

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

### Изучение особенностей формирования кластеров железа во внутренней полости ферритин-подобного белка Dps методом аномального малоуглового рентгеновского рассеяния

А. М. Гордиенко,<sup>1,2,а</sup> А. А. Можаяев,<sup>2,3,4,б</sup> В. В. Гибизова,<sup>1,в</sup> Л. А. Дадинова<sup>2,г</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

<sup>2</sup> ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Россия, 119333, Москва, Ленинский просп., д. 59

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии РАН им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН  
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

<sup>4</sup> РНИМУ им. Н. И. Пирогова, НИИ трансляционной медицины. Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Поступила в редакцию 16.07.2022, после доработки 12.09.2022, принята к публикации 20.09.2022.

Белок Dps (ДНК-связывающий белок из голодающих клеток) хорошо известен своей способностью защиты клеток от различных негативных факторов, в том числе окислительного стресса. Dps способен осуществлять быстрое окисление ионов двухвалентного железа с помощью пероксида водорода, а затем накапливать ионы трехвалентного железа в своей полости в форме трехвалентного минерала. Dps также способен связываться с ДНК, образуя высокоупорядоченные структуры, становясь наиболее распространенным белком нуклеотида в стационарной фазе, добавляя физическую защиту к химической. В этой работе аномальное малоугловое рентгеновское рассеяние (АМУРР) впервые использовано для изучения формирования кластеров железа в полости белка Dps из *Escherichia coli*. На основе созданного программного обеспечения с использованием известного алгоритма кривые АМУРР были разложены на резонансные, нерезонансные и перекрестные составляющие, которые впоследствии были использованы для вычисления среднего количества ионов, приходящихся на одну молекулу белка и определения *ab initio* структуры комплекса белок-железо. С помощью методов компьютерного моделирования получена детальная информация о распределении атомов железа внутри полости белка при различных концентрациях железа в растворе. Показано, что увеличение концентрации  $Fe^{2+}$  в растворе незначительно влияет на морфологию образующегося минерала железа, однако приводит к увеличению его объема, что хорошо согласуется с экспериментально определенным количеством ионов железа, приходящихся на одну молекулу Dps. Полученные значения оказались меньше расчетных, что может быть связано с присутствием в растворе хелатирующего агента.

**Ключевые слова:** белок Dps, мини-ферритин, аномальное малоугловое рентгеновское рассеяние.

УДК: 539.26. PACS: 87.80.-y.

#### ВВЕДЕНИЕ

Железо играет ключевую роль в жизни любого организма [1]. Являясь важнейшим химическим элементом, железо обладает рядом уникальных свойств, которые могут оказывать как положительное, так и негативное влияние на биологические системы [2]. Ионы железа участвуют во многих жизненно важных процессах, включая, помимо прочего, транспорт кислорода и создание функциональных каталитических центров многих ферментов. Присутствие свободных ионов железа токсично для клетки и, следовательно, контролируется различными клеточными механизмами системы. Ферритины, окисляющие ионы двухвалентного железа и накапливающие их в своей внутренней полости, играют важную роль в поддержании оптимального баланса. Одним из таких белков-ферритинов является ДНК-связывающий белок из голодающих клеток (Dps). Dps обладает способностью связываться с ДНК, образуя устойчивый кристаллический комплекс, тем

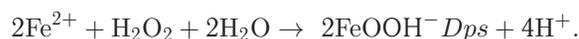
самым защищая ее от различных внешних воздействий, в том числе от окислительного стресса, вызванного реакцией Фентона [3].

Dps принадлежит к подсемейству белков-ферритинов, которое включает прокариотические и эукариотические ферритины и гемсодержащие бактериоферритины [4, 5]. Dps существует в виде гомододекамера диаметром 9 нм с тетраэдрической точечной групповой симметрией, состоящего из 12 идентичных субъединиц с молекулярной массой 18.7 кДа [6].

Механизм защиты бактериального генома от окислительного стресса обуславливается окислением двухвалентного железа до трехвалентного состояния без образования гидроксильных радикалов, пагубно влияющих на любые биологические системы. Окисление ионов железа должно проходить по реакции Фентона [7]:



Однако в ферроксидазных центрах, расположенных на стыке между субъединицами белка, происходит реакция окисления железа без выделения свободных радикалов:



<sup>а</sup> E-mail: alex.gor99@mail.ru

<sup>б</sup> E-mail: a.a.mozhaev@gmail.com

<sup>в</sup> E-mail: gibizova@physics.msu.ru

<sup>г</sup> E-mail: lubovmsu@mail.ru

В результате своей антиоксидантной активности, проявляющейся в снижении эффективности реакции Фентона, в белке Dps концентрируются окисленные ионы трехвалентного железа в его внутренней полости размером 4.5 нм. Понимание молекулярных механизмов связи между экспрессией Dps и устойчивостью бактерий к окислительному стрессу находится в центре внимания большинства современных исследований семейства ферритиновых белков, так как важнейшим следствием защитной функции Dps является возникновение бактериальной резистентности ко многим лекарствам, в том числе к антибиотикам [8]. Кроме того, недавние исследования показывают возможность использования ферритиновых белков для создания потенциальных биосенсителers в терапевтических целях [9], что открывает большие возможности для будущих работ в области синтетической и структурной биологии. Dps также можно использовать в качестве естественного биосенсора электромагнитного излучения, благодаря способности накапливать железо и создавать магнитный момент внутри своей уникальной оболочки и достаточно тонком внешнем атомарном слое белка, что крайне эффективно для диагностической медицины ввиду необходимости хорошей стабилизации магнитных наночастиц. Вариативность размеров и формы, удобство связывания как гидрофильных, так и гидрофобных веществ делают наночастицы выгодными платформами для таргет-специфичной и контролируемой доставки микро- и макромолекул в терапии, в том числе онкологических заболеваний. Наночастицы в сочетании с терапевтическими агентами решают проблемы, связанные с традиционной терапией; тем не менее некоторые вопросы, такие как побочные эффекты и токсичность, все еще обсуждаются и должны быть тщательно изучены перед их использованием в биологических системах [10]. Поэтому важно понимать специфические свойства терапевтических наночастиц и стратегии их доставки. В связи с этим исследование механизмов взаимодействия ионов железа с ферритино-подобным белком Dps, а также изучение процессов накопления железа в его внутренней полости представляют большой научный и практический интерес.

