

17 β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗА ТИПА 5 ИЗ *Mus musculus*: ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И АНАЛИЗ МЕТОДОМ МАЛОУГОЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

© 2024 г. П. В. Егорова^{1, 2}, В. Е. Гонялин^{1, 2}, А. Э. Гималетдинова^{1, 2}, С. А. Рябов^{1, 2},
М. С. Глазырин^{1, 2}, Н. С. Гараева^{2, 3}, Д. Д. Куклина^{4, 5}, Ю. Л. Рижиков^{4, 6}, Н. И. Стрижов⁷,
М. В. Донова⁷, М. М. Юсупов^{3, 8, *}, К. С. Усачев^{3, **}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

²Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр
Российской академии наук”, Казань, 420111 Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

⁴Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

⁵Лаборатория структурной динамики, стабильности и фолдинга белков,
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

⁶Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка,
Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, 141980 Россия

⁷Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина Российской академии наук,
ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Пушино, Московская область, 142290 Россия

⁸Institute of Genetics, Molecular and Cell Biology (IGBMC), Illkirch-Grattenstaden, 67400 France

*e-mail: marat.yusupov@igbmc.fr

**e-mail: k.usachev@knc.ru

Поступила в редакцию 19.11.2024 г.

После доработки 22.11.2024 г.

Принята к публикации 24.11.2024 г.

Одна из наиболее частых причин возникновения патологий эндокринной системы – нарушение баланса гормонов. В регуляции биологической активности андрогенов и эстрогенов в организме участвуют специальные ферменты – 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (17 β -ГСД). На сегодняшний день обнаружено 15 типов этих ферментов. Они играют важную роль в биосинтезе или инактивации различных стероидных гормонов. Изучение структуры этих ферментов позволяет разработать высокоспецифичные ингибиторы в качестве потенциальных терапевтических средств для контроля гормонозависимых заболеваний, а также позволяет предложить пути модификации схожих ферментов для биотехнологического производства гормонов. В статье представлен оптимизированный протокол выделения и очистки 17 β -ГСД типа 5 (17 β -ГСД-5) из *Mus musculus*, а также анализ структуры полученного фермента методами динамического рассеяния света и малоуглового рентгеновского рассеяния.

Ключевые слова: 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа, растворимая форма, конформация, третичная структура, малоугловое рентгеновское рассеяние

DOI: 10.56304/S0234275824060061

Половые стероидные гормоны, такие как эстрогены и андрогены, участвуют в развитии и дифференцировке тканей и органов: костей, сердечно-сосудистой системы, головного мозга, яичек, предстательной железы, эндометрия и яичников.

Список сокращений: 17 β -ГСД – 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы; 17 β -ГСД-5 – 17 β -ГСД типа 5 (*Mus musculus*); ДРС – динамическое рассеяние света; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние.

Влияние стероидов зависит от их относительной концентрации, а также от местной конверсии, что в свою очередь опосредовано рядом ферментов, таких как ароматаза, стероидсульфатаза и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа [1].

17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (17 β -ГСД) – семейство ферментов, участвующих в каталитических реакциях стероидгенеза, которые путем окислительно-восстановительных реакций преобразуют неактивные формы мужских и женских гор-

монов в активные. У млекопитающих обнаружено 15 типов ферментов этого семейства, каждый из которых играет определенную роль в биосинтезе или инактивации различных стероидных гормонов [2–10]. Например, 17 β -ГСД типа 5 (17 β -ГСД-5) катализирует обратимую конверсию неактивного андростендиона в его активную форму – тестостерон [11].

Нарушение баланса этих гормонов может привести к различным патологиям эндокринной системы. Например, повышение уровня андрогенов у женщин сопровождается патологией надпочечников, гипопиза и яичников, а недостаток уровня тестостерона у мужчин может привести к раку и доброкачественной гиперплазии простаты, а также к нарушению формирования пола [12–14].

При сравнении аминокислотных последовательностей 17 β -ГСД-5 человека (*Homo sapiens*) и обезьян (*Macaca fascicularis*) выявлена идентичность в 95%, в то время как с ортологом из мышей (*Mus musculus*) она составила 78%. Стоит отметить, что 17 β -ГСД-5 человека и обезьян лабильны и разрушаются при гомогенизации трансформированных клеток, тогда как фермент из *Mus musculus* – нет. К тому же 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* обладает более высокой активностью чем 17 β -ГСД-5 *Homo sapiens* [15]. Для выявления молекулярных причин указанных отличий ортологов 17 β -ГСД-5 необходимы исследования их пространственной структуры методами рентгеноструктурного анализа. Информация об особенностях строения активного центра фермента 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* позволит разработать специфические ингибиторы, которые станут потенциальными терапевтическими средствами для контроля гормонозависимых заболеваний. Кроме того, на основании этих знаний будут разработаны модификации этих ферментов для биотехнологического производства гормонов.

