for the protein to perform its protective functions, since the N-terminal domains located here determine the nature of the interaction between Dps and DNA. In general, the results obtained in this work can be useful as the next step in the study of the Dps phenomenon, as well as from a practical point of view, in the creation of biocompatible and solution-stabilized metal nanoparticles.

Keywords: ferritin-like proteins, Dps, iron oxide, anomalous SAXS, size distribution