Хотя основные механизмы поступления и окисления железа известны, многие важные вопросы о формировании железного ядра и механизме высвобождения железа в ответ на клеточные функции все еще требуют ряда исследований.

Недавно мы выяснили влияние катионов двухвалентного железа на структуру защитного комплекса Dps–ДНК с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ). Оказалось, что присутствие  $Fe^{2+}$  в растворе приводит к полному разрушению и агрегации комплекса без возможности его восстановления хелатирующим агентом. Используя анализ одиночных частиц Dps с накопленным железом, мы показали локализацию наночастиц железа внутри полости Dps рядом с гидрофобной порой, вблизи трех остатков глутамата [11]. Далее с помощью просвечивающей криоэлектронной микроскопии (крио-

ПЭМ) показано, что концентрация  $Fe^{2+}$  в растворе и время инкубации незначительно влияют на объем и морфологию минералов железа, образующихся в полости белка. Однако повышение концентрации  $Fe^{2+}$  приводит к увеличению доли более крупных кластеров, а сами кластеры состоят из дискретных субъединиц  $\sim 1 - 1.5$  нм [12]. В продолжение данного исследования мы последовательно изучили процесс накопления ионов железа в белке Dps с помощью аномального МУРР (АМУРР).

Особенностью метода АМУРР является возможность прямого исследования распределения связанных и ассоциированных противоионов в полимерных биосистемах путем выбора энергии рентгеновского излучения вокруг края поглощения интересующего противоиона [13] и изменения контраста для конкретного элемента [14]. Этот метод дает возможность определять пространственное распределение атомов различных металлов, входящих в состав биологических макромолекул. Первые работы АМУРР по изучению связывания ферритина, гемоглобина и цезия были выполнены сорок лет назад [15]. Благодаря недавнему прогрессу в области приборостроения, а также уменьшению фонового рассеяния и увеличению потока фотонов на современных синхротронных каналах [16] в последнее десятилетие АМУРР успешно применяется для исследования распределения ионов вокруг полиэлектролитов, ДНК и мицелл [17]. Одна из последних работ посвящена экспериментам АМУРР с разбавленными растворами ферритина и нагруженного железом кобальтом апоферритина. Эти образцы исследовались вблизи резонансных рентгеновских K–краев Fe и Co соответственно. В результате исследования определено пространственное распределение атомов железа или кобальта, включенных в белковые клетки ферритина/апоферритина [18]. В данной работе аналогичная процедура АМУРР–анализа была применена к белку Dps, инкорпорированному железом. Анализ резонансных кривых позволил рассчитать среднее число атомов железа, приходящееся на молекулу белка при разных концентрациях  $Fe^{2+}$ . Впервые для такой системы был применен метод *ab initio* моделирования для получения модели системы Dps–железо. Это дало возможность исследовать внутреннюю структуру такой системы в условиях, близким к физиологическим.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1.1. Приготовление Fe–содержащих образцов Dps

Экспрессию, очистку и анализ Dps из *E. coli* проводили аналогично методике, описанной в работах [19, 20].

В раствор белка Dps с концентрацией 3 мг/мл с буфером 50 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис–HCl (pH 8.0) добавляли свежеприготовленный  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  в количестве, соответствующем  $\sim 50, 500$  и 2000 атомов железа на додекамер. Время инкубации белка с железом составило 24 ч.

### 1.2. Эксперимент по аномальному малоугловому рентгеновскому рассеянию и анализ данных

Измерения аномального малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (АМУРР) были выполнены

в Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL) на накопительном кольце PETRAIII (DESY, Гамбург) на линии EMBL-P12, оснащенной роботизированным устройством смены образцов и пиксельным рентгеновским детектором с 2D-подсчетом фотонов Pilatus 6M (DECTRIS, Швейцария) [21]. Эксперименты с аномальным рассеянием включают измерения кривых рассеяния при различных длинах волн рентгеновского излучения, что дает возможность исследовать образцы при различных энергиях падающего пучка [22–24].

Исследование проводилось для водных растворов железа с целью определения К-края поглощения и образцов, содержащих  $\sim 50$  (Dps-Fe50), 500 (Dps-Fe500) и 2000 (Dps-Fe2000) атомов железа на додекамер белка Dps при различных энергиях фотонов  $E_k$  вблизи К-края поглощения железа (при энергии фотонов около  $E = 7125$  эВ ( $\lambda = 0.174$  нм)). Полученные данные АМУРР были скорректированы на фоновое рассеяние и флуоресценцию, а затем были обработаны с помощью программного пакета ATSAS [25, 26].

Атомный фактор рассеяния определяется следующим образом:

$$f(E) = f_0 + f'(E) + if''(E), \quad (1)$$

где дисперсионные поправки  $f'(E)$  и  $f''(E)$  становятся существенными вблизи К-края полосы поглощения резонансного атома. Соответствующие поправочные коэффициенты  $f'$  и  $f''$  вблизи К-края поглощения для измеренных энергий ( $E = 7100, 7110, 7125, 7128, 7130, 7133$  эВ) взяты с электронного ресурса <http://skuld.bmsc.washington.edu/> и представлены в табл. 1.

Таблица 1. Поправочные коэффициенты рассеяния для различных энергий рентгеновского излучения вблизи К-края поглощения железа

$E, \text{эВ}$	$f'$	$f''$
7100	-5.357	0.473
7110	-5.889	0.471
7118	-6.664	0.470
7125	-8.160	0.469
7128	-7.802	3.254
7130	-7.493	3.949
7133	-6.830	3.944

Полный контраст рассеяния атома в растворе, зависящий от энергии, описывается уравнением [18]:

$$\Delta\rho(r, E) = \Delta\rho_0(r) + v(r)(f'(E) + if''(E)), \quad (2)$$

где  $\Delta\rho_0(r)$  — энергонезависимое распределение плотности длины рассеяния,  $v(r)$  — резонансное распределение плотности длины рассеяния, которое описывает пространственное распределение аномальных атомов внутри частицы.

