

**СИНХРОТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В МЯГКОМ РЕНТГЕНОВСКОМ ДИАПАЗОНЕ
ЗАРЯДОВОГО СОСТОЯНИЯ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА
В ФЕРРИГИДРИТНОМ ЯДРЕ ФЕРРИТИНА Dps *Escherichia coli***

© 2016 г. С.Ю. Турищев*, С.С. Антипов* ** ***, Н.В. Новолокина*,
О.А. Чувенкова*, В.В. Мелехов****, Р. Овсянников*****, Б.В. Сеньковский*****,
А.А. Тимченко*****, О.Н. Озолинь** *****, Э.П. Домашевская*

*Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1;

**Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

***Химико-биологический институт Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта,
236041, Калининград, ул. Университетская, 2;

****Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
142290, Пущино, ул. Институтская, 7;

*****Helmholtz-Zentrum Berlin, 12489, Germany, Berlin, Albert-Einstein-Str. 15;

*****Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4;

*****Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино, просп. Науки, 3
E-mail: tsu@phys.vsu.ru

Поступила в редакцию 05.07.16 г.

Белок Dps *Escherichia coli* относится к особому семейству бактериальных ферритинов и представляет собой наноразмерную частицу, состоящую из неорганического ядра диаметром до 5 нм и белковой оболочки размером ~ 8–9 нм. Белковая часть состоит из 12 одинаковых субъединиц с известной кристаллической структурой додекамера. Состав и структура ядра исследованы гораздо хуже. Оно формируется из продуктов окисления ионов Fe^{2+} в ферро-оксидазных центрах белка. Поэтому основными компонентами ядра должны быть оксиды Fe_2O_3 . Однако возможность минерализации ионов Fe^{2+} в анаэробных условиях *in vitro* допускает более сложный состав ядра у природного Dps. В работе предложен метод подготовки очищенного препарата Dps для сверхвысоковакуумных синхротронных экспериментов методом спектроскопии ближней тонкой структуры края поглощения железа в мягкой области рентгеновского спектра. Проведенные синхротронные эксперименты выявили в составе подготовленного биологического образца присутствие ионов и трехвалентного и двухвалентного железа, причем в октаэдрическом и тетраэдрическом окружении атомами кислорода. Это свидетельствует о композитном ионном составе ядра даже у природного Dps, выделенного из бактерий, выращенных аэробно.

Ключевые слова: ферритин Dps, Fe^{2+} , Fe^{3+} , неорганическое ядро, синхротронное излучение, XANES.

Наноразмерные объекты на основе гибридных биоорганических молекул представляют большой научный и практический интерес [1,2]. С одной стороны, они имеют фиксированный внутренний объем, что позволяет эффективно контролировать размерный фактор неорганического ядра частицы, с другой стороны, наличие органической оболочки препятствует двухстороннему обмену кислородом, в результате чего сохраняются свойства исходного материала. Знания об атомном и электронном строении, фазовом составе и особенностях взаи-

модействия гибридных наночастиц с окружающей средой необходимы для понимания механизмов их функционирования как биологических молекул и для успешного использования в качестве основы для наноматериалов. Такими молекулами, в частности, являются ферритины, которые уже нашли применение в различных областях современной науки, техники и технологий, например наноэлектронике [3]. Они активно исследуются при помощи широкого набора аналитических методов [4–8], в том числе рентгеноспектральных XANES (X-ray absorpti-