Один из ключевых этапов получения кристалла белка – оптимизация протоколов выделения и очистки белка и анализ полученного препарата методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). С целью получения данных о размерах, форме и ориентации доменов белковой молекулы 17 β -ГСД-5 из *Mus musculus* в растворе и поиска оптимальных условий для растворимости и кристаллизации мы оптимизировали протокол выделения и хроматографической очистки этого белка и определили структурные параметры методом МУРР. Для проверки стабильности образца использован метод динамического рассеяния света (ДРС).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Создание конструкции и ее экспрессия

В работе использованы нуклеотидная последовательность гена *akr1c6* и аминокислотная последовательность 17-beta-HSD5 *Mus musculus*

(GenBank NCBI: P70694). кДНК была синтезирована и клонирована в векторе pBluescriptII SK+ фирмой GeneCust Europe (Люксембург). Для экспрессии в клетках *Escherichia coli* нуклеотидная последовательность гена *akr1c6* была переклонирована по рестрикционным сайтам *NdeI* и *HindIII* в плазмидном векторе pET19Mod, кодирующем N-концевой 6-гистидиновый тэг (His₆).

Трансформацию плазмидной ДНК pET19-Mod::17 β -ГСД в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) PlysS проводили методом теплового шока: введение 100 нг плазмиды в клетки, нагрев смеси до 42°C и охлаждение до 4°C. Клеточная культура была выращена в питательной среде LB, содержащей антибиотики, соответствующие маркерам селекции (Amp и Cm), в термошейкере при 180 об/мин и температуре 37°C до значения оптической плотности 0.6 при длине волны 600 нм (OD₆₀₀). Экспрессию индуцировали 0.1 mM изопропил- β -D-тиогаляктопиранозидом (IPTG) с инкубацией клеточной суспензии при 180 об/мин и температуре 30°C в течение 3 ч. Клетки осаждали на центрифуге GYROZEN 2236R (GYROZEN, Корея) при 5000 об/мин (5394 g) в течение 20 мин и температуре 4°C. Для удаления остатков жидкой среды клетки ресуспендировали в буфере А (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 300 mM NaCl, 10% (v/v) глицерин, 2 mM β -меркаптоэтанол) и центрифугировали в тех же условиях. Клеточную биомассу хранили при –80°C.

Очистка целевого белка

Для высвобождения клеточных компонентов осажденные клетки ресуспендировали в буфере А с добавлением ингибиторов протеаз Complete (PIC; Roche, Франция) и фенилметилсульфонил-фторида (PMSF), а затем лизировали на ультразвуковой установке Vibra-Cell VCX 750 (Sonics and Materials, США) при мощности 25% (5 × 30 с) и температуре 4°C. Клеточный дебрис осаждался центрифугированием в два этапа: на центрифуге GYROZEN 2236R при 22000 об/мин (54 111 g) в течение 40 мин при 4°C и на ультрацентрифуге Hanil Ultra 5.0 (Hanil, Китай) при 30000 об/мин (98 784 g) в течение 60 мин при 4°C. Полученный супернатант, содержащий целевой белок, собирали и использовали для выделения и очистки фермента.

На первом этапе для очистки целевого белка использовали металлохелатную аффинную хроматографию. Супернатант наносился на хроматографическую колонку, заполненную Ni-NTA Superflow (QIAGEN, Германия). За счет His₆-тэга на N-конце 17 β -ГСД-5 белок аффинно связывался с сорбентом и элюировался имидазолсодержащимся буфером Е (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 300 mM NaCl, 300 mM имидазол, 10% (v/v) глицерин, 2 mM β -меркаптоэтанол).