Используя преобразование Фурье контраста рассеяния и учитывая, что интенсивность пропорциональна квадрату амплитуды рассеяния, можно получить

основное уравнение для интенсивности рассеяния вблизи К-края поглощения [22, 27]:

$$I(s, E) = F_0^2(s) + 2f'(E)F_0(q)v(s) + (f'^2(E) + f''^2(E))v^2(s). \quad (3)$$

Здесь  $F_0^2(s)$  — интенсивность нерезонансного рассеяния вдали от полосы поглощения и  $F_0(s)v(s)$  представляет собой перекрестный член как произведение нерезонансной и резонансной амплитуд рассеяния.

Для определения среднего числа атомов железа  $N$ , накопленных в белке Dps, был применен метод, основанный на пренебрежении поправкой к значениям энергий ниже К-края поглощения. Это позволяет переписать уравнение (3) для реализации метода квадратичной аппроксимации с фиксированным вектором рассеяния для каждой из энергий, где интенсивность зависит от поправки  $f'$  и энергии рентгеновского пучка:

$$I(s, f(E)) = a(s)f'(E)^2 + 2b(s)f'(E) + c(s), \quad (4)$$

где коэффициенты  $a = v_0^2(s)$ ,  $b = F_0(q)v(s)$ ,  $c = F_0^2(s)$  описывают соответствующие части разложения интенсивности рассеяния [17].

В работе данные АМУРР были разделены на соответствующие парциальные интенсивности с помощью написанных в MATLAB скриптов при решении уравнения (4). Перебирая все измеренные  $E$  и  $s$ , получили систему линейных уравнений, где неизвестными выступают  $a(s)$ ,  $b(s)$ ,  $c(s)$ . Эта система решается при помощи функции MATLAB «linsolve», выдавая значения  $a$ ,  $b$ ,  $c$  при разных  $s$ . Имея эти данные, можно посчитать отдельно  $a(s)f'(E)^2$ ,  $2b(s)f'(E)$ ,  $c(s)$  для любой энергии.

Количество резонансных атомов можно рассчитать по формуле:

$$N = \frac{b(0)}{2\sqrt{c(0)}}. \quad (5)$$

Здесь  $b(0)$  и  $c(0)$  определяются путем экстраполяции полных кривых  $b(s)$ ,  $c(s)$  на  $s = 0$  с использованием приближения Гинье [13].

Функция распределения по расстояниям  $p(r)$  была вычислена с использованием программы косвенного преобразования GNOM [28] для решения интегрального уравнения:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty sI(s) \sin(sr) ds. \quad (6)$$

Физически функция распределения по расстояниям описывает количество всевозможных расстояний между двумя точками в частице в интервале от  $r$  до  $r + dr$ . По функции  $p(r)$  определяется максимальный размер белка  $D_{max}$  из условия  $p(r) = 0$  при  $r > D_{max}$ .

Параметр  $D_{max}$  необходим для *ab initio* моделирования структуры белка с железом, которое реализовано в программе DAMMIN [29]. Данный алгоритм поиска формы низкого разрешения основан

на моделировании отжига в ограниченном объеме (сфере диаметром  $D_{max}$ ) [29, 30]. Сфера с радиусом  $D_{max}$  (максимальный размер частицы) заполняется  $N$  плотно упакованными виртуальными шариками с радиусом  $r$ . К каждому шару относят либо индекс 0 (растворитель), либо 1 (частица). При фиксированных пространственных положениях форма модели атома полностью описывается вектором  $\mathbf{X}$  с  $n$  компонентами, определяющим фазу атома. Таким образом, задача восстановления формы по данным рассеяния преобразуется в задачу нахождения конфигурации  $\mathbf{X}$ , в которой минимизируется целевая функция  $f(\mathbf{X}) = \chi^2 + \alpha P(\mathbf{X})$ , где  $\chi^2$  — невязка,  $P(\mathbf{X})$  — штраф за некомпактность модели:

$$\chi^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n \left( \frac{I(s_j) - I_{exp}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right)^2, \quad (7)$$

где  $n$  — число экспериментальных точек,  $I_{exp}(s_j)$  и  $\sigma(s_j)$  — экспериментальные интенсивности и их ошибки,  $I(s_j)$  — теоретическая интенсивность от вычисленной модели.

Степень полидисперсности образцов Dps-Fe500 и Dps-Fe2000 оценивалась с помощью метода определения функции распределения частиц по размерам, реализованного в программе MIXTURE [31]. Программа MIXTURE аппроксимирует экспериментальную кривую рассеяния, моделируя многокомпонентную систему, представленную простыми геометрическими телами (в нашем случае сферой), с учетом межчастичных взаимодействий, с целью минимизации невязки  $\chi^2$  между экспериментальными и модельными данными.

Интенсивность рассеяния в этом случае может быть записана как

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s), \quad (8)$$

где  $v_k$  и  $I_k(s)$  — объемная доля и интенсивность рассеяния  $k$ -ой компоненты соответственно. Результаты оценки полидисперсности представлены в дополнительных материалах (рис. 5., табл. 3).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс минералообразования может протекать посредством нескольких химических реакций. Первичная каталитическая реакция, опосредованная миниферритинами, каким является Dps, протекает в ферроксидазных центрах. При использовании перекиси водорода или молекулярного кислорода в качестве акцепторов электронов ионы  $\text{Fe}^{2+}$ , достигающие ферроксидазных центров, окисляются до  $\text{Fe}^{3+}$  перед перемещением к месту зародышеобразования, чтобы начать процесс минерализации. В наших экспериментах косубстратом был кислород и, соответственно, реакция ферроокисления выглядит так [32]:



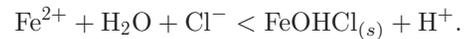
где  $[\text{Fe}_2 - \text{Dps}]^{Z+2}$  представляет собой биядерный центр железа, а  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2 - \text{Dps}$  — окисленные частицы железа.

После окисления частицы железа покидают ферроксидазные центры по направлению к богатой карбоксилатами внутренней полости белка, где формируется минеральное ядро ферригидрита. Последующая цепочка реакций ферригидрита и минерализации приводит к формированию минерального ядра ферригидрита, вырастающего из начальных центров зародышеобразования [33]. Химический состав минерального ядра не зависит от косубстрата, используемого в реакции окисления железа; в нашем исследовании химическое уравнение реакции минерализации с молекулярным кислородом [32, 34, 35]:



где FeOOH представляет собой оксид-гидроксид железа (III), который составляет минерал ферригидрит.