on near edge structure – ближняя тонкая структура края рентгеновского поглощения) и EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure – дальняя тонкая структура рентгеновского поглощения). Эти исследования проводятся преимущественно в области энергий жесткого рентгеновского излучения [4–6], традиционно позволяя получать информацию об электронном строении, структуре и составе объема всей изучаемой пробы, как правило, путем расчета дальней структуры EXAFS К-краев поглощения железа (энергии квантов возбуждающего излучения свыше 7100 эВ). В то же время большой научный и практический интерес при исследовании ферритинов могут представлять синхротронные XANES-спектры железа в области мягкого рентгеновского излучения. Однако высокая чувствительность к свойствам поверхности (энергии квантов возбуждающего синхротронного излучения до 1000 эВ) и ярко выраженная тонкая структура регистрируемых спектров, как, например в случае $L_{2,3}$ -краев поглощения Fe [9–12], предъявляют специфические требования к пробоподготовке образцов для сверхвысоковакуумных измерений. Глубина информативного слоя в таких экспериментах составляет порядка ~ 10 нм [13]. Это сопоставимо с молекулярными размерами ферритинов и, следовательно, может предоставить ценную информацию об их инфраструктуре.

Целями настоящей работы были: оценка применимости предлагаемого метода пробоподготовки и XANES спектроскопии в области Fe $L_{2,3}$ -краев поглощения для изучения специфики локального атомного окружения в неорганических ядрах осажденного для сверхвысоковакуумного эксперимента белка Dps (DNA-binding Protein from Starved cells – ДНК-связывающего белка голодающих клеток [14]) из *Escherichia coli*. Этот белок является прототипом особого семейства бактериальных ферритинов, способных не только окислять и депонировать железо в своей белковой полости, но и взаимодействовать с ДНК, конденсируя геном в условиях разных стрессов [1]. Эта особенность предполагает возможную зависимость физико-химического состояния ядра от функционального состояния Dps и наоборот. Поэтому особый интерес представляют сведения о наличии и соотношении разнозарядных ионов железа в нем, которые определяются условиями взаимодействия неорганического ядра с органической оболочкой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения рекомбинантного белка Dps в качестве продуцентов были использованы

клетки *Escherichia coli* BL21*(DE3), трансформированные плазмидой pGEM_dps. Биосинтез белка, его выделение и очистку проводили согласно методике, описанной в работе [15]. Для исследований были использованы исходные растворы белка Dps с концентрацией ~2 мг/мл в буфере, содержащем 10 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl (pH 8,0) и 0,1 мМ ЭДТА.

Эксперименты по скоростной седиментации проводили на аналитической центрифуге Optima XL-I (Beckman, США) при температуре 20°C. Скорость вращения ротора составляла 30000 об/мин. Условия сканирования: 35 сканов с интервалом между ними 4 мин и пространственным разрешением 0,003 см. Седиментацию осуществляли в бисекторных ячейках с использованием ротора An60. Для эксперимента исходный раствор белка был разбавлен до 0,7 мг/мл тем же буфером. Седиментационные данные обрабатывали программой SEDFIT [16] в режиме непрерывного распределения коэффициентов седиментации $s(S)$. Экспериментальные коэффициенты седиментации пересчитывались к стандартным водным условиям при 20°C согласно работе [17]. Парциальный удельный объем белка, вычисленный из его аминокислотного состава согласно работе [18], составлял 0,73 см³/г. В программе SEDFIT имеется возможность преобразовывать распределение коэффициентов седиментации $s(S)$ в распределение по молекулярным массам $s(M)$, что и было сделано в данной работе.

Эксперименты по оценке радиуса молекулы Dps методом динамического светорассеяния были проведены с помощью прибора Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания), позволяющего определять диаметр молекул в диапазоне 0,3 нм – 10 мкм с чувствительностью к концентрации белка 0,1 мг/мл. Использовали гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм и максимальной мощностью 4 мВт. Для проведения измерений образец, аналогичный использованному для скоростной седиментации, был помещен в кювету объемом 0,5 мл. Были проведены три независимых измерения распределения зависимости объема частиц, находящихся в растворе, от их размера. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Malvern [19].

