Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика
Профиль: Физика живых систем

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ 17β-ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ 5-ГО ТИПА ИЗ *MUS MUSCULUS* МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Студент 4 курса группы 06-011
«20» 06 2024 г. _____ (Егорова П.В.)

Научный руководитель
д.ф.-м.н, профессор
«20» 06 2024 г. _____ (Усачев К.С.)

Научный консультант
к.ф.-м.н, м.н.с. НИЛ
Струкурная биология
«20» 06 2024 г. _____ (Гараева Н.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики
д.х.н., профессор
«20» 06 2024 г. _____ (Аганов А.В.)

Казань-2024

Казань-2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 3

Обзор литературы 5

1. 17β-гидроксистероиддегидрогеназы 5

2. Динамическое рассеяние света 7

3. Малоугловое рентгеновское рассеяние 10

3.1 Аппроксимация Гинье..... 13

3.2 Форма макромолекулы 13

3.3 Инвариант Порода 14

3.4 Функция распределения расстояний 15

3.5 Получение набора структур 16

Экспериментальная часть 18

4.1 Объект исследования 18

4.2 Подготовка образца 20

4.2.1 Трансформация конструкции в компетентные клетки 20

4.2.2 Выделение рекомбинантного белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* 20

4.2.3 Очистка рекомбинантного белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* 21

4.3 Эксперимент по динамическому рассеянию света 24

4.4 Эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию 26

4.4.1 Определение инвариантов 27

4.4.2 Анализ функции пар расстояний 28

4.4.3 Получение и анализ формы электронной плотности 29

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 31

Публикации по теме исследования 32

Список литературы 33

Приложение 35

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение баланса гормонов может привести к различным патологиям эндокринной системы. Так повышение уровня андрогенов у женщин сопровождается патологией надпочечников, гипофиза и яичников. А недостаток уровня тестостерона у мужчин может привести к раку, доброкачественной гиперплазии простаты, а также к нарушению формирования пола (НФП).

В регуляции биологической активности андрогенов и эстрогенов в организме участвуют специальные ферменты – 17β-гидроксистероиддегидрогеназы (17β-ГСД). В организме человека, крысы и мыши обнаружено 15 типов ферментов данного типа, каждый из которых играет свою роль в механизме катализа. Андрогены и эстрогены обладают наибольшей активностью в 17-гидроксиформе. Так, например 17β-ГСД 5-го типа, катализирует обратимое превращение относительно неактивного андростендиона (4-диона) в его активную форму – тестостерон. Нарушение синтеза или действия андрогенов и эстрогенов является одной из форм НФП. Эта группа патологий включает в себя дефекты биосинтеза гормонов таких, как дефицит фермента в живых тканях 17β-гидроксистероиддегидрогеназы (17β-ГСД) 5-го типа [1].

Актуальность проблемы определяется распространенностью заболевания, высоким риском онкологических заболеваний. Исследование структуры данного фермента позволят разработать характерные ингибиторы, являющиеся потенциальными терапевтическими средствами для контроля гормонозависимых заболеваний, вызванных понижением гормонов в организме. Однако, для структурных исследований белка требуется гомогенный, стабильный, образец с высокой концентрацией.

Целью данной работы является определение структурных характеристик белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Выделить белок 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* и очистить методами металлохелатной аффинной хроматографии и гель-фильтрационной хроматографии;
- Определить степень гомогенности и стабильности белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* методом динамического рассеяния света;
- Провести эксперимент по малоугловому рассеянию с последующими обработкой и анализом полученных данных.

Обзор литературы

1. 17β-гидроксистероиддегидрогеназы

17β-гидроксистероиддегидрогеназы (17β-ГСД) представляют собой группу алкогольоксидоредуктаз, участвующих в каталитических реакциях стероидгенеза (рисунок 1.1). 17β-ГСД играют ключевую роль в регуляции биологической активности андрогенов и эстрогенов. Эту роль выполняют по меньшей мере 5 изоферментов. Известно, что 17β-ГСД катализируют следующие окислительно-восстановительные реакции половых стероидов:

- 20α-Гидроксипрогестерон ↔ Прогестерон
- Дегидроэпиандростерон ↔ Андростендиол
- Андростендион ↔ Тестостерон
- Дигидротестостерон ↔ 5α-Андростандион / 3α-Андростандиол / 3β-Андростандиол
- Эстрон ↔ Эстрадиол
- 16α-Гидроксиэстрон ↔ Эстриол [2].

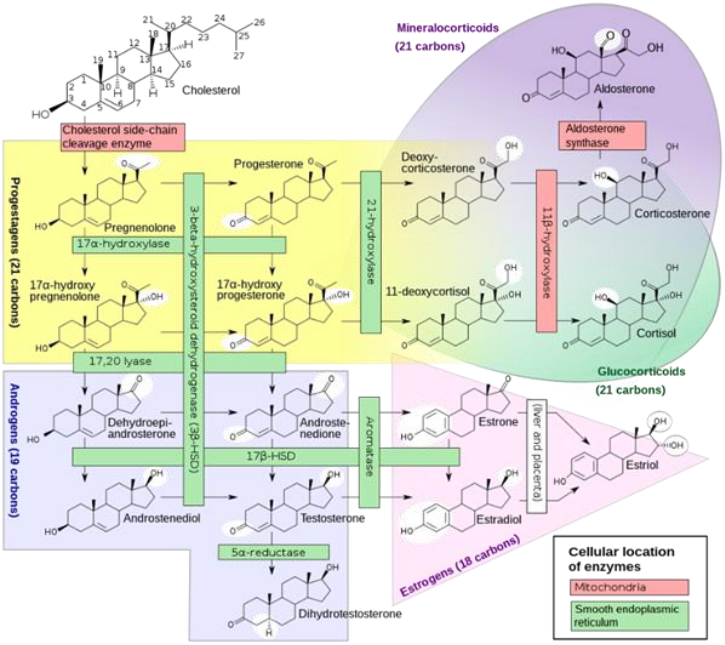

Рисунок 1.1 – Стероидгенез. 17β-ГСД виден в нижней левой области [2]

У млекопитающих обнаружены 15 типов 17β-ГСД. 17β-ГСД 5-го типа,

один из семи типов 17β-гидроксистероиддегидрогеназы, охарактеризованных на данный момент у человека, катализирует обратимую трансформацию андростендиона (4-диона) в тестостерон (рисунок 1.2). Андростендион – основной стероидный гормон, является промежуточным продуктом и основой для образования тестостерона и эстрона. Синтезируется у мужчин и женщин корой надпочечников и половыми железами. Основные реакции, катализируемые 17β-ГСД (например, превращение андростендиона в тестостерон), на самом деле являются реакциями гидрирования (восстановления), а не дегидрирования (окисления). Стоит отметить высокую гомологию фермента 17β-ГСД 5-го типа с 3-им типом этого же фермента [3].