Можно также предположить, что в белковом растворе мог быть недостаток молекулярного кислорода, и в этом случае некоторая часть ядра образовалась по реакции



В данной работе проведены измерения растворов белка Dps, нагруженного железом. Исследуемые растворы были приготовлены при тех же условиях, что и для крио-ПЭМ анализа [12]. Данные крио-ПЭМ (рис. 1 [12]) четко показывают монодисперсность смеси и наличие отдельных додекамеров белка Dps в приготовленных растворах.

На рис. 1 показан набор кривых рассеяния для железосодержащего белка Dps. Образцы были измерены при трех концентрациях атомов железа (50, 500 и 2000 атомов на додекамер белка) и семи энергиях пучка (7100, 7110, 7118, 7125, 7128, 7130, 7133 эВ) вблизи К-края поглощения железа  $E = 7125$  эВ.

Кривые рассеяния на рис. 1,а совпадают друг с другом и соответствуют рассеянию от «чистого» Dps (рис. 1,з, Dps (1, черная) и Dps-Fe50 (2, синяя) кривые). Это указывает на то, что изменения, происходящие с белком при концентрации железа 50 атомов незначительны. Кривые рассеяния, полученные от раствора белка Dps с концентрацией 500 и 2000 атомов железа на молекулу Dps (рис. 1,б,в), демонстрируют характерный загиб и значительное увеличение интенсивности рассеяния в области малых углов ( $s < 0.5 \text{ nm}^{-1}$ ), что указывает на частичную агрегацию белка и полидисперсность раствора. Железо является переходным металлом с 6 связями и может образовывать стабильные комплексы с азотом различных аминокислотных остатков белка, что приводит к агрегации соседних белковых молекул [11]. Однако расположение и профиль максимумов кривых совпадают с рассеянием от отдельного додекамера Dps, что указывает на то, что, хотя часть частиц Dps агрегирует в присутствии катионов железа, одиночные додекамеры Dps также существуют в растворе.

Для дальнейшего анализа данных АМУРР необходимо выделить резонансную и нерезонансную части кривых рассеяния. Для определения К-края поглощения железа были проведены дополнительные

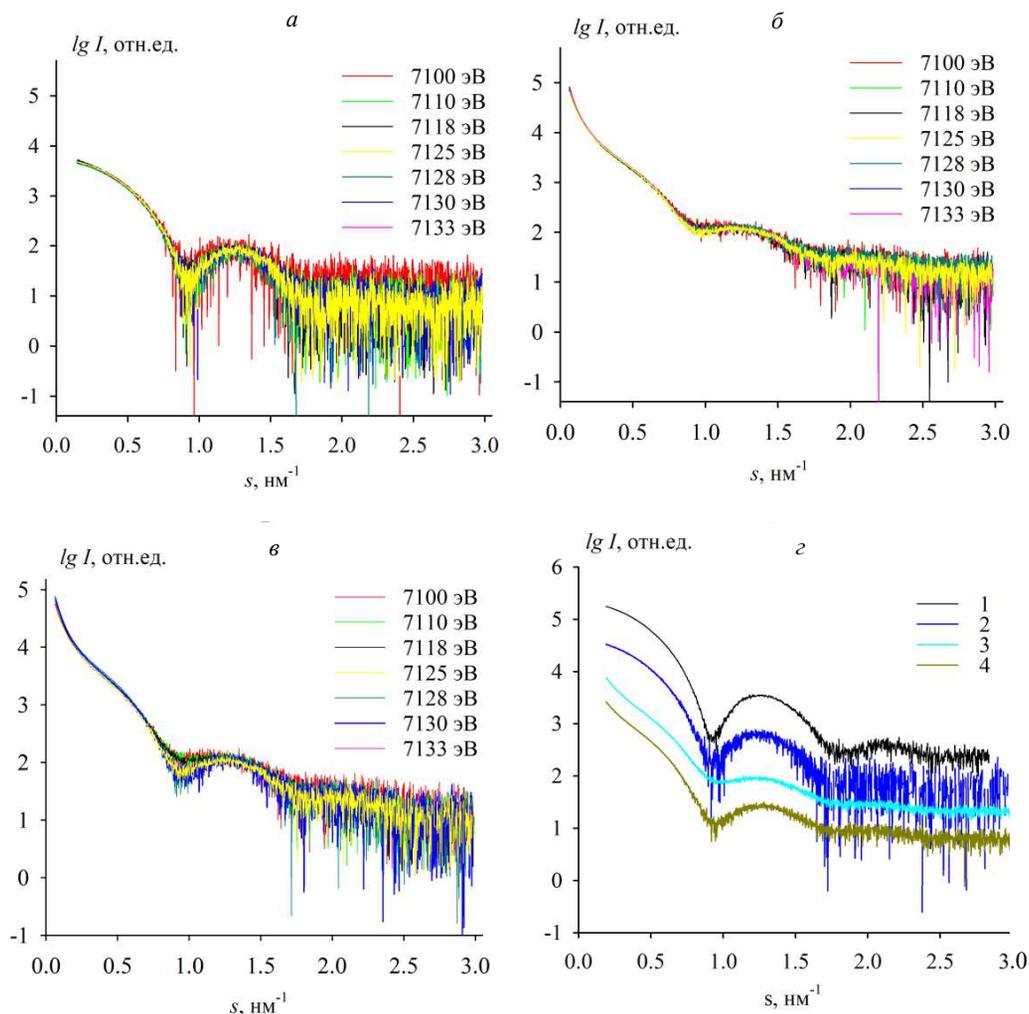


Рис. 1. Экспериментальные кривые АМУРР для белка Dps, нагруженного железом. Измерения проводились при различных энергиях: 7100 (красные линии), 7110 (зеленые линии), 7118 (черные линии), 7125 (желтые линии), 7128 (голубые линии), 7130 (синие линии), 7133 (розовые линии) эВ: *а* – Dps-Fe50; *б* – Dps-Fe500; *в* – Dps-Fe2000. Данные нормализованы к абсолютным интенсивностям рассеяния и преобразованы в соответствующее *s*-пространство. *г* – Сравнение кривых рассеяния для различных образцов при одной энергии (7125 эВ) с кривой «чистого» Dps: 1 – «чистый» Dps, 2 – Dps-Fe50, 3 – Dps-Fe500, 4 – Dps-Fe2000. Кривые разнесены по вертикали для лучшей визуализации (в цвете см. на сайте)