Для проведения синхротронных исследований в сверхвысоком вакууме было использовано ~ 100 мкл исходного раствора белка. Его наносили на подложки кристаллического кремния ориентации (100), предварительно очищенные в нейтральном растворе с помощью ультразвука. Образцы были высушены в равновес-

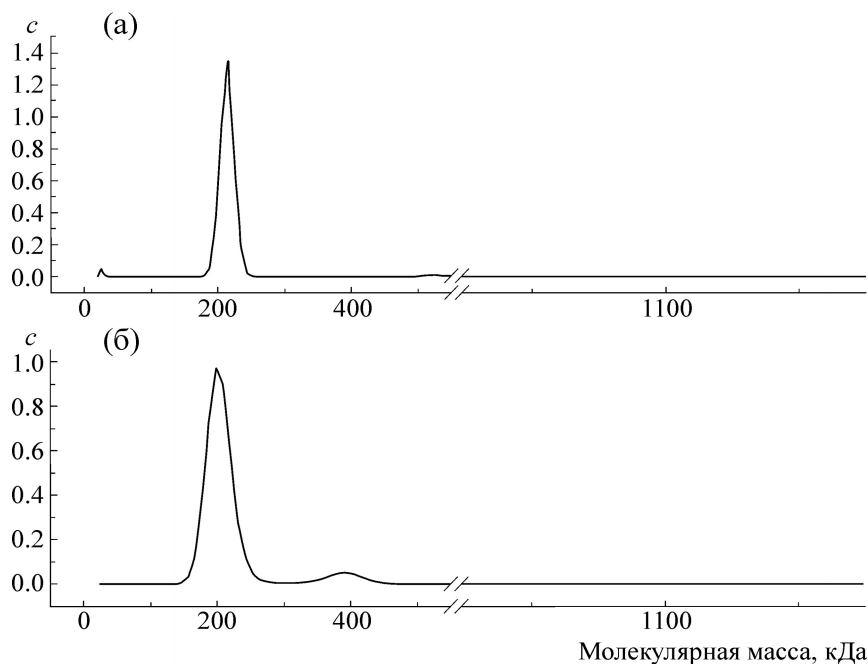


Рис. 1. Седиментационные данные апо-формы белка Dps (а) и нативного белка Dps (б) в координатах $c(M)$.

ных условиях при комнатной температуре в течение трех недель.

Экспериментальные спектры XANES вблизи $L_{2,3}$ -края поглощения железа были получены на российско-германском канале (RGL) синхротрона BESSY II Helmholtz-Zentrum Berlin (Берлин, Германия). Аппаратурное уширение составило 0,1 эВ, вакуум поддерживали на уровне 10^{-7} Па. Использовали методику регистрации полного выхода электронов TEY (total electron yield) (регистрировали компенсационный ток c образца). Глубина информативного слоя составляла ~ 10 нм, что сопоставимо с размером молекулы Dps [20].

В качестве эталонов для последующего сопоставления спектральных кривых и их моделирования были использованы XANES $L_{2,3}$ -спектры железа, полученные от коммерческих образцов оксидов железа Fe_2O_3 и Fe_3O_4 [21]. Последний представлял собой нанопорошок с размерами частичек $\sim 20\text{--}30$ нм. Спектры эталонов регистрировали в тех же условиях, что и образец с нанесенным белком Dps. Кроме этого, при моделировании мы использовали XANES Fe $L_{2,3}$ -спектр для FeO, опубликованный в работе [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окисление и запасание ионов железа в своей белковой полости в виде гидратированных оксидов является одной из основных биологиче-

ских функций белка Dps. Поэтому в бактериальных клетках он находится в ассоциированном с ионами железа состоянии [1,8]. Число этих ионов может варьировать от 24 (фиксированы в ферроксидазных центрах белка) до 400 (формируют минерализованные ядра в полости белка). Это значит, что молекулярная масса очищенного белка может изменяться в широком диапазоне. На рис. 1 приведены результаты восстановления седиментограммы нативного белка Dps и его апо-формы в координатах $c(M)$. Согласно экспериментальным данным, основной пик кривой распределения молекулярных масс апо-Dps располагается при $M \sim 220$ кДа, что хорошо соответствует теоретической величине, рассчитанной из его первичной аминокислотной последовательности ($18,695$ кДа $\times 12 = 224340$ кДа). Для нативного белка было зарегистрировано два максимума. Первый, более выраженный, тоже лежит в области ~ 220 кДа, а второй, имеющий меньшую интенсивность, смещен правее и соответствует ~ 230 кДа. Это свидетельствует об изменении молекулярной массы белка при переводе его в апо-форму, т.е. при очистке его внутренней полости от ионов железа и других компонентов, которые могут в ней присутствовать. Таким образом, в полученном нами образце присутствуют молекулы в разной степени насыщенные ионами железа. Наличие апо-формы может быть обусловлено тем, что биосинтез рекомбинантного белка Dps осуществлялся в