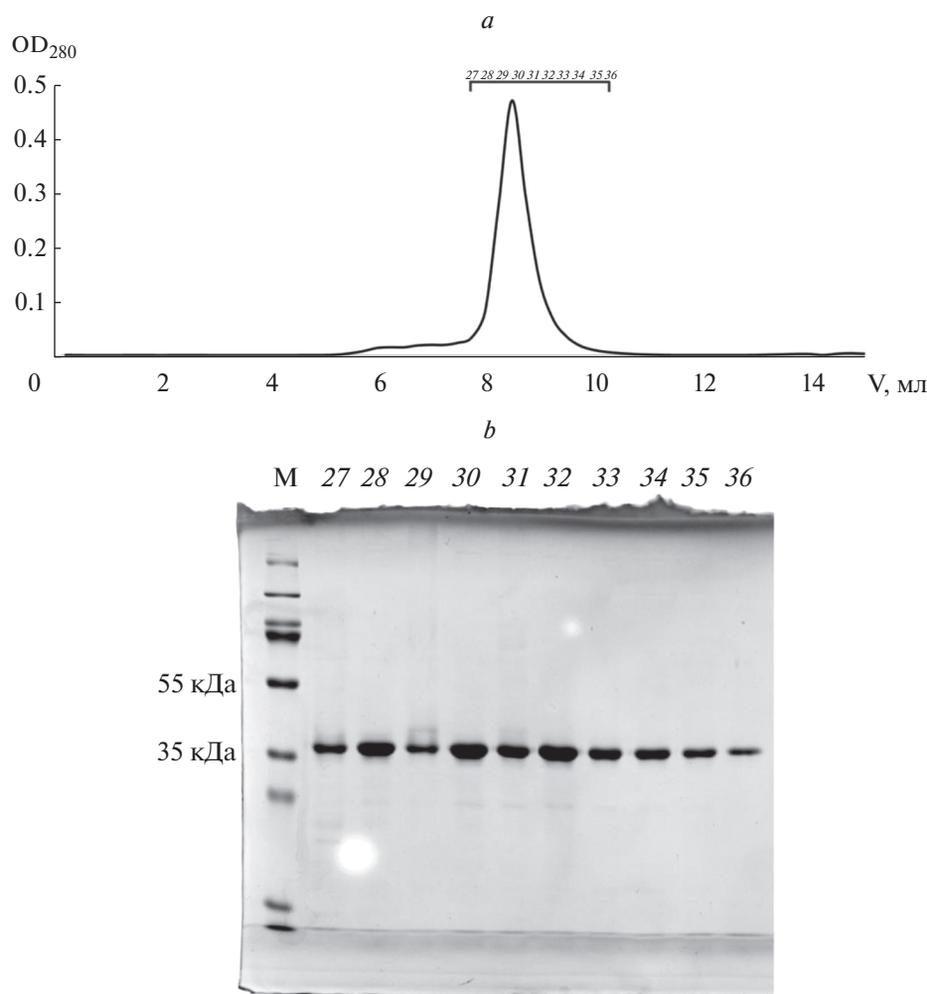


Рис. 1. Анализ чистоты целевого белка. *a* – Профиль элюции эксклюзионной хроматографии: колонка Superdex SEC-70 (Bio-Rad, США), буфер R (50 мМ Tris-HCl, pH 7.8, 200 мМ NaCl, 10% (v/v) глицерин, 2 мМ β-меркаптоэтанол). *b* – Электрофоретический анализ фракций основного пика на хроматограмме (*a*): интервал 7.75–10.25 мл (фракции 27–36). М – маркер молекулярной массы PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США).

Fig. 1. Analysis of quality and purity of the target protein. *a* – Elution profile of exclusion chromatography: Superdex SEC-70 column (Bio-Rad, USA), buffer R (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 2 mM β-mercaptoethanol). *b* – Electrophoretic analysis of the fractions of the main peak in the chromatogram (*a*): 7.75–10.25 mL (27–36 fractions). M – molecular mass marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA).

На втором этапе использовали эксклюзионную хроматографию на хроматографе NGC Discover 10 (Bio-Rad, США) с колонкой Superdex SEC-70 (BioRad). На колонку наносили 5 мг образца в 500 мкл буфера E и элюировали буфером R (50 мМ Tris-HCl, pH 7.8, 200 мМ NaCl, 10% (v/v) глицерин, 2 мМ β-меркаптоэтанол). Выход компонентов нанесенного образца с колонки регистрировали по оптической плотности при длине волны 280 нм.

Чистоту целевого пика анализировали электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) в трис-боратном буфере (25 мМ Трис-борная кислота, pH 8.3, 250 мМ глицин, 0.1% SDS), при напряжении 100–120 В (рис. 1). Фракции, содержащие высоко-

очищенный белок (>98%), концентрировали в пробирках Amicon® Ultra-4, 10 kDa (Merck Millipore, Германия).

Динамическое рассеяние света (ДРС)

Стабильность и гомогенность полученного эксклюзионной хроматографией образца 17β-ГСД-5 оценивали методом ДРС. Для анализа использовали 40 мкл белка (4 мг/мл) в буфере R в стеклянной микрокювете установки BeNano 180 Zeta Pro (Bettersize Instruments, Китай) с лазерным источником света с длиной волны 695 нм и углом рассеяния 90°, при 4°C. Число субтестов составляло 120, а время стабилизации – 30 с. Измерение по-

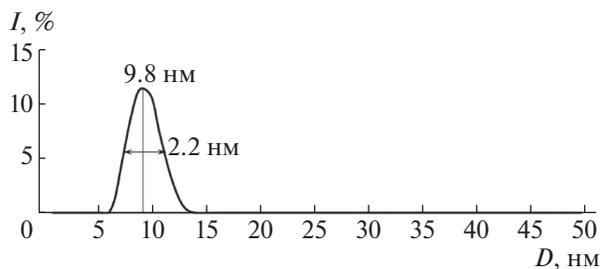


Рис.2. Анализ целевого белка, 17 β -ГСД-5 *Mus musculus*, методом динамического рассеяния света. График зависимости интенсивности излучения (I) от диаметра белка (D).

Fig.2. Analysis of the target protein, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (17 β -HSD-5) *Mus musculus*, by dynamic light scattering. Graph of intensity (I) dependence on protein diameter (D).

вторяли для образцов, которые в течение 24 выдерживали при 4 и 22 $^{\circ}$ C.