измерения водного раствора железа в диапазоне энергий 7082–7162 эВ. Аналогично работе [36] были определены нормализованные константы разности интенсивностей измеренных кривых, после чего построен график зависимости нормализованной константы вычитания от энергии падающего излучения (рис. 2, *а*), по которому был определен К-край поглощения железа на энергии 7125 эВ. Поскольку в нашем случае наблюдается сдвиг К-края поглощения железа в значение 7125 эВ (рис. 2, *б*), аномальные поправки относительно теоретических данных были линейно сдвинуты (табл. 1).

Для разложения кривых рассеяния при энергии 7125 эВ в среде MATLAB реализован подход, основанный на решении системы уравнений (4) для каждой из энергий при фиксированном векторе рассеяния [36].

Полученные парциальные кривые рассеяния показаны на рис. 3. Нерезонансные кривые имеют максимумы, подобные рассеянию от отдельных макромолекул. Резонансные кривые показывают поли-

дисперсность в распределении наночастиц железа во внутренней полости Dps.

Исходя из полученного разложения, можно заметить, что резонансные кривые  $v_0^2(s)$  отличаются от нерезонансного члена  $F_0^2(s)$  на несколько порядков.

Их отношение  $\frac{v_0^2(s)}{F_0^2(s)} = 0.01$ , это означает, что

влияние резонанса на общую картину рассеяния, при переходе от энергии намного выше К-края поглощения к энергии около края, составит лишь 1%. Таким образом, аналогично работе [37] в дальнейшем анализе мы будем использовать перекрестный член разложения (кривая 2, рис. 3) при исследовании распределения резонансных атомов железа во внутренней полости белка Dps.

Для *ab initio* определения усредненных форм низкого разрешения белка с кластерами железа внутри с помощью программы DAMMIN [29] были рассчитаны функции парных расстояний  $p(r)$ , представленные на рис. 4, *г*.

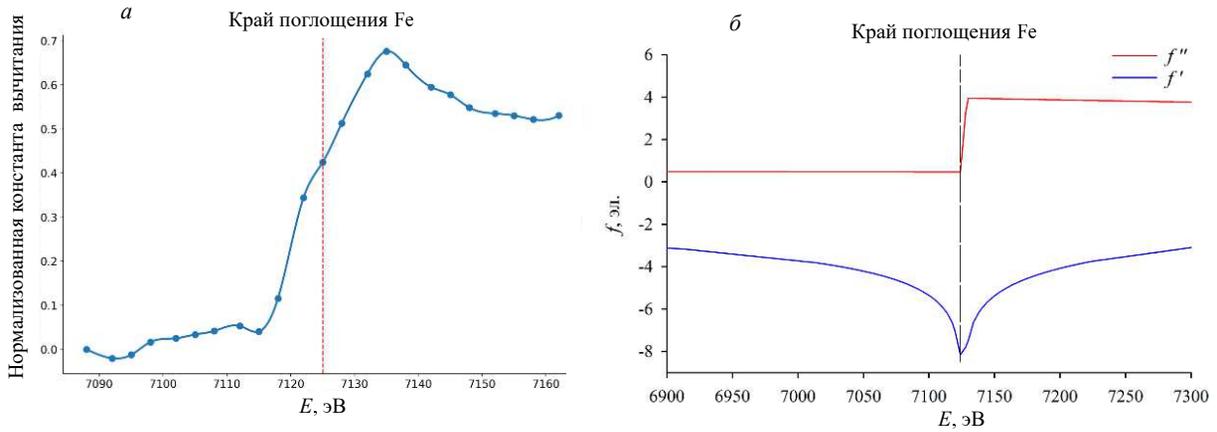


Рис. 2. *а* — Нормализованная константа вычитания в зависимости от энергии падающего рентгеновского излучения. На графике отображены промежуточные значения энергии. Пунктирная линия показывает положение К-края Fe. *б* — Интерполяция энергетической зависимости аномальных поправок ( $f'$  и  $f''$ , соответственно) коэффициента рассеяния рентгеновского излучения вблизи границы поглощения железа ( $E = 7125$  эВ). Расчетные значения аномальных поправок для железа были взяты из <http://skuld.bmsc.washington.edu/>