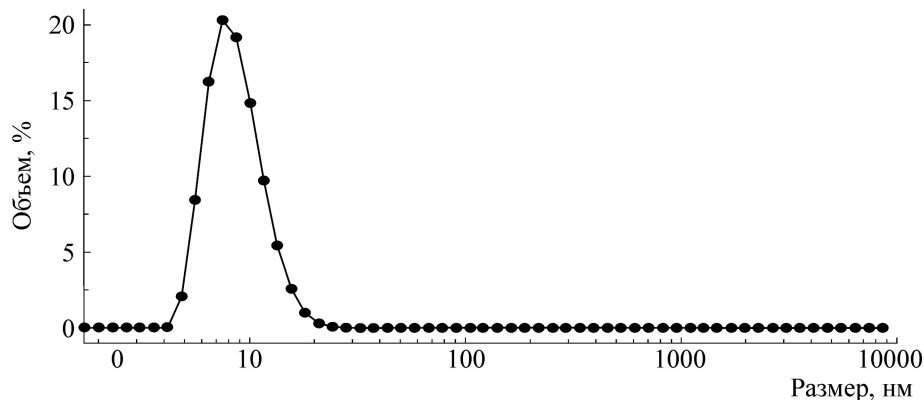


Рис. 2. Распределение размеров частиц, присутствующих в растворе нативного белка Dps при комнатной температуре, полученное методом динамического светорассеяния.

условиях его суперпродукции в клетках *E. coli* без дополнительного притока ионов железа из внешней среды. В целом характер распределения констант седиментации полученного белка отражает сохранение им додекамерной формы в процессе выделения и хроматографической очистки.

Для анализа степени вариаций олигомерных форм, присутствующих в растворе нативного белка, был использован метод динамического светорассеяния. На рис. 2 представлена кривая распределения размеров частиц, свидетельствующая о преимущественном содержании одной (додекамерной) формы белка со средними размерами 8–9 нм, что соответствует результатам аналитического центрифугирования (рис. 1) и данным, полученным методом атомно-силовой микроскопии [20]. Отметим также, что регистрирующая система показывала присутствие незначительного количества слабо выраженных пиков, незаметных на рис. 2 в силу их малого вклада в общее распределение размеров, в области свыше 1000 нм. Скорее всего, это отражает способность Dps к самоагрегации Dps [22].

XANES Fe $L_{2,3}$ -спектры эталонов, отражающие специфику распределения тонкой структуры в зависимости от зарядового состояния ионов железа, приведены на рис. 3. Их энергетическое положение и распределение основных спектральных особенностей находятся в хорошем согласии с известными литературными данными [9]. Основной пик L_3 -края поглощения двухзарядного иона Fe^{2+} в FeO имеет энергию $\sim 708,7$ эВ. Оксиды Fe_2O_3 и Fe_3O_4 (рис. 3) имеют более сложную тонкую структуру краев поглощения, обусловленную $p-d$ - и $d-d$ -кулоновским обменным взаимодействием электронов. Появление двух максимумов (низкоэнергетический t_{2g} и высокоэнергетический e_g) тонкой струк-