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР)

МУРР хроматографически очищенного образца целевого белка с концентрацией 4.33 мг/мл в буфере R проводили на станции BL19U2 синхро-

трона SSRF (Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Шанхай, Китай) [16] при следующей конфигурации: длина волны 1.03 \AA ; расстояние образец–детектор 2.67 м; диапазон модуля вектора рассеяния (q) 0.006–0.456 ($1/\text{\AA}$), где $q = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, 2θ – угол рассеяния; размер пучка 0.33 \times 0.05 мм; температура 20 $^{\circ}$ C. Для каждого образца данные собирали с помощью детектора Pilatus3 \times 2M (DECTRIS

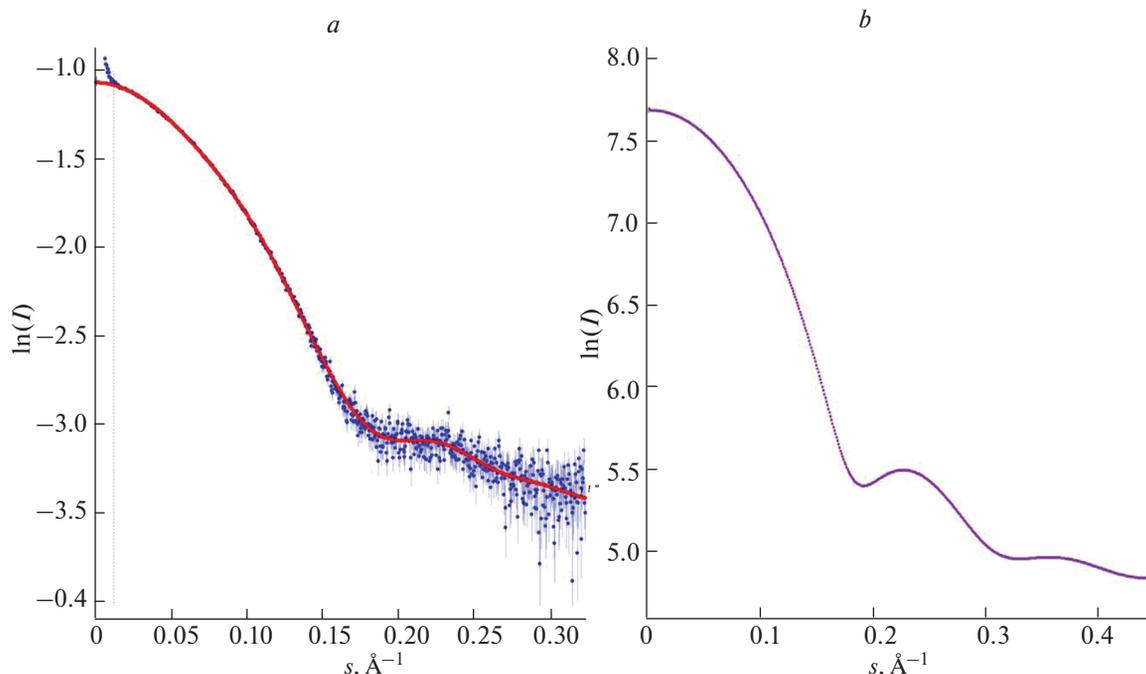


Рис. 3. Анализ белка 17 β -ГСД-5 методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *a* – Экспериментально полученная зависимость интенсивности МУРР от модуля волнового вектора рассеяния (s). Синие точки соответствуют экспериментальным данным, красная линия – аппроксимации, полученной в программном пакете PRIMUS (GNOM). При анализе данных не учитывали область малых углов (вертикальная штриховая линия), где оказывают влияние большие агрегаты с размерами, выходящими за область разрешения метода МУРР. *b* – Полученная в программном пакете CRY SOL *in silico* та же зависимость: МУРР-анализ на расчетной структуре белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* из AlphaFold.

Fig. 3. Analysis of 17 β -HSD-5 protein by small-angle X-ray scattering (SAXS). *a* – Experimentally obtained dependence of the SAXS intensity on the scattering wave vector modulus (s). Blue points correspond to experimental data, red line does to the approximation obtained in the PRIMUS program package (GNOM). When analyzing the data, we did not take into account the region of small angles (vertical dashed line), where large aggregates with sizes beyond the resolution region of the SAXS method have an influence. *b* – The same dependence obtained *in silico* in the CRY SOL software package: SAXS- analysis on the calculated structure of 17 β -HSD-5 protein from AlphaFold.