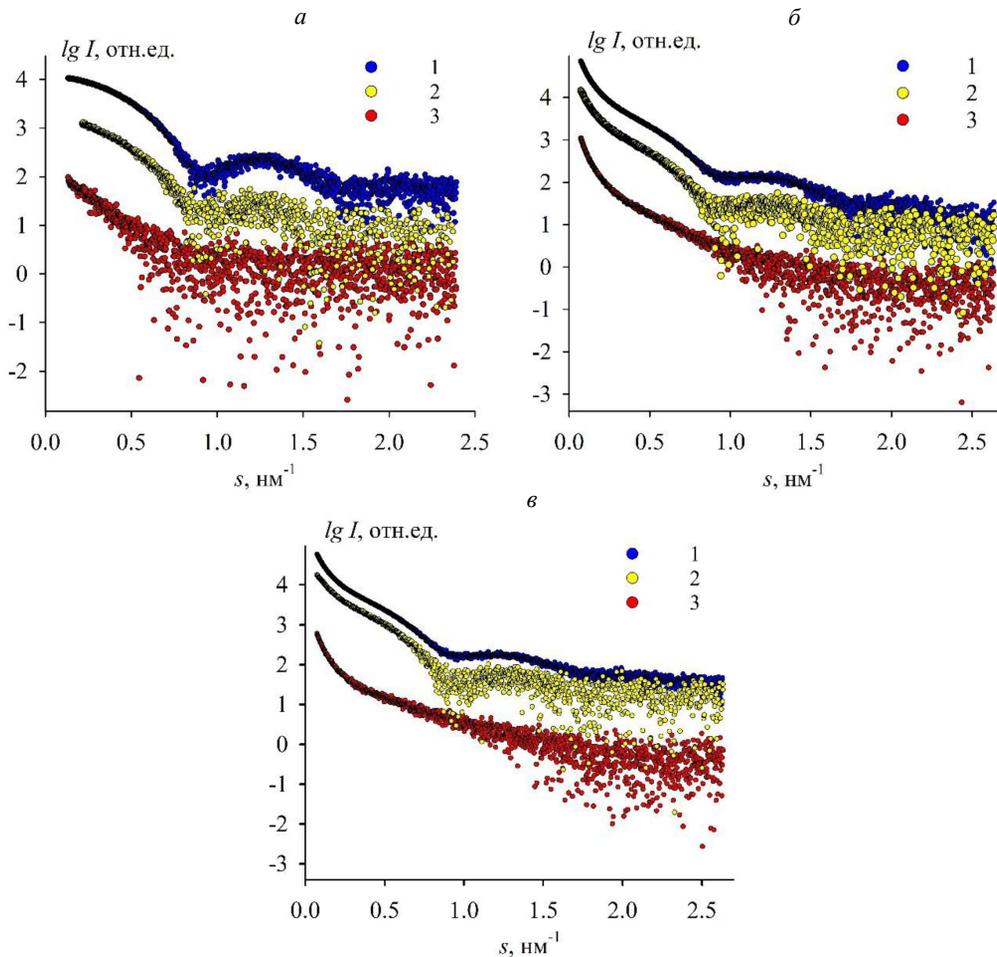


Рис. 3. Результат разложения кривых рассеяния: 1 — нерезонансная  $F_0^2(s)$ , 2 — перекрестная  $F_0(q)v(s)$ , 3 — резонансная  $v_0^2(s)$  части кривых рассеяния от растворов белка, содержащего железо: *а* — Dps-Fe50; *б* — Dps-Fe500; *в* — Dps-Fe2000

Чтобы избежать ошибочной интерпретации, функции парных расстояний  $p(r)$  (рис. 4, *з*) были рассчитаны по укороченным кривым малоуглового рассеяния в интервале угловых векторов  $0.3 < s < 1.6$   $\text{nm}^{-1}$ . Выбор такого интервала был обусловлен необходимостью отсечь возможные агрегаты белка и тем, что использование полных

кривых рассеяния может привести к появлению в восстановленных формах ложных мелких деталей. Сравнение  $p(r)$  для трех концентраций железа показывает незначительную разницу, а следовательно, можно сказать, что наличие агрегатов не влияет на восстановление структуры. Восстановленные формы с использованием симметрии P23 представлены на

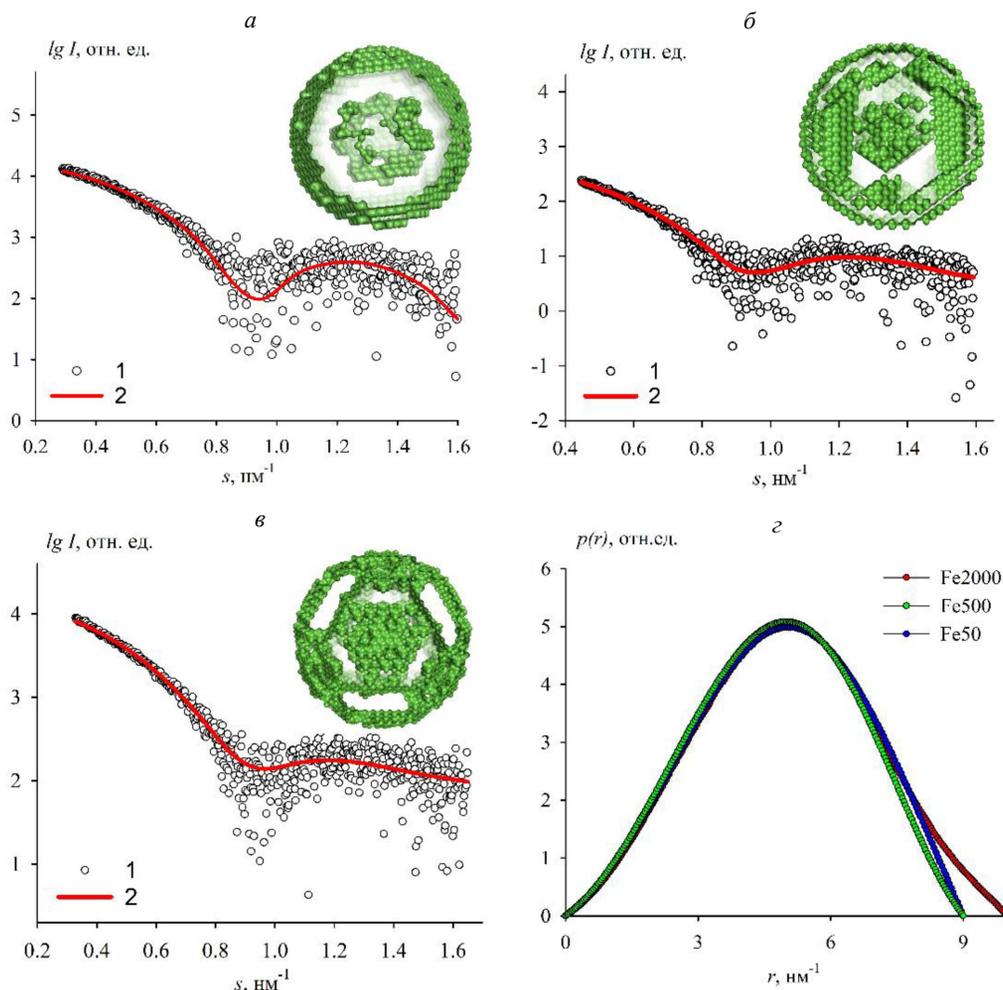


Рис. 4. Восстановление формы низкого разрешения для белка Dps, нагруженного железом: *a* — Dps-Fe50; *б* — Dps-Fe500; *в* — Dps-Fe2000: 1 — Перекрестный член разложения  $F_0(q)v(s)$  экспериментальной кривой рассеяния; 2 — теоретическая кривая рассеяния, рассчитанная от шариковой модели, полученной с помощью программы DAMMIN. Вставка: Модель белка с железом, где шарики — фиктивные атомы, которые были рассчитаны согласно алгоритму, описанному в программе DAMMIN (сечение). *г* — функция распределения по расстояниям  $p(r)$  для образца Fe50 (синие точки), Fe500 (зеленые точки), Fe2000 (красные точки)

вставке рис. 4, *a–в*. О хорошем качестве и надежности восстановления свидетельствуют значения  $\chi^2 = 1.7, 1.5, 1.8$  для образцов Fe50, Fe500 и Fe2000 соответственно.