туры краев L_3 и L_2 с энергией расщепления $\sim 1,5$ эВ обусловлено действием кристаллического поля. Согласно модели ионной связи XANES $L_{2,3}$ -спектры железа соответствуют: в FeO с Fe^{2+} двухзарядным ионом переходам $3d^6 \rightarrow 2p^5 3d^7$ с конфигурацией $(t_{2g}\uparrow)^3(e_g\uparrow)^2(t_{2g}\downarrow)^1$; и в Fe_2O_3 с Fe^{3+} трехзарядным ионом переходам $3d^5 \rightarrow 2p^5 3d^6$ с конфигурацией $(t_{2g}\uparrow)^3(e_g\uparrow)^2$. Таким образом, появление дублетной структуры L_3 -края в оксидах железа с Fe^{3+} отражает свободные состояния $2t_{2g}$ (пик $\sim 708,6$ эВ) и $3e_g$ (пик ~ 710 эВ), разделенные энергией кристаллического поля $\sim 1,5$ эВ. Тонкая структура XANES $L_{2,3}$ -спектров Fe в Fe_3O_4 отражает наличие в этом оксиде ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в двух координациях – тетраэдрической и октаэдрической.

Таким образом, использованный нами способ пробоподготовки позволил зарегистрировать XANES Fe $L_{2,3}$ -спектр белка Dps, (рис. 4). В его тонкой структуре наблюдается два пика $2t_{2g}$ и $3e_g$ края поглощения. Однако в целом тонкая структура L_3 -края железа ферритина Dps отличается от тонкой структуры всех эталонных спектров (рис. 4), в том числе от эталонного нанопорошка Fe_3O_4 . Заметим, что интенсивность $2t_{2g}$ -пика спектра Dps выше, чем у всех эталонных образцов, что свидетельствует о более сложном соотношении разнозарядных ионов в ядре Dps.

Поэтому мы провели математическое моделирование XANES Fe $L_{2,3}$ -спектров бактериального ферритина Dps с помощью эталонных спектров, приведенных на рис. 3 с использованием методики, разработанной нами ранее [10,23–25]. Модельный $L_{2,3}$ -спектр железа представлен на рис. 4 сплошной линией, а в нижней части рисунка приведена разностная кривая между модельным и экспериментальным спектра-