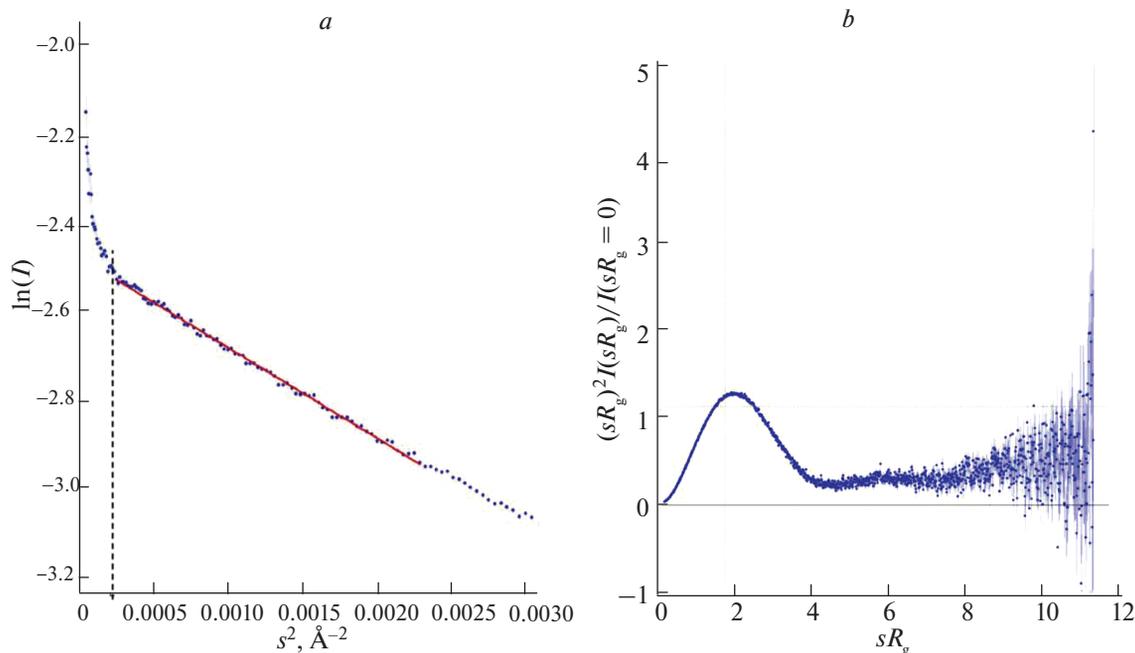


Рис. 4. Построения для определения инвариантов фермента 17β-ГСД-5. *a* – Аппроксимация Гинье. При анализе данных не учитывали область малых углов (вертикальная штриховая линия), где оказывают влияние большие агрегаты с размерами, выходящими за область разрешения метода МУРР. *b* – График Кратки.

Fig. 4. Plots for determination of 17β-HSD-5 invariants. *a* – Guinier approximation. Data analysis did not take into account the small angle region (vertical dashed line), where large aggregates with sizes beyond the resolution region of the SAXS method are influenced. *b* – Kratky plot.

Ltd., Швейцария) при 20 последовательных экспозициях по 1 с.

Для первичной обработки данных использовали программный пакет PRIMUS [17], а для получения формы электронной плотности – программу DAMMIN [18] онлайн сервиса ATSAS [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения качественного образца целевого белка 17β-ГСД-5 предварительно провели эксперименты по оптимизации условий его выделения и очистки. Среди буферов с разными значениями pH и концентрациями соли наиболее оптимальным оказался буфер А. Степень чистоты и качество белка оценивали по профилю элюции эксклюзионной хроматографии и в SDS-PAGE (рис. 1).

Заметим, что образец для исследования методом МУРР должен удовлетворять определенным критериям, один из которых – стабильность в течение длительного времени. Для этого стабильность целевого белка предварительно оценили методом ДРС. В ходе эксперимента регистрировали автокорреляционную функцию с последующим построением графика зависимости интенсивности излучения от размера частиц (рис. 2). Измерения проводили в нескольких повторах для образцов, хранившихся в течение 24 ч при 4 и

22°C. На основании полученных результатов был сделан вывод о гомогенности и стабильности целевого белка, 17β-ГСД-5, а его диаметр составлял около 10 нм.

Результаты анализа белка 17β-ГСД-5 методом МУРР представлены на рис. 3. График получен в программном пакете PRIMUS по следующему алгоритму: 1) статистическое усреднение кривых от последовательных экспозиций по времени, 2) процедура вычитания сигнала от буфера для получения информации только о белке.

Для определения структурных инвариантов проведен анализ областей Гинье и Кратки, графики которых представлены на рис. 4. Аппроксимация Гинье имеет линейную зависимость, за исключением области самых малых углов. Это свидетельствует о том, что образец преимущественно монодисперсен, но при этом содержит немного агрегатов. График Кратки имеет куполообразный вид, а сравнение с точкой $\{\sqrt{3}, 1.104\}$ свидетельствует об анизотропной форме белка [20]. Эти данные позволяют производить дальнейшие вычисления в приближении сферической молекулы. Из расчетов следует, что радиус гирации (R_g) фермента составляет $24.83 \pm 0.08 \text{ \AA}$; объем (V), по инварианту Порода, 56573 \AA^3 ; молекулярная масса (M_r) $34.2 \pm 5.0 \text{ кДа}$, что близко значению M_r 17β-ГСД-5,