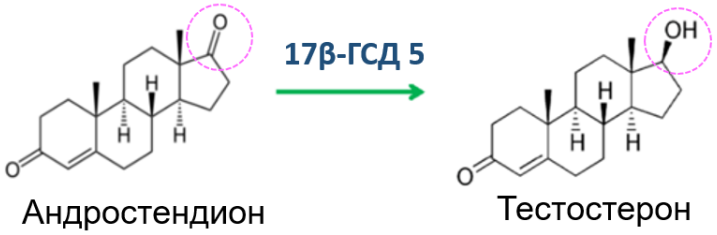

Рисунок 1.2 – Превращение андростендиона в тестостерон в присутствии 17β-ГСД 5-го типа

Сравнение 17β-ГСД 5-го типа демонстрирует, что человеческий фермент на 95% идентичен ферментам обезьян и на 78% ферментам мышей. Кроме того, ферменты человека и обезьяны лабильны и разрушаются при гомогенизации трансфицированных клеток, тогда как фермент мыши – нет [4].

2. Динамическое рассеяние света

Для определения размеров, а также стабильности биомакромолекул используется метод динамического рассеяния света (ДРС) [5, 6]. Метод основывается на детектировании и анализе корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее, в ходе анализа можно определить радиус гирации биомакромолекулы, а также по виду кривой корреляционной функции возможно определить стабильность белка.

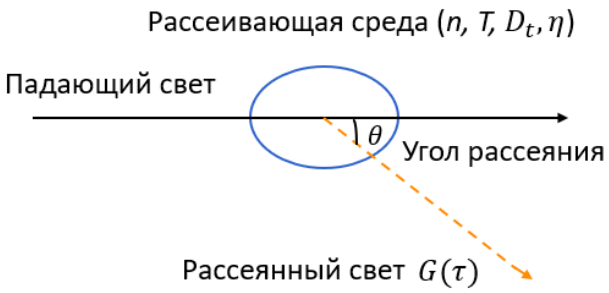

Рисунок 2.1 – Схема динамического рассеяния света

Рассмотрим случай монодисперсного раствора биомакромолекул. Из-за броуновского движения в растворе возникают флуктуации концентрации и, как следствие, локальные неоднородности показателя преломления среды. Лазерное излучение, проходящее через такую среду, рассеивается на этих неоднородностях. Интенсивность рассеяния будет пропорциональна к флуктуациям концентрации. Информацию о размере частиц можно извлечь из корреляционной функции, зависящей от времени, которая имеет вид:

$$G(t) =< I(0) \cdot I(t-\tau) >= \lim_{t_m \to \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(t) \cdot I(t-\tau) dt, \qquad (2.1)$$

где интенсивность I имеет различные значения во времена t и $(t - \tau)$. t_m – время интегрирования (время накопления корреляционной функции). При $\tau=0$ корреляционная функция равна среднеквадратичной интенсивности рассеяния $<I^2>$. Для бесконечного времени корреляция отсутствует и корреляционная функция равна квадрату средней интенсивности рассеяния:

$$G(t) =< I(0) \cdot I(t-\tau) >=< I(0) >< I(t-\tau) >=< I >^2 \qquad (2.2)$$

Броуновское движение может быть описано макроскопическим уравнением диффузии:

$$\frac{\partial c(\vec{r},t)}{\partial t} = -D\Delta c(\vec{r},t), \qquad (2.3)$$

где $c(\vec{r},t)$ – концентрация и D – коэффициент диффузии частиц. В такой системе корреляционная функция интенсивности рассеяния света имеет вид экспоненты, которая убывает во времени за характерное время релаксации, однозначно связанное с коэффициентом диффузии. В этом случае корреляционная функция интенсивности рассеянного света имеет вид:

$$G(\tau) = \mathrm{a} \cdot \exp\left(\frac{-2\tau}{t_c}\right) + b, \qquad (2.4)$$

где в соответствии с решением уравнения диффузии обратное время корреляции равно:

$$\frac{1}{t_c} = D_t q^2 \qquad (2.5)$$

Волновой вектор флуктуаций концентрации описывается выражением:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\frac{\theta}{2} \qquad (2.6)$$

В уравнениях (2.4)-(2.6): a и b – экспериментальные константы, n – показатель преломления жидкости, в которой взвешены дисперсные частицы, λ – длина волны лазерного света и θ – угол рассеяния.

Величины t_c, a и b могут быть найдены путем аппроксимации измеренной корреляционной функции теоретической экспоненциальной функцией.

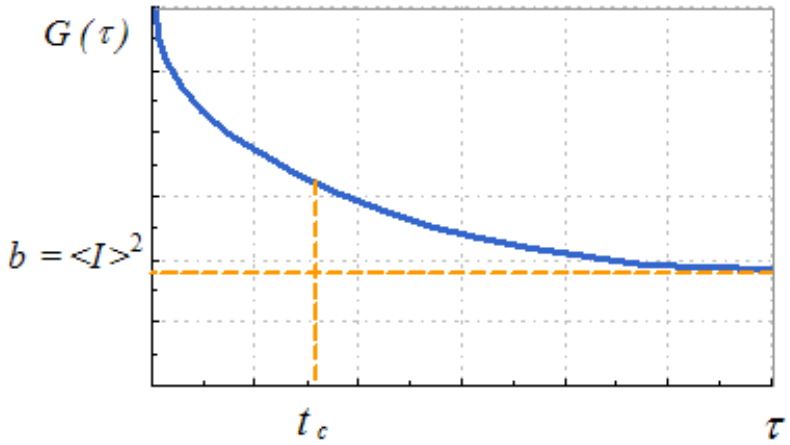

Рисунок 2.2 – Корреляционная функция рассеянного света

Размер частиц может быть рассчитан при помощи формулы Стокса-Эйнштейна:

$$R_h = \frac{k_b T}{6\pi\eta D_T} \tag{2.7}$$

где η – вязкость жидкости, D_T – коэффициент диффузии, T – абсолютная температура, k_b – постоянная Больцмана.

3. Малоугловое рентгеновское рассеяние

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) является информативным методом в структурной биологии, который позволяет получить такие параметры макромолекулы как радиус гирации, объем, молекулярная масса и модель (электронную плотность) исследуемой макромолекулы [7].

Эксперимент основан на рассеянии монохроматического рентгеновского излучения от электронов под малыми углами (рисунок 3.1). Регистрируемая картина рассеяния усредняется по радиусу. Полученное усреднение представляет собой кривую интенсивности рассеяния, зависящую от модуля переданного импульса.