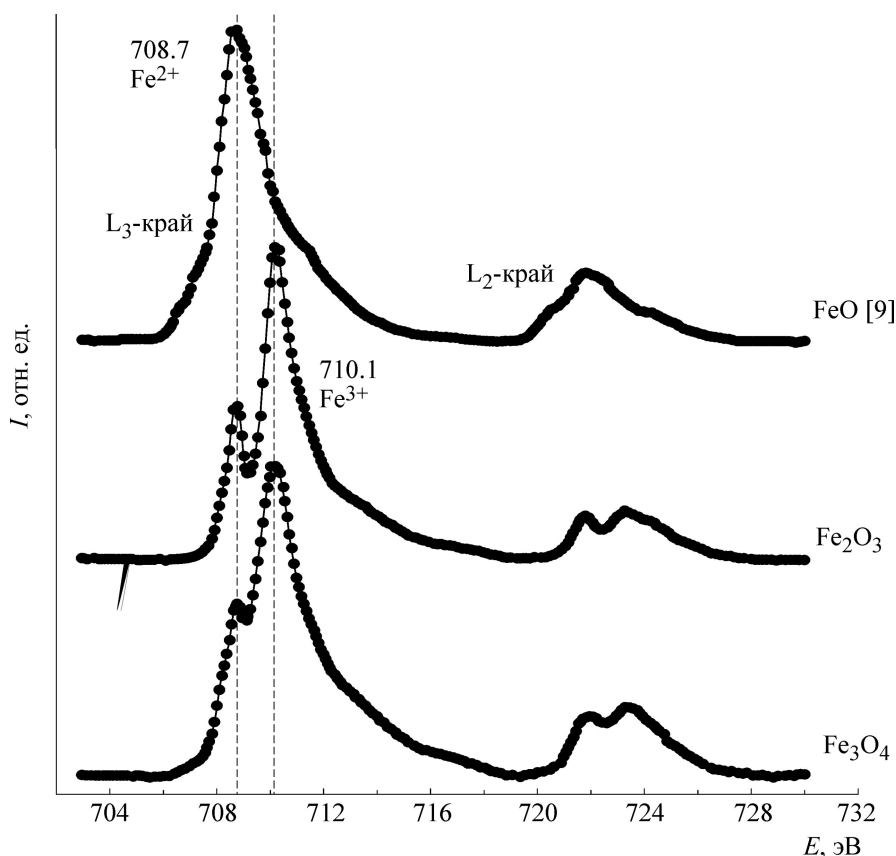


Рис. 3. XANES Fe L_{2,3}-спектры эталонных образцов оксидов железа FeO [9], Fe₂O₃ и Fe₃O₄.

ми. Были проверены все возможные комбинации спектров эталонов для основных форм оксида железа (как показатель вклада того или иного зарядового состояния ионов железа), наилучшее совпадение с экспериментальным XANES Fe L_{2,3}-спектром ядра Dps дал набор эталонов FeO и Fe₃O₄ с вкладами 36 и 64% соответственно. Этот результат свидетельствует о наличии в составе Dps не только трехзарядного (Fe³⁺), но и двухзарядного (Fe²⁺) состояния ионов железа, причем в октаэдрическом и тетраэдрическом окружении атомами кислорода.

Следует отметить, что осаждение из водного раствора на кремниевую подложку белка, содержащего неорганическое ядро оксидных соединений железа, не может не сопровождаться его частичным или полным разрушением. Процессы деградации белковой оболочки идут не только во время осаждения, но и при длительном высушивании. Данное обстоятельство может влиять на фазовый состав неорганического ядра Dps, вплоть до изменений координационного числа ионов трехвалентного железа от 4 до 6, так, как это происходит при трансформации оксидов железа (FeO и Fe₃O₄), сопровождающаяся изменением зарядового состояния ио-

нов. С другой стороны, минерализация двухвалентного железа с участием ионов хлора была зарегистрирована ранее *in vitro* в отсутствие кислорода и пероксида водорода [8], поэтому полученные данные вполне могут отражать естественное соотношение Fe²⁺ и Fe³⁺ в ядрах природных молекул Dps. Они свидетельствуют о преимущественном содержании трехвалентного железа в исследованном образце (рис. 4), что соответствует ожидаемому результату, так как одной из основных биологических функций Dps является окисление токсичного для клеток Fe²⁺ до Fe³⁺ с депонированием внутрь белковой полости в легко доступной для последующего использования форме. Тем не менее явное присутствие ионов железа в двухвалентной форме свидетельствует о возможно более сложном составе минерализованного ядра у природного Dps, что необходимо учитывать при исследовании функциональных свойств этого белка.

ВЫВОДЫ

Предложена методика пробоподготовки биологического образца, которая включает осаждение массива наночастиц из рабочего рас-