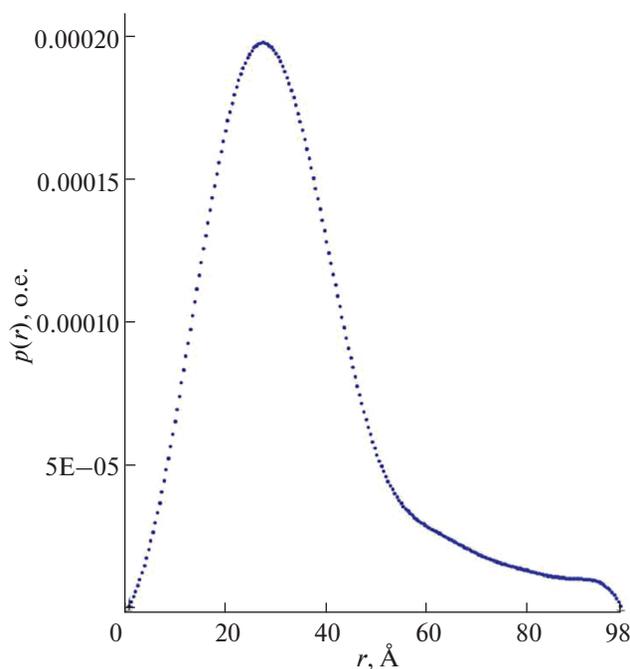


Рис. 5. Функция распределения электронных пар по расстояниям для белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus*.

Fig. 5. Electron pair distance distribution function for *Mus musculus* 17 β -HSD-5.

рассчитанной по аминокислотной последовательности, – 39.227 кДа.

На основе полученных данных в программе CNOM [21] была построена парная функция распределения по расстояниям (рис. 5), максимальный диаметр (D_{\max}) которой составлял 98 Å (общая оценка качества 0.53). Этот график имеет куполообразный вид – это значит, что белок структурирован, имеет слегка вытянутую глобулярную (эллипсообразную) форму.

Для восстановления формы электронной плотности исследуемого белка был использован *ab initio* метод, который основан на поиске глобального минимума (метод “имитации отжига”). Метод был предложен Р. Часон и др. [22]. Расчет формы электронной плотности проведен в программном пакете DAMMIN. Значение качества приближения модели (χ^2) составляет 1.369. Для интерпретации полученных данных сопоставили структуры рассчитанной электронной плотности и предсказанной по аминокислотной последовательности 17 β -ГСД-5 из базы данных AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) [23] (рис. 6). Для графического отображения и визуализации структур была использована программа ChimeraX [24]. Стоит отметить, что радиус гирации (R_g), рассчитанный из *in silico* эксперимента МУРР в программном пакете CRY SOL [25] на модели белка 17 β -ГСД-5 из AlphaFold, равен 20.3 Å, а максимальный диаметр (D_{\max}) – 84.41 Å. Различия в инвариантах свидетельствуют о вероятных неточностях в структуре

белка из базы AlphaFold. Следовательно, необходимо проведение исследования структуры белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* с атомарным разрешением методом рентгеноструктурного анализа.

Сопоставление предсказанной структуры белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* и полученной методом МУРР электронной плотности, а также ряд расчетных параметров (инвариантов) позволяют сделать вывод, что в растворе белок находится в виде мономера. А по распределению электронной плотности, по результатам МУРР-анализа, можно заключить, что фермент не имеет неструктурированных участков, которые могут препятствовать его кристаллизации – с целью получения образцов для высокоразрешающего рентгеноструктурного анализа.

В рамках данной работы нами подобраны и оптимизированы условия экспрессии и очистки белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus*, оптимизирован состав буфера, в котором очищенный образец стабилен в течение 24 ч при 4°C и 22°C. Стабильность очищенного белка подтверждена методом ДРС. На основе данных МУРР-анализа рассчитаны структурные инварианты и построено распределение электронной плотности белка. На основании полученных результатов сделан вывод, что фермент 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* в растворе находится преимущественно в виде мономера, имеет компактную форму и на его поверхности нет неструктурированных участков. Таким образом, описанный здесь протокол выделения и очистки белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus* может быть использован для получения кристалли-