Рассмотрим раствор, в котором положение и ориентация частиц являются случайными и частицы не оказывают влияние друг на друга. Такое состояние соответствует так называемому бесконечному разбавлению, когда между частицами отсутствует взаимодействие. Чтобы достичь такой ситуации, необходим раствор порядка 100 мкл, содержащий несколько миллиграммов макромолекул на миллилитр (концентрация 1 мг/мл). Такая ситуация соответствует различимому сигналу в МУРР. Таким образом, для интерпретации МУРР одиночной частицей вводятся два допущения: 1) все частицы в растворе тождественны – раствор монодисперсный; 2) между частицами в растворе нет взаимосвязи между положениями – разбавленный раствор.

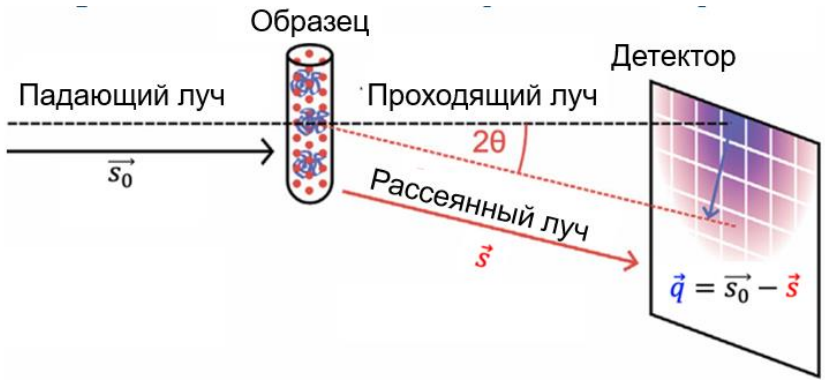

Рисунок 3.1 – Схема по эксперименту МУРР

Выражение для волны, рассеянной одиночной частицей в зависимости от вектора рассеяния $\boldsymbol{q}$:

$$F(\boldsymbol{q}) = \sum_j f_j \exp\left(i\boldsymbol{q} \cdot \boldsymbol{r_j}\right), \tag{3.1}$$

где f_j и r_j – амплитуда рассеяния и положение атома j соответственно. Интенсивность рассеянного излучения:

$$I(\boldsymbol{q}) = |\boldsymbol{F}(\boldsymbol{q})|^2$$

(3.2)

Так как в растворе отсутствует взаимодействие между частицами, то интенсивность рассеянного излучения от единицы объема раствора, содержащего N частиц, дается простым суммированием:

$$I_N(\boldsymbol{q}) = \sum_i^N |\boldsymbol{F_N}(\boldsymbol{q})|^2$$

(3.3)

В случае монодисперсного раствора частицы все еще отличаются друг от друга своими рассеивающими свойствами, поскольку принимают различную ориентацию, и мы может записать интенсивность:

$$I_N(q) = N\langle|\boldsymbol{F}(\boldsymbol{q})|^2\rangle \tag{3.4}$$

Фигурные скобки обозначают ориентационное усреднение по пространству (частицы имеют разные ориентации) и времени (каждая частица в каждый данный момент времени принимает различные ориентации).

Для расчета среднего по $|\boldsymbol{F}(\boldsymbol{q})|^2$ используется решение Дебая:

$$\langle exp(-i\boldsymbol{q} \cdot \boldsymbol{r})\rangle = \frac{\sin qr}{qr} \tag{3.5}$$

Принцип суммирования амплитуд для нахождения общей интенсивности рассеяния сводится к формуле Дебая для системы хаотично ориентированных рассеивающих частиц:

$$I(s) = \sum_j^N I_j(s) + 2\sum\sum_{j\neq k} F_j(s)F_k(s) \cdot \frac{\sin sr_{jk}}{sr_{jk}}, \tag{3.6}$$

где $F_j(s)$ – усреднение амплитуды рассеяния от отдельных частиц. Второй

член в формуле (3.6) называется интерференционным членом.

Усреднив интенсивность рассеяния по телесному углу Ω получим:

$$\langle I(s)\rangle = \frac{1}{4\pi}\int_{\Omega} I(s)d\Omega$$

(3.7)

Усреднение интенсивности в обратном и прямом пространствах тесно связаны, отсюда можно записать:

$$I(s) = 4\pi \int r^2 dr \left\{\frac{1}{4\pi}\int P(r)d\omega\right\} \cdot \frac{\sin sr}{sr} \qquad (3.8)$$

$\gamma(r) = \frac{1}{4\pi}\int P(r)d\omega$ – усредненная функция Паттерсона (корреляционная функция), имеет смысл усреднения значения произведения двух флуктуаций плотности в точках на расстоянии r.

Таким образом, интенсивность рассеяния (является Фурье-преобразованием):

$$I(s) = 4\pi \int r^2 \gamma(r) \cdot \frac{\sin sr}{sr}\, dr \qquad (3.9)$$

Для определения таких структурных параметров, как форма, объем, молекулярная масса и построение модели макромолекулы проводится анализ кривой рассеяния в области малых углов (область Гинье) и области больших углов (область Порода) (рисунок 3.2).

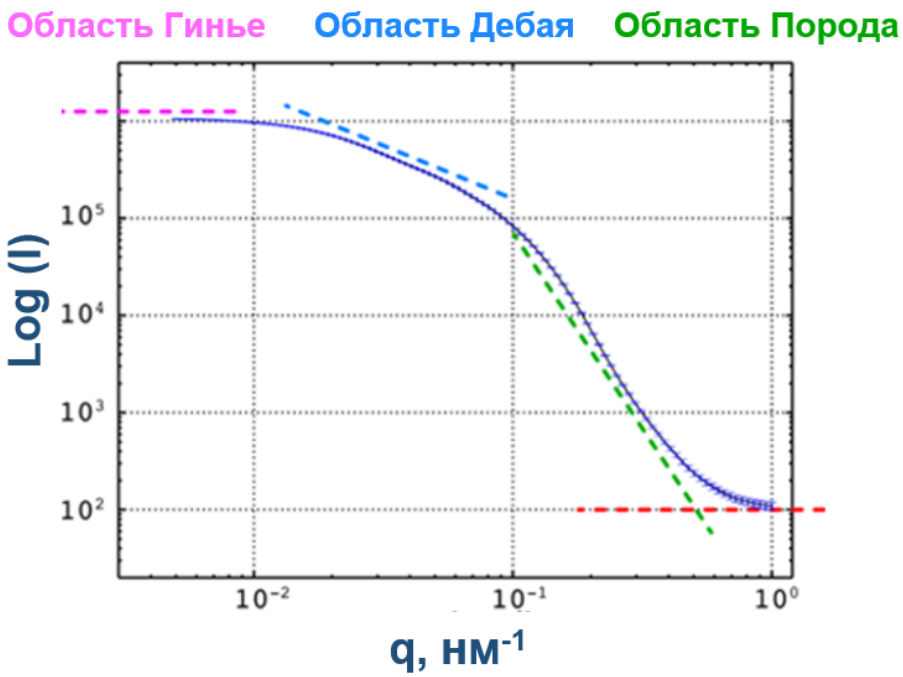

Рисунок 3.2 – Области кривой рассеяния [8].