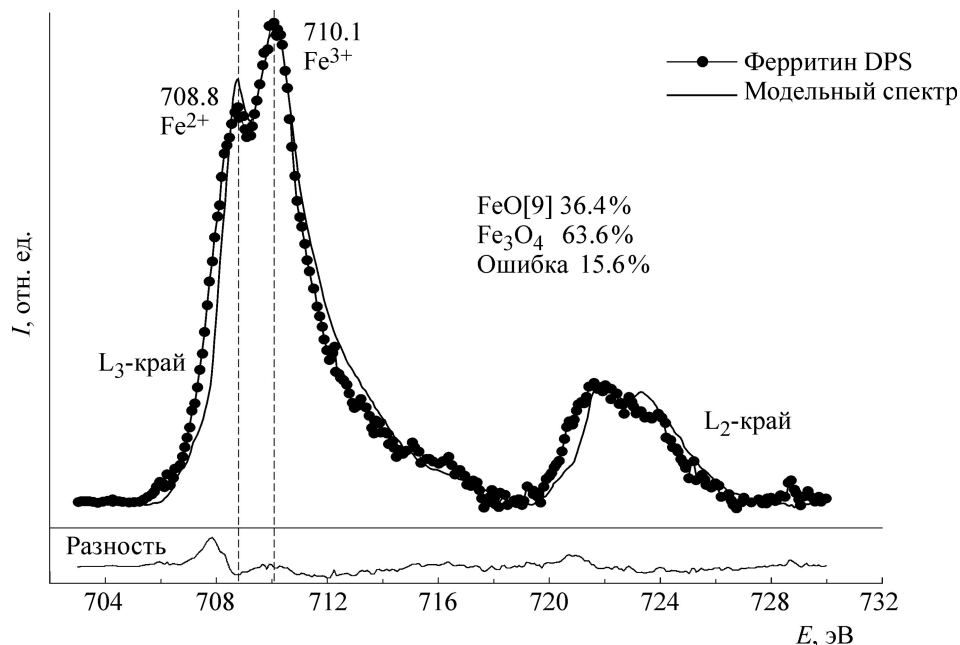


Рис. 4. XANES Fe $L_{2,3}$ -спектр ферритина Dps (точки) и модельный спектр (сплошная линия) совместно с результирующим вкладом выбранных спектров эталонов и разностным спектром (внизу).

творца на очищенные ультразвуком кремниевые подложки.

С использованием высокоинтенсивного синхротронного излучения зарегистрированы XANES Fe $L_{2,3}$ -спектры ядер ферритина Dps. Продемонстрирована применимость сверхвысоковакуумного метода спектроскопии ближней тонкой структуры края рентгеновского поглощения в ультрамягком рентгеновском диапазоне для эффективного анализа зарядового состояния ионов железа в гибридных биологических наноматериалах.

Детальный анализ и моделирование электронно-энергетического спектра свободных электронных состояний подготовленного образца природного белка Dps *Escherichia coli* показал наличие в нем ионов железа с различным зарядовым состоянием Fe^{3+} и Fe^{2+} и различной координацией атомов железа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (в рамках научного проекта № 16-02-01167-а), Министерства образования и науки Российской Федерации (в рамках государственного задания ВУзам в сфере научной деятельности на 2014–2016 гг. – проект № 1606 (СЮТ, ОАЧ), задание № 3.1868.2014/К (ЭПД, СЮТ, ОАЧ)) и Российского научного фонда (грант №14-14-00985, очистка Dps и аналитическое центрифугирование – ОНО, ССА). Исследование также было поддержано Российско-

Германской Лабораторией BESSY II. Авторы благодарны Helmholtz-Zentrum Berlin (Берлин, Германия) за время, предоставленное на синхротроне. Результаты исследований частично были получены на оборудовании ЦКП НО ВГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Zeth, *Biochem. J.* **445**, 297 (2012).
2. В. В. Никандров, *Успехи биол. химии* **40**, 357 (2000).
3. A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, et al., *J. Appl. Phys.* **103**, 074503 (2008).
4. J. Hwang, C. Krebs, B. H. Huynh, et al., *Science* **287** (5450), 122 (2000).
5. J. S. Rohrer, R. B. Frankel, G. C. Papaefthymiou, et al., *Inorg. Chem.* **28** (17), 3393 (1989).
6. P. Mackle, J. M. Charnock, C. D. Garner et al., *J. Am. Chem. Soc.* **115** (18), 8471 (1993).
7. M. A. Kostianen, P. Hiekkataipale, A. Laiho, et al., *Nature Nanotechnology* **8**, 52 (2013).
8. G. Zhao, P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 27689 (2002).
9. T. J. Regan, H. Ohldag, C. Stamm, et al., *Phys. Rev. B* **64**, 214422 (2001).
10. E. P. Domashevskaya, S. A. Storozhilov, S. Yu. Turishchev, et al., *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **156–158**, 180 (2007).
11. E. P. Domashevskaya, S. A. Storozhilov, S. Yu. Turishchev et al., *Bull. Rus. Acad. Sci.: Physics* **72** (4), 448 (2008).

12. E. P. Domashevskaya, A. V. Chernyshev, S. Yu. Turishchev, et al., *Phys. Solid State* **55** (6), 1294 (2013).
13. A. Erbil, G. S. Cargill III, R. Frahm et al., *Phys. Rev. B* **37**, 2450 (1988).
14. M. Almirón, A. J. Link, D. Furlong, et al., *Genes & Development* (**6**), 2646 (1992).
15. В. О. Покусаева, С. С. Антипов, У. С. Швырева и др., Сорбционные и хроматографические процессы **6**, 922 (2012).
16. P. Schuck, *Biophys. J.* **78**, 1606 (2000).
17. I. N. Serdyuk, N. R. Zaccai, and J. Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function* (Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 2007).
18. A. A. Zamyatnin, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**, 145 (1984).
19. Malvern instrument, URL: <http://www.malvern.com>.
20. V. V. Melekhov, U. S. Shvyreva, A. A. Timchenko, et al., *PLoS One* **10** (5), e01265041 (2015).
21. Fine chemicals for research, URL: <http://www.alfa.com>.
22. P. Ceci, S. Cellai, E. Falvo, et al., *Nucl. Acids Res.* **32** (19), 5935 (2004).
23. V. A. Terekhov, V. M. Kashkarov, E. Yu. Manukovskii, et al., *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **114–116**, 895 (2001).
24. S. Yu. Turishchev, V. A. Terekhov, V. M. Kashkarov, et al., *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **445–451**, 156 – 158 (2007).
25. S. Yu. Turishchev, V. A. Terekhov, D. N. Nesterov, et al., *Technic. Phys. Lett.* **41** (4), 344 (2015).

Synchrotron Studies in the Soft X-Ray Range of the Charge State of Iron Ions in the Ferrihydrite Core of *Escherichia coli* Ferritin Dps

S.Yu. Turishchev*, **S.S. Antipov*** ** ***, **N.V. Novolokina***, **O.A. Chuvenkova***, **V.V. Melekhov******, **R. Ovsyannikov*******, **B.V. Senkovskii*******, **A.A. Timchenko*******, **O.N. Ozoline** *******, and **E.P. Domashevskaya***

*Voronezh State University, Universitskaya pl. 1, Voronezh, 394006 Russia

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Chemistry and Biology, Immanuel Kant Baltic Federal University,
Universitetskaya ul. 2, Kaliningrad, 236041 Russia

****Institute for Biological Instrumentation and Pilot Plant, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 7, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

*****Helmholtz-Zentrum Berlin, Albert-Einstein-Str. 15, Berlin, 12489 Germany

*****Institute of Protein Research, ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

*****Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Escherichia coli Dps belongs to a specific family of bacterial ferritins and represents a nanosized particle comprising an inorganic core, ~ 5 nm in diameter, and a protein shell with a size of 8–9 nm. The protein shell consists of 12 identical subunits with the known crystal structure of a dodecamer. The composition and the structure of the core are much less investigated. Core formation is associated with oxidation products of Fe²⁺ ions in the ferroxidase centers of the protein. Thus, Fe₂O₃ oxides are to be the main compounds of the core. However, Fe²⁺ ions mineralization capabilities due to anaerobic conditions *in vitro* may indicate a more complicated composition of the core in native Dps. This paper presents a technique to prepare the purified Dps samples for ultrahigh vacuum synchrotron experiments, performed by the method of X-ray absorption near edge structure spectroscopy of the iron absorption edge in the soft X-ray region. The conducted synchrotron experiments revealed in the prepared biological sample the presence of not only trivalent, but also divalent iron ions in octahedral and tetrahedral environment of oxygen atoms. This points to a complex ionic composition of the core even in native Dps protein, isolated from aerobically grown bacteria.

Key words: ferritin Dps, Fe²⁺, Fe³⁺, inorganic core, synchrotron radiation, XANES