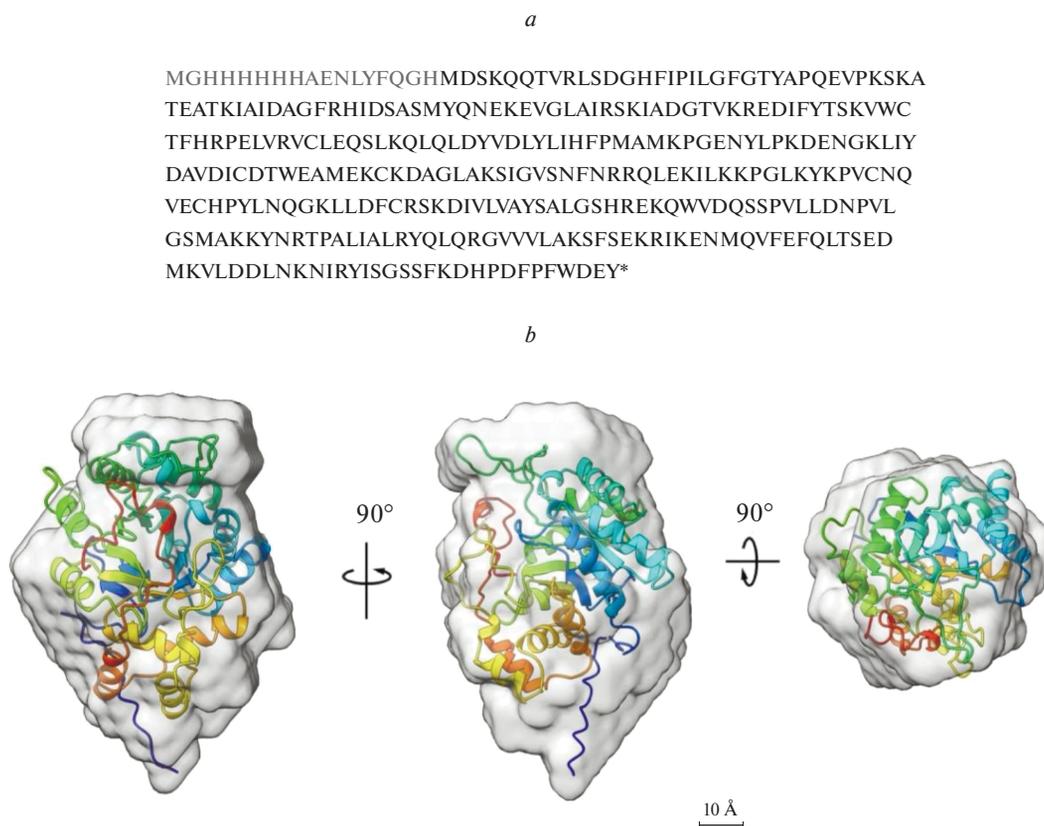


Рис. 6. Первичная и третичная структуры белка 17 β -ГСД-5 *Mus musculus*. *a* – Аминокислотная последовательность синтезированного белка, на которой серым фоном выделен участок с 6-гистидиновым тэгом. *b* – Сопоставление структуры 17 β -ГСД-5 *Mus musculus*, полученной в программном пакете AlphaFold2, и электронной плотности, полученной методом МУРР в программе ChimeraX.

Fig. 6. Primary and 3D-structures for *Mus musculus* 17 β -HSD-5 protein. *a* – Amino acid sequence of the synthesized protein, wherein the region with the 6-histidine tag is highlighted in gray. *b* – Comparison of 17 β -HSD-5 structure obtained in the AlphaFold2 software package and electron density obtained by the SAXS method in the ChimeraX software.

ческой формы этого фермента и исследования его структуры методом рентгеноструктурного анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках соглашения № 075-15-2024-630 о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии в целях реализации научного проекта под руководством привлекаемого ведущего ученого.

Работы по созданию плазмидной ДНК pET19-Mod::17 β -ГСД выполнялись сотрудниками ИБФМ РАН в рамках выполнения научной темы FMRM-2022-0020 N 122040500054-3 (ЕГИСУ НИОКТР).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Настоящая статья не содержит исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hilborn E., Stål O., Jansson A. Estrogen and androgen-converting enzymes 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: with a special focus on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer. *Oncotarget*, 2017, 8, 30552–30562. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15547>
2. Brereton P., Suzuki T., Sasano H., Li K., Duarte C., Obeyesekere V., Haeseleer F., Palczewski K., Smith I., Komisaroff P., Krozowski Z. Pan1b (17 β HSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, 22, 111–117. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00417-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00417-2)
3. He X.Y., Merz G., Mehta P., Schulz H., Yang S.Y. Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17beta-hydroxysteroid dehy-