3.1 Аппроксимация Гинье

Разложим выражение Дебая (уравнение 3.5) в ряд по степеням qr: $\frac{\sin qr}{qr} = 1 - \frac{q^2r^2}{3!} + \frac{q^4r^4}{5!} - \cdots$

Таким образом выражение (3.9) сводится к:

$$I(q) = 4\pi \int \gamma(r)(1 - \frac{(qr)^2}{6} + \cdots)r^2 dr \cong I(0)(1 - \frac{q^2R_g^2}{3}) \quad (3.10)$$

Так как $e^{-x} \cong 1 - x$, получаем:

$$I_0(q) \cong I_0(0)exp\left[-\frac{R_g^2q^2}{3}\right] \quad (3.11)$$

R_g в данной формуле является радиусом инерции тела, массовое распределение в котором выражается электронной плотностью:

$$R_g^2 = \frac{\int \rho(r)r^2dr}{\int \rho(r)dr}$$

(3.12)

Два уравнения, называемые аппроксимацией Гинье:

$$I(q) = I(0)\exp(-\frac{R_g^2q^2}{3}) \quad (3.13)$$

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{R_g^2q^2}{3} \quad (3.14)$$

Уравнения (3.13) и (3.14) верны в области малых углов для частицы любой формы.

3.2 Форма макромолекулы

В области Порода кривая интенсивности рассеяния переходит от Гауссовой функции к функции, подчиняющейся степенному закону q^{-n} [9, 10]. Степень n может принимать значения от 1 до 4. Если n=4, то исследуемая

макромолекула имеет форму сферы; n=2 – форму диска; n=1 – форму стержня. Таким образом по виду графика Кратки (рисунок 3.3), можно определить, какую форму имеет макромолекула.

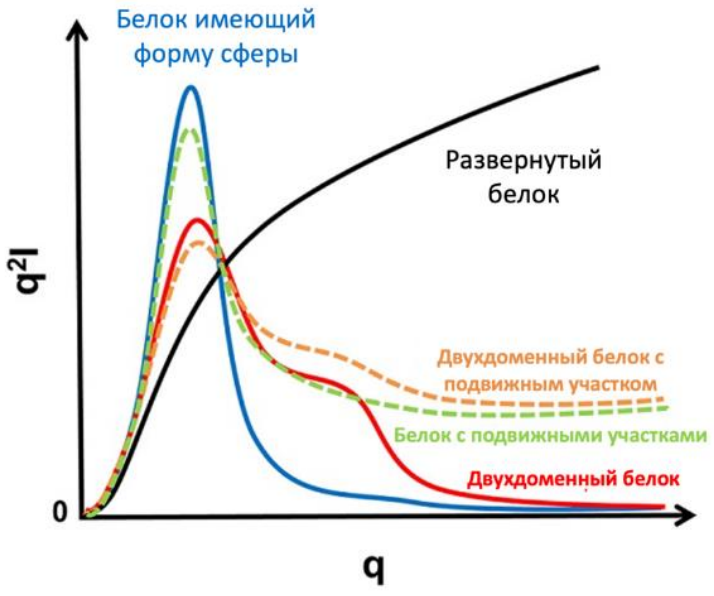

Рисунок 3.3 – График Кратки [8]

3.3 Инвариант Порода

В области больших углов кривая интенсивности рассеяния описывается как:

$$I(q) \approx \frac{8\pi}{q^4}\gamma'(0) \tag{3.15}$$

Эта область несет в себе информации об объеме исследуемой макромолекулы [11].

$$V_P = \frac{2\pi^2 I(0)}{Q}, \tag{3.16}$$

где Q-инвариант Порода, определяемый из:

$$Q = \iiint_V I(q_x, q_{y,} q_z)\, dq_x dq_y dq_z = \int_0^\infty I(q) q^2 dq \tag{3.17}$$

Для монодисперсного раствора в приближении бесконечно разбавленного раствора с известным составом и объемом интенсивность рассеянного излучения, экстраполированная на нулевой угол, и разделенная

на концентрацию раствора, пропорциональна молекулярной массе частицы.

3.4 Функция распределения расстояний

В случае МУРР, при котором *I(q)* – это результат усреднения $|\boldsymbol{F}(\boldsymbol{q})|^2$, обратное преобразование Фурье *I(q)* становится функцией, зависящей от расстояния *r* между частицами:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2}\int_0^\infty q^2 I(q)\frac{\sin qr}{qr}dq \tag{3.18}$$

В уравнении (3.18) *I(q)* относится к одиночной частице объема *V*. Функция $V\gamma(r)$ равнозначна радиальной функции Паттерсона. Пределы интеграла в выражении от 0 до ∞ равны пределам от 0 до D_{max}, где D_{max} – это максимальное расстояние в частице.

Для частицы с однородной плотностью рассеяния, то есть $\rho(\boldsymbol{r}) = \rho$, корреляционную функцию можем записать:

$$\gamma(r) = (\rho - \rho_0)^2\gamma_0(r) \tag{3.19}$$

Для того, чтобы избавиться от объема в выражении 3.18 выбирается нормирующий коэффициент $\bar{\rho}^2 V$:

$$\gamma_0(r) = \frac{1}{\bar{\rho}^2 V}\cdot\gamma(r) \tag{3.20}$$

Преобразование Фурье для $V\gamma(r)$ запишется как:

$$I(q) = V\int 4\pi r^2\gamma(r)\frac{\sin qr}{qr}dr = \int p(r)\frac{\sin qr}{qr}dr, \tag{3.21}$$

где $p(r) = 4\pi r^2 V\gamma(r)$– функция распределения пар расстояний частицы. Эта функция представляет распределение расстояний между парой элементов объема в частице.

Функция распределения пар расстояний является обратным Фурье-преобразованием для *I(q)*:

$$p(r) = \frac{2}{\pi} r^2 \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin qr}{qr} dq \qquad (3.22)$$

Графики функции распределения пар расстояний и интенсивности рассеяния представлены на рисунке 3.4.