Из рис. 4 видно, что полученные модели имеют в своей внутренней полости кластеры железа разного размера. При этом с повышением концентрации ионов железа в белке кластер неравномерно увеличивается. Таким образом, при малом содержании ионов железа формируются преимущественно небольшие наночастицы с размерами, не превышающими несколько нанометров. При увеличении содержания железа до 500 атомов на молекулу белка появляются наночастицы уже более крупного размера, однако заполненности всего ядра не наблюдается. Для концентрации железа 2000 атомов на додекамер видно уже почти полностью заполненное ядро белка, исчезают частицы малого размера и образуются кластеры железа размером, сопоставимым с размером внутренней полости белка. Полученные модели были депонированы в базу данных SASBDB с кодами SASDPX7, SASDPY7, SASDPZ7. Аналогичные результаты были получены нашей группой

с помощью крио-ПЭМ [12], где показано, что размер и морфология кластеров железа практически не зависят от концентрации ионов железа в растворе, а большинство кластеров состоит из дискретных наночастиц размером 1–1.5 нм, однако увеличение концентрации железа до максимального значения (2000) привело к существенному увеличению доли классов с большим размером железосодержащего кластера (объем до 30 нм<sup>3</sup>).

В дополнение к полученным результатам были определены интенсивности в нулевой угол полных перекрестных и нерезонансных кривых с помощью программы GNOM [28]. Используя уравнения (3–5) были рассчитаны значения количества ионов железа во внутренней полости белка Dps для всех образцов (табл. 2). Расчетное количество атомов железа определялось исходя из концентрации железа, добавленного в раствор.

Полученные значения меньше теоретически рассчитанных, что может быть связано с присутствием в буфере ЭДТА, способной образовывать с катионами металлов соли этилендиаминтетраацетаты. Присутствие в буфере ЭДТА связано с необходимо-

Таблица 2. Количество атомов железа в додекамере Dps при различных концентрациях в растворе

Концентрация железа, мг/мл	$N_{рас}$	$b_0$	$c_0$	$N_{эксп}$
4.96	50	6618 ± 226	11009 ± 28	32 ± 1
12.39	500	157638 ± 4966	128830 ± 2313	219 ± 8
49.57	2000	265405 ± 8019	102846 ± 1924	413 ± 14

стью воссоздать условия, при которых происходит образование комплекса Dps–ДНК [11].

В результате, исходя из экспериментально рассчитанных значений количества ионов железа (табл. 2), и на основе анализа структуры низкого разрешения (рис. 4, а–в, вставка) можно дать более полную модель формирования нанокластеров железа при заполнении ферритино-подобных белков различной природы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный анализ АМУРР на К–крае поглощения железа однозначно показывает, что атомы железа образуют компактную структуру во внутренней полости белка Dps, однако заполнение происходит неравномерно. С помощью математических методов исходные кривые были разделены на резонансные, нерезонансные и перекрестные части, которые в дальнейшем использовались для анализа системы. По резонансным кривым было рассчитано среднее количество резонансных атомов железа, приходящихся на одну молекулу белка. Установлено, что в среднем белок Dps содержит меньше атомов железа, чем следует из теоретически рассчитанной концентрации, что также следует из полученных структур низкого разрешения. Полученные результаты демонстрируют современные возможности метода АМУРР и компьютерного моделирования на основе экспериментальных данных в исследованиях структуры сложных белковых объектов и могут быть использованы для дальнейших работ в области биосинтеза частиц и практического применения в нанобиотехнологиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-74-10071.

Авторы выражают благодарность А. Грузинову за проведение экспериментов по аномальному малоугловому рентгеновскому рассеянию и И. Орлову за ценные советы и полезную дискуссию.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanchez M., Sabio L., Galvez N., Capdevila M. et al. // *IUBMB Life*. 2017. **69**. P. 382.
2. Kenkhuis B., van Eekeren M., Parfitt D.A., Ariyurek Y. et al. // *Stem Cell Reports*. 2022. **17** (6). P. 1351.
3. Tian X., Huang L., Wang M., Biville F. et al. // *Vet. Microbiol.* 2020. **247**:108730.
4. Minato T., Teramoto T., Kakuta Y., Ogo S. et al. // *FEBS Open Bio*. 2020. **10** (7). P. 1219.
5. Dubrovin E.V., Dadinova L.A., Petoukhov M.V., Soshinskaya E.Y. et al. // *J. Mol. Biol.* 2021. **433**, (10). 166930.