- drogenase. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 15014–15019. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15014>
4. Krazeisen A., Breitling R., Imai K., Fritz S., Möller G., Adamski J. Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7(1). *FEBS Lett.*, 1999, 29, 373–379. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01366-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01366-6)
 5. Dufort I., Rheault P., Huang X.F., Soucy P., Luu-The V. Characteristics of a Highly Labile Human Type 5 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Endocrinology*, 1999, 140, 568–574. <https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6531>
 6. Li K.X., Smith R.E., Krozowski Z.S. Cloning and expression of a novel tissue specific 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocr. Res.*, 1998, 24, 663–667. <https://doi.org/10.3109/07435809809032667>
 7. Biswas M.G., Russell D.W. Expression cloning and characterization of oxidative 17 β - and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 15959–15966. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.15959>
 8. Geissler W.M., Davis D.L., Wu L., Bradshaw K.D., Patel S., Mendonca B.B., Elliston K.O., Wilson J.D., Russell D.W., Andersson S. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat. Genet.*, 1994, 7, 34–39. <https://doi.org/10.1038/ng0594-34>
 9. Wu L., Einstein M., Geissler W.M., Chan H.K., Elliston K.O., Andersson S. Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 12964–12969.
 10. Luu The V., Labrie C., Zhao H.F., Couët J., Lachance Y., Simard J., Leblanc G., Côté J., Bérubé D., Gagné R., Labrie F. Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta. *Mol. Endocrinol.*, 1989, 3(8), 1301–1309. <https://doi.org/10.1210/mend-3-8-1301>
 11. Zhou M., Qiu W., Chang H.J., Gangloff A., Lin S.X. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction results of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2002, 58, 1048–1050. <https://doi.org/10.1107/s0907444902005255>
 12. Dimitrakakis C., Bondy C. Androgens and the breast. *Breast Cancer Res.*, 2009, 11, 212. <https://doi.org/10.1186/bcr2413>
 13. Молашенко Н.В., Калинин Н.Ю., Иоутси В.А., Гуринович О.С., Бабаева Д.М., Вознесенская А.А., Платонова Н.М., Юкина М.Ю., Колодкина А.А., Пономарева Т.А. Случай дефицита 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы 3-го типа в практике взрослого эндокринолога. *Ожирение и метаболизм*, 2023, 20, 73–83. <https://doi.org/10.14341/omet12942>
 14. Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 76, 143–151. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(00\)00155-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00155-2)
 15. Luu-The V., Dufort I., Pelletier G., Labrie F. Type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: its role in the formation of androgens in women. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2001, 171, 77–72. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00425-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00425-1)
 16. Yiwen L., Guang-Feng Liu, Hong-Jin Wu, Ping Zhou, Chun-Xia Hong, Na Li, Fenggang Bian. BL19U2: Small-angle X-ray scattering beamline for biological macromolecules in solution at SSRF. *Nucl. Sci. Tech.*, 2020, 31, 117. <https://doi.org/10.1007/s41365-020-00825-3>
 17. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.*, 2003, 36, 1277–1282. <https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
 18. Svergun D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.*, 1999, 76, 2879–2886. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77443-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77443-6)
 19. Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., Jeffries C.M., Svergun D.I. AT-SAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.*, 2017, 50, 1212–1225. <https://doi.org/10.1107/S1600576717007786>
 20. Brennich M., Pernot P., Round A. How to analyze and present SAS data for publication. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, 1009, 47–64. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6038-0_4
 21. Svergun D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.*, 1992, 25, 495–503. <https://doi.org/10.1107/S0021889892001663>
 22. Chacón P., Morán F., Díaz J.F., Pantos E., Andreu J.M. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophys. J.*, 1998, 74, 2760–2775. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77984-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77984-6)
 23. Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A., Židek A., Green T., Tunyasuvunakool K., Petersen S., Jumper J., Clancy E., Green R., Vora A., Lutfi M., Figurnov M., Cowie A., Hobbs N., Kohli P., Kleywegt G., Birney E., Hassabis D., Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.*, 2022, 50, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
 24. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Meng E.C., Couch G.S., Croll T.I., Morris J.H., Ferrin T.E. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.*, 2021, 30, 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
 25. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.*, 1995, 28, 768–773. <https://doi.org/10.1107/S1600576717007786>

17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 5 from *Mus musculus*: Isolation, Purification and Small-Angle X-Ray Scattering Analysis

P. V. Egorova^{a, b}, V. E. Gonyalin^{a, b}, A. E. Gimaltdinova^{a, b}, S. A. Ryabov^{a, b}, M. S. Glazyrin^{a, b},
N. S. Garaeva^{b, c}, D. D. Kuklina^{d, e}, Y. L. Ryzhykau^{d, f}, N. I. Strizhov^g,
M. B. Donova^g, M. M. Yusupov^{c, h, #}, and K. S. Usachev^{c, ##}

^aKazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bFederal Research Centre "Kazan Scientific Centre", Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

^cNational Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

^dMoscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast', 141701 Russia

^eLaboratory of Structural Dynamics, Stability and Folding of Proteins, Institute of Cytology,
Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^fFrank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Moscow oblast', 141980 Russia

^gInstitute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G.K. Skryabin RAS FIC Pushchino Scientific Centre
Pushchino Scientific Centre for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast', 142290 Russia

^hInstitute of Genetics, Molecular and Cell Biology (IGBMC), Illkirsch-Graffenstaden, 67400 France

[#]e-mail: marat.yusupov@igbmc.fr

^{##}e-mail: k.usachev@knc.ru

Abstract – One of the most frequent causes of endocrine system pathologies is the imbalance of hormones. Special enzymes, 17 β -hydroxysteroiddehydrogenases, are involved in the regulation of the biological activity of androgens and estrogens in the body. To date, 15 types of these enzymes have been discovered. They play an important role in the biosynthesis or inactivation of various steroid hormones. Studying the structure of these enzymes allows the development of highly specific inhibitors as potential therapeutic agents for the control of hormone-dependent diseases, and also allows us to propose ways to modify similar enzymes for biotechnological hormone production. This paper presents an optimized protocol for the isolation and purification of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 from *Mus musculus*, as well as analysis of the structure of this enzyme by dynamic light scattering and small-angle X-ray scattering methods.

Keywords: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, soluble form, conformation, 3D-structure, small-angle X-ray scattering