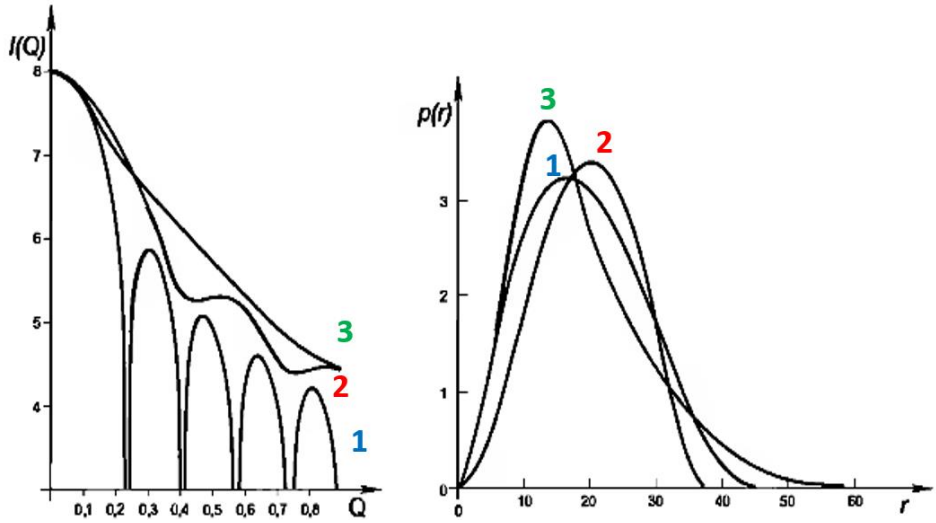

Рисунок 3.4 – Интенсивности рассеяния *I(Q)* и функции распределения пар расстояний *p(r)* для сферы (1), сплюснутого эллипсоида вращения (2), вытянутого эллипсоида вращения (3) [7]

3.5 Получение набора структур

Существуют различные численные *ab initio* методы для расчета структур макромолекул по данным кривой рассеяния. Один из методов расчета является метод поиска глобального минимума (метод «имитации отжига»). Метод основан на получении большого числа реализаций случайного процесса, у которого вероятностные характеристики совпадают с аналогичными величинами решаемой задачи.

В поиске структуры макромолекулы методом поиска глобального минимума в качестве начальной структуры выбирается сфера диаметра, равному максимальному размеру частицы, который рассчитывается при помощи функции пар расстояний. Начальная сфера заполнена сферическими

модельными атомами, которые намного меньше начальной сферы. Метод рассчитывает и подыскивает такую конфигурацию модели, при которой наблюдается минимум функции, выражающую расхождение между расчетными и эмпирическими кривыми рассеяния [12].

Экспериментальная часть

4.1 Объект исследования

Объектом исследования являлся белок 17β-ГСД (17β-гидроксистероиддегидрогеназы) 5-го типа из *Mus musculus*. 17β-ГСД играют ключевую роль в регуляции биологической активности андрогенов и эстрогенов. Эту роль выполняют по меньшей мере пять изоферментов 17β-ГСД: 17β-ГСД1, 17β-ГСД2, 17β-ГСД3, 17β-ГСД4, 17β-ГСД5, обладающих индивидуальной клеточно-специфичной экспрессией, субстратной специфичностью, механизмами регуляции и восстановительной или окислительной каталитической активностью [13]. 17 β-гидроксистероиддегидрогеназы 5-го типа представляет собой стероидный фермент, который катализирует обратимую конверсию андростендиона в тестостерон. Дефицит фермента в живом организме приводит к неправильному строению наружных половых органов мышей [1].

Белок 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* представляет собой глобулярный белок молекулярной массы 37 кДа, изоэлектрическая точка которого pI=8,3, коэффициент экстинкции равен 43235 моль$^{-1}$·см$^{-1}$. Аминокислотная последовательность представлена на рисунке 4.1.

MGHHHHHHAENLYFQGHMDSKQQTVRLSDGHFIPILGFGTYAPQEVPKSKA
TEATKIAIDAGFRHIDSASMYQNEKEVGLAIRSKIADGTVKREDIFYTSKVWC
TFHRPELVRVCLEQSLKQLQLDYVDLYLIHFPMAMKPGENYLPKDENGKLIY
DAVDICDTWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFNRRQLEKILKKPGLKYKPVCNQ
VECHPYLNQGKLLDFCRSKDIVLVAYSALGSHREKQWVDQSSPVLLDNPVL
GSMAKKYNRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSFSEKRIKENMQVFEFQLTSED
MKVLDDLNKNIRYISGSSFKDHPDFPFWDEY*

Рисунок 4.1 – аминокислотная последовательность белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus*. Серым отмечен участок с полигистидиновым тагом (гистидиновым тагом (His-tag) и сайтом расщепления TEV-протеазы)

Фермент мыши на 78% гомологичен по аминокислотной последовательности ферменту человека. На рисунке 4.2 представлено сравнение аминокислотных последовательностей мышиного и человеческого ферментов.

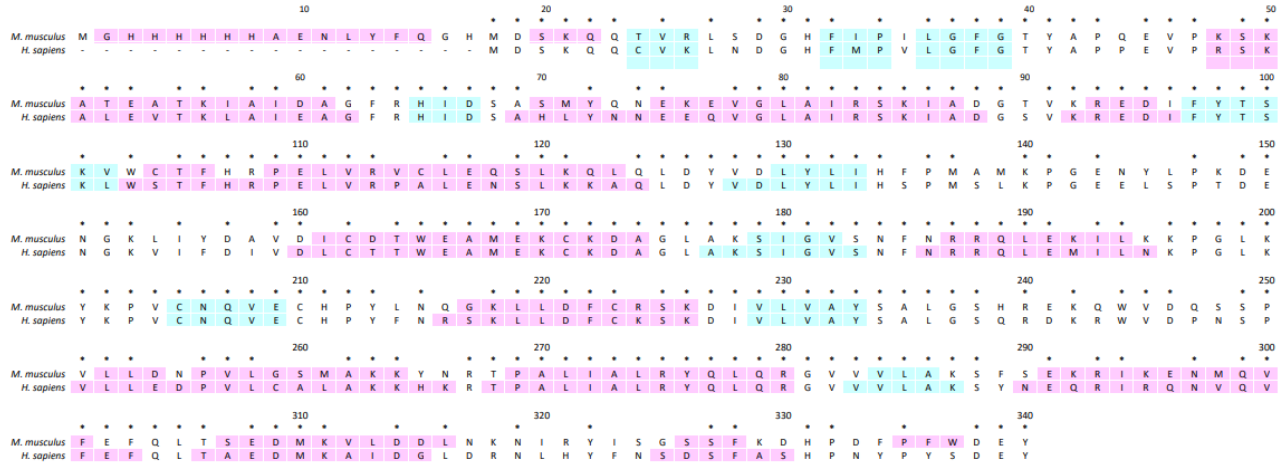

Рисунок 4.2 – Сравнение аминокислотной последовательности человеческого (*H. sapiens*) и мышиного (*M. musculus*) фермента 17β-ГСД 5-го типа. Розовым обозначены альфа-спирали, голубым – бета-складки, белым – неструктурированные части, звездой сверху – выделены идентичные аминокислотные остатки. Для мышиного фермента положение элементов вторичной структуры рассчитаны при помощи программы AlphaFold [14]

4.2 Подготовка образца

4.2.1 Трансформация конструкции в компетентные клетки

Трансформация плазмиды с геном исследуемого белка (pET19Mod::*17β*-ГСД) в компетентные клетки *E.coli* BL21(DE3) осуществлялась путем введения 100 нг плазмидной ДНК pET19Mod::*17β*-ГСД в клетки. Смесь инкубировалась на льду в течение 20 минут, а затем прогревалась при 42°C в течение 1,5 минут после чего была перенесена в лед на 1 минуту. Затем к клеткам была добавлена питательная среда 2xYT (смотреть табл. 2 в приложении), культура инкубировалась при 37°C в течение 1 часа. Полученная смесь была высеяна на твердую агаризованную питательную среду LB (смотреть табл. 2 в приложении), содержащей антибиотики ампициллин и хлорамфеникол. Чашку инкубировали при температуре 37°C в течение 12 часов.

4.2.2 Выделение рекомбинантного белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus*

Гетерологичная экспрессия белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* была проведена в экспрессионном штамме BL21(DE3) *E.coli*. Клетки растили при 37°C на 180 об/мин до оптической плотности $OD_{600} \approx 0,6$ о.е. в питательной среде LB (смотреть табл. 2 в приложении), содержащей антибиотики ампициллин и хлорамфеникол. Индуцирование экспрессии белка произведено добавлением 0,5мМ ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида) и инкубацией при 30°C в течение 1,5 часа с перемешиванием на 180 об/мин. Осаждение клеток проводилось на центрифуге GYROZEN 2236R при 4°C на 5000 об/мин, после чего замораживались на -20°C.

Для высвобождения клеточных компонент клетки были лизированы при помощи ультразвука (мощность 25%, 5 раз по 30 секунд) на гомогенизаторе

Sonics Vibra-Cell VCX 750 и ресуспендированы в буфере CRB (смотреть табл. 2 в приложении) с добавлением ингибиторов протеаз PIC и PMSF (Protease Inhibitor Cocktaile в англоязычной литературе и фенилметилсульфонилфторид соответственно). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при помощи высокоскоростной центрифуги GYROZEN 2236R при 4°C в течение 30 минут на 22000 об/мин и ультрацентрифуги Hanil Ultra 5.0 при 4°C в течение 1 часа на 30000 об/мин.

4.2.3 Очистка рекомбинантного белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus*

Первым этапом очистки рекомбинантного белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* являлась металлохелатная аффинная Ni-NTA хроматография, где белок связывается с сорбентом, нанесенным на колонку, благодаря наличию последовательности из 6 аминокислотных остатков гистидина (His-tag). Супернатант пропускали через колонку IMAC (Bio-Rad) на хроматографе NGC Discover 10 (Bio-Rad). Рекомбинантный белок был элюирован градиентом концентрации имидазола (смотреть табл. 2 в приложении). За элюцией наблюдали по профилю поглощения на длине волны 280 нм (рисунок 4.3).

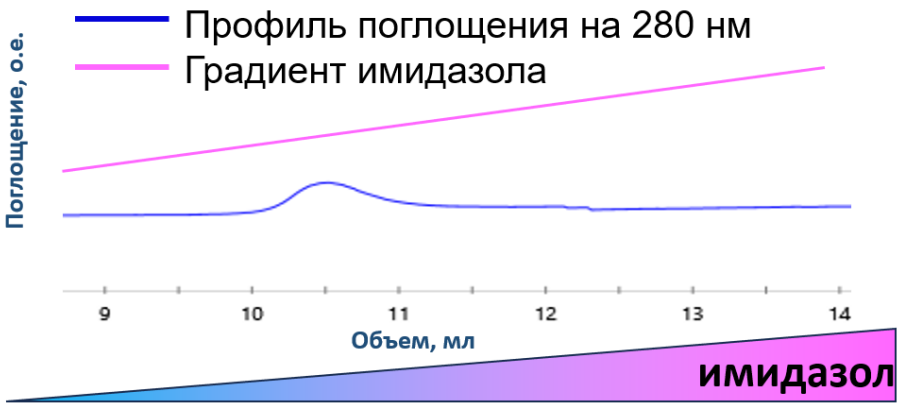

Рисунок 4.3 – Профиль аффинной Ni-NTA хроматографии. Синим цветом показано поглощение при 280 нм, розовым градиент концентрации имидазола

Полученные фракции были отобраны на электрофоретический анализ в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в буфере TGB (смотреть табл. 2 в приложении) при напряжении 110 В (рисунок 4.4).

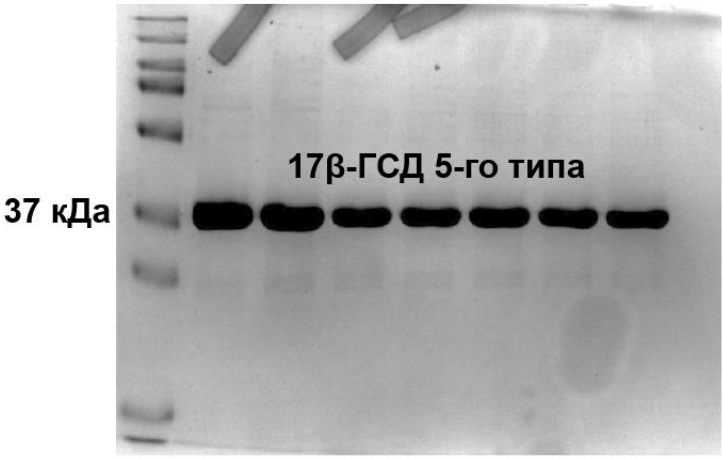

Рисунок 4.4 – Электрофоретический анализ фракций после аффинной Ni-NTA хроматографии

Вторым этапом очистки являлась эксклюзионная гель-фильтрационная хроматография на хроматографе NGC Discover 10 (Bio-Rad), на колонке Superdex 75 10/300, уравновешенной буфером CRB GF (смотреть табл. 2 в приложении). За разделением белков следили по профилю поглощения на длине волны 280 нм (рисунок 4.5).

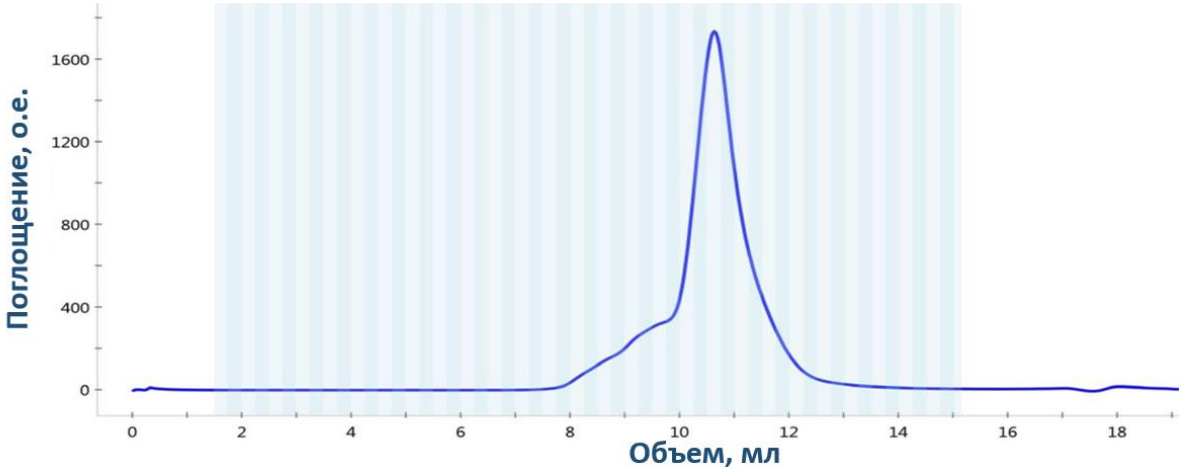

Рисунок 4.5 – Профиль гель-фильтрации. Поглощение при 280 нм показано синим цветом

Чистота образца белка была оценена с помощью электрофоретического анализа в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в буфере TGB (смотреть табл. 2 в приложении) при напряжении 110 В (рисунок 4.6).

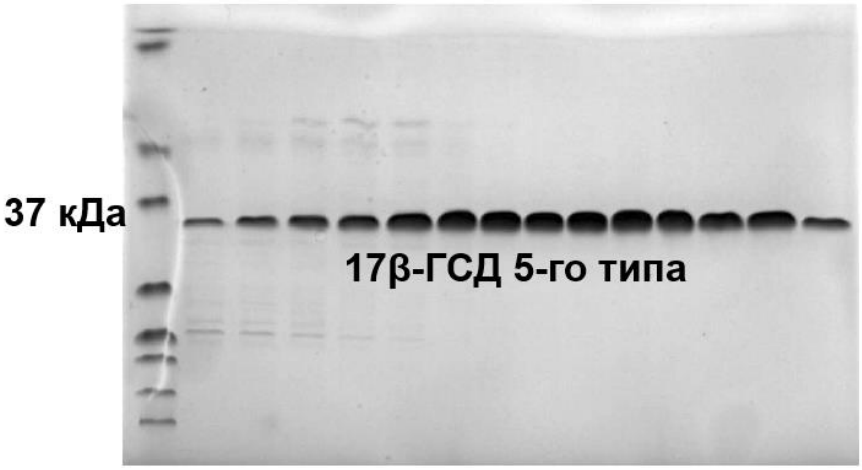

Рисунок 4.6 – Электрофоретический анализ фракций после гель-фильтрации

Полученные высокоочищенные фракции были сконцентрированы до необходимых концентраций (3мг/мл и 4 мг/мл).

4.3 Эксперимент по динамическому рассеянию света

Для оценки стабильности и гомогенности образца в растворе, а также для определения размера белка были проведены эксперименты по динамическому рассеянию света. Для эксперимента использовался белок 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* с концентрацией 3 мг/мл в буфере CRB GF (смотреть табл. 2 в приложении). Измерения проводились на анализаторе размера частиц BeNano 90 Zeta (ФИЦ КазНЦ РАН, Казань) с источником лазерного излучения длиной волны, равной 671 нм. Измерения проводились при температуре 4^0С. Результаты представлены на рисунке 4.7.

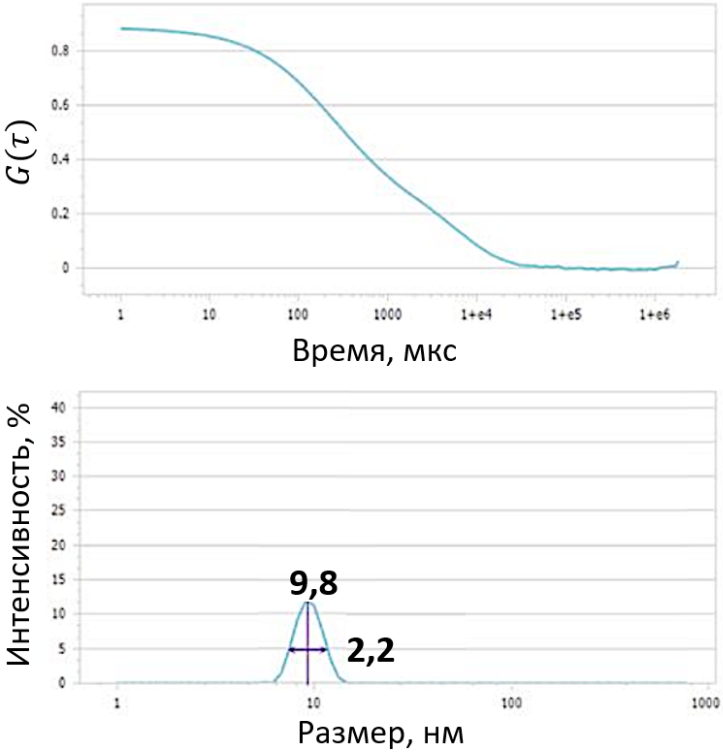

Рисунок 4.7 – Результаты эксперимента по динамическому рассеянию света ($G(\tau)$ – автокорреляционная функция)

Результаты эксперимента по ДРС демонстрируют гомогенность и стабильность полученного образца белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus Musculus*, что соответствует одному единственному пику на графике зависимости

интенсивности от размера. Размер белка, полученный методом ДРС, составляет 9,9±2,2 нм, что согласуется с размерами гомологов (8,55 нм и 6,25 нм) (рисунок 4.8).

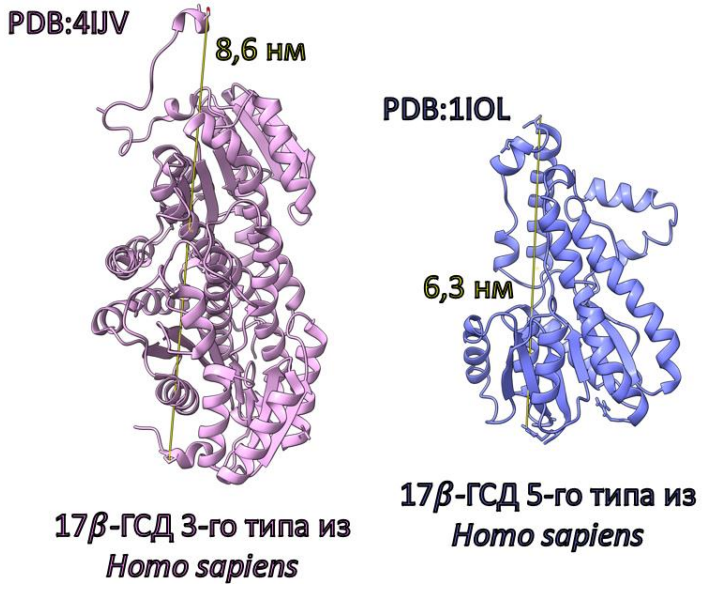

Рисунок 4.8 – Гомологи исследуемого белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* – 17β-ГСД 3-го типа из *Homo sapiens* и 17β-ГСД 5-го типа из *Homo sapiens* и их размеры

Полученные данные демонстрируют, что подобранный протокол по выделению и очистке белка в дальнейшем может быть использован для регистрации данных малоуглового рентгеновского рассеяния, а также к поиску условий кристаллизации и дальнейшего получения структуры методами рентгеноструктурного анализа (РСА).

4.4 Эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию

Для определения структурных параметров белка (радиус гирации, объем, молекулярная масса, восстановление электронной плотности) были проведены эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеянию. Для эксперимента использовался 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* с концентрацией 4 мг/мл в буфере CRB (смотреть табл. 2 в приложении).

Эксперимент проводился при концентрации белка, равной 4 мг/мл. Данные МУРР были зарегистрированы на линии BL16B1 синхротрона SSRF (Шанхай, Китай). Ниже представлены некоторые технические характеристики BL16B1:

- Диапазон энергий 5-20 кэВ;
- Энергетическое разрешение при 10 кэВ $\Delta E/_E = 4 \cdot 10^{-4}$;
- Размер фокуса 0,4x0,5 мм.

Регистрация данных проводилась при температуре 4°C.

Для получения информации о рассеянии только от монодисперсной системы проводилась процедура вычитания сигнала от буфера. Полученная таким образом кривая рассеяния от субстрата представлена на рисунке 4.9.

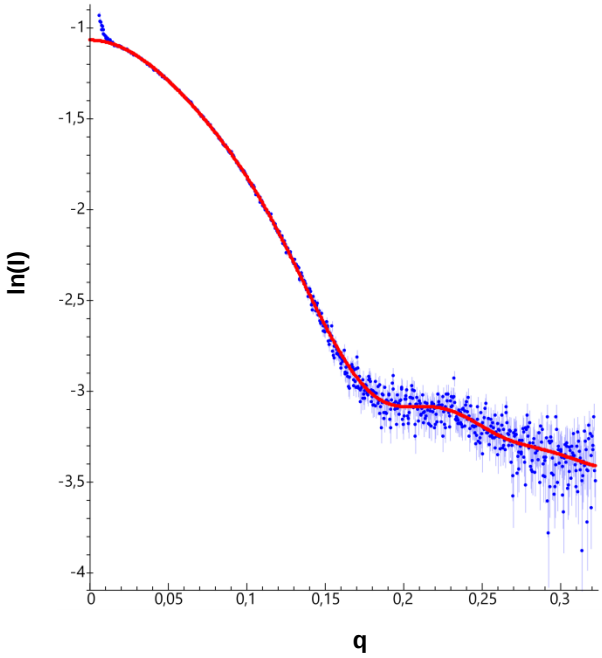

Рисунок 4.9 – Кривая рассеяния субстрата по данным МУРР в

логарифмической шкале

4.4.1 Определение инвариантов

Усреднение кривых рассеяния проводилось в программе PRIMUS. Для определения структурных инвариантов был проведен анализ областей Гинье и Кратки, которые представлена на рисунке 4.10.

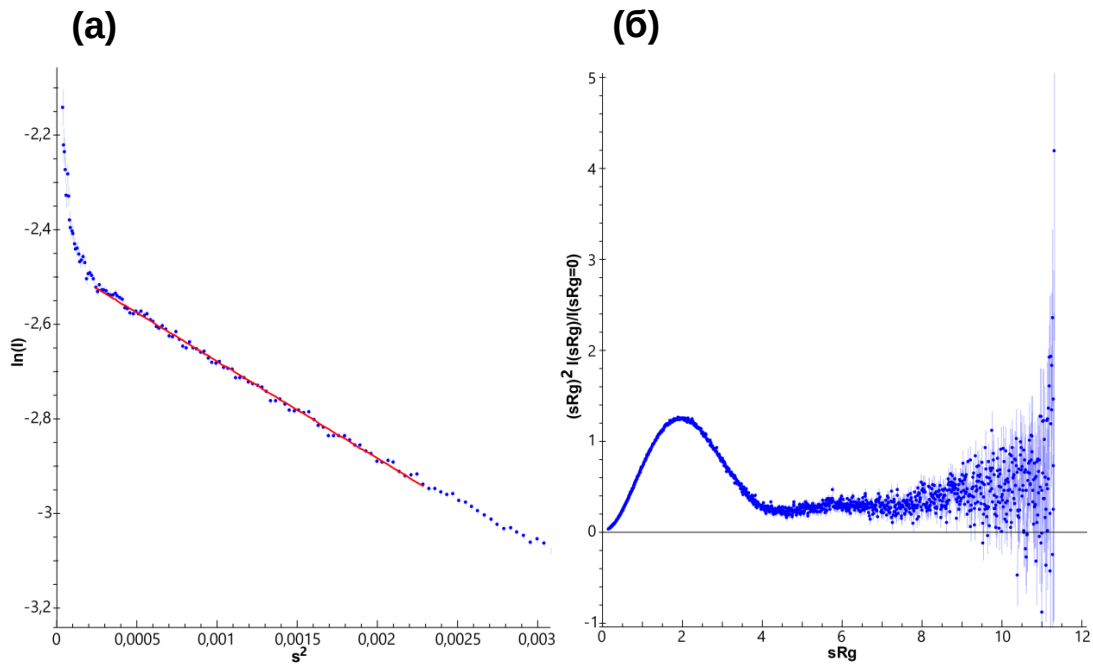

Рисунок 4.10 – Аппроксимация Гинье (а); график Кратки (б)

График Гинье является линейным, что демонстрирует монодисперсность раствора. График Кратки имеет куполообразную форму, это означает, что белок имеет глобулярную форму. Такой вид аппроксимации Гинье и графика Кратки свидетельствуют о том, что применение математического аппарата в обработке данных является уместным и можно работать в данных приближениях.

Рассчитанные инварианты (радиус гирации R_g, объем V и молекулярная масса M) на основе аппроксимации Гинье и Кратки представлены таблице 1.

Таблица 1 – Рассчитанные инварианты белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus*

R_g, Å	V, $Å^3$	M, кДа
24,83 ± 0,08	56573	34,2

4.4.2 Анализ функции пар расстояний

На основе данных была построена функция распределения пар расстояний (рисунок 4.11), максимальный диаметр при этом составлял D_{max}=98 Å, что согласуется с полученными данными по ДРС.