6. Almiry M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. // *10.1101/gad.6.12b.2646Genes Dev*. 1992. **6** (12B). P. 2646.
7. Fenton H.J.H. // *J. of the Chemical Society*. 1894. **65**. P. 899.
8. Wolf S.G., Frenkiel D, Arad T, Finkel S.E. et al. // *Nature*. 1999. **1:400** (6739):83-5.
9. Bhaskar S., Lim S. // *NPG Asia Mater*. 2017. **9**, (4). e371.
10. Антипов С. С. // Дисс. ... д. биол. наук: Вор. гос. университет, Воронеж. 2018.
11. Dadinova L., Kamysinsky R., Chesnokov Y., Mozhaev A. et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. **3**, 22 (11). 6056.
12. Chesnokov Y., Mozhaev A., Kamysinsky R., Gordienko A. et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. **23** (10), 5313.
13. Ballauff M., Jusufi A. // *Colloid Polym. Sci*. 2006. №284, Vol. 54, P. 1303.
14. Stuhrmann H.Q. // *Adv. Polym. Sci*. 1985. **67**. P. 123.
15. Stuhrmann H.Q. // *Rev. Biophys*. 1981. **14**. P. 433.
16. Sztucki M., Di Cola E., Narayanan T. // *J. Appl. Cryst*. 2010. **43**. P. 1479.
17. Pabit S., Meisburger S., Li L., Blose J. et al. // *J. Am. Chem. Soc*. 2010. **132**. P. 163346.
18. Wieland D.C.F., Schroer M.A., Gruzinov A.Yu., Blanchet C.E. et al. // *J. Appl. Crystallogr*. 2021. **54**. P. 830.
19. Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamysinsky R.A., Orlov, I.A. et al. // *FEBS Lett*. 2019. **593**. P. 1360.
20. Kamysinsky R., Chesnokov Y., Dadinova L., Mozhaev A. et al. // *Biomolecules*. 2020. №10 (1). P. 39.
21. Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F. Graewert M.A. et al. // *J. Appl. Cryst*. 2015. **48**. P. 431.
22. Stuhrmann H.B. // *Acta Crystallogr*. 1980. **36**. P. 9961.
23. Stuhrmann H.B., Notbohm H. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1981. **78**. P. 6216.
24. Stuhrmann H.B., Goerigk G, Munk B. // Elsevier, Amsterdam. 1994. P. 555.
25. Manalastas-Cantos K., Konarev P.V., Hajizadeh N.R., Kikhney A.G. et al. // *J. Appl. Crystallogr*. 2021. №1:54(Pt1).
26. Gruzinov A.Y., Schroer M.A., Manalastas-Cantos K, Kikhney A.G. et al. // *J. Synchrotron. Radiat*. 2021. **28**. P. 812.
27. Stuhrmann H. B. // *Q. Rev. Biophys*. 1981. b. №14. P. 433.
28. Svergun D.I. // *J. Appl*. 1992. **25**. P. 495.
29. Svergun D.I. // *Biophys. J*. 1999. **76**. P. 2879.
30. Kirkpatrick S., Gelatt Jr. C.D., Vecchin M.P. // *Science*. 1983. **220**. P. 671.
31. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J. et al. // *J. Appl. Cryst*. 2003. **36**. P. 1277.
32. Yang X., Chiancone E., Stefanini S., Ilari A. et al. // *Biochem. J*. 2000. **349**. P. 783.
33. Ilari A., Ceci P., Ferrari D., Rossi G.L. et al. // *J. Biol. Chem*. 2002. **277**. P. 37619.
34. Zhao G., Ceci P., Ilari A., Giangiacomo L. et al. // *J. Biol. Chem*. 2002. **277**. P. 27689.

35. Sub M., Cavallo S., Stefanini S., Chiancone E. et al. // *Biochemistry*. 2005. **44**. P. 5572.
36. Gruzinov A.Y., Schroer M.A., Manalastas-Cantos K, Kikhney A.G. et al. // *J. Synchrotron. Radiat.* 2021. №1:28(Pt3). P. 812.
37. Krishnamoorthy K, Hoffmann K, Kewalramani S, Brodin J. et al. // *ACS Cent Sci.* 2018. № 28:4 (3). P. 378.

### An Anomalous Small-Angle X-Ray Scattering Study of the Formation of Iron Clusters in the Inner Cavity of the Ferritin-Like Protein Dps

Gordienko A.M.<sup>1,2,a</sup>, Mozhaev A.A.<sup>2,3,4,b</sup>, Gibizova V.V.<sup>1,c</sup>, Dadinova L.A.<sup>2,d</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

<sup>2</sup>*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre «Crystallography and Photonics», Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333, Russia*

<sup>3</sup>*Shemyakin–Ochinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997, Russia*

<sup>4</sup>*Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia*

E-mail: <sup>a</sup>[alex.gor99@mail.ru](mailto:alex.gor99@mail.ru), <sup>b</sup>[a.a.mozhaev@gmail.com](mailto:a.a.mozhaev@gmail.com), <sup>c</sup>[gibizova@physics.msu.ru](mailto:gibizova@physics.msu.ru), <sup>d</sup>[lubovmsu@mail.ru](mailto:lubovmsu@mail.ru)

The Dps protein (a DNA-binding protein from starving cells) is well known for its ability to protect cells from various negative factors, including oxidative stress. Dps is capable of rapidly oxidizing ferrous ions with hydrogen peroxide and then accumulating ferric ions in its cavity in the form of a ferric mineral. Dps is also able to bind to DNA, forming highly ordered structures and becoming the most abundant stationary-phase nucleoid protein, adding physical protection to chemical protection. In this work, anomalous small-angle X-ray scattering (ASAXS) was used for the first time to study the formation of iron clusters in the cavity of the Dps protein from *Escherichia coli*. Based on the created software, using a known algorithm, the ASAXS curves were decomposed into resonant, nonresonant, and cross term components, which were subsequently used to calculate the average number of ions per protein molecule and determine the ab initio structure of the protein–iron complex. Using computer simulation methods, detailed information was obtained on the distribution of iron atoms inside the protein cavity at various concentrations of iron in the solution. It has been shown that an increase in the concentration of Fe<sup>2+</sup> in the solution has little effect on the morphology of the resulting iron mineral; however, it leads to an increase in its volume, which is in a good agreement with the experimentally determined number of iron ions per Dps molecule. The values we obtained proved to be lower than the calculated values, which may be due to the presence of a chelating agent in the solution.

*Keywords:* Dps protein; mini-ferritin; anomalous small-angle X-ray scattering.

PACS: 87.80.-y.

*Received* 16 July 2022.

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2022. **77**, No. 6. Pp. 858–867.

#### Сведения об авторах

1. Гордиенко Александр Максимович — студент, инженер; e-mail: [alex.gor99@mail.ru](mailto:alex.gor99@mail.ru).
2. Можяев Андрей Александрович — науч. сотрудник; e-mail: [a.a.mozhaev@gmail.com](mailto:a.a.mozhaev@gmail.com).
3. Гибизова Виктория Валерьевна — ассистент; e-mail: [gibizova@physics.msu.ru](mailto:gibizova@physics.msu.ru).
4. Дадинова Любовь Александровна — ст. науч. сотрудник; e-mail: [lubovmsu@mail.ru](mailto:lubovmsu@mail.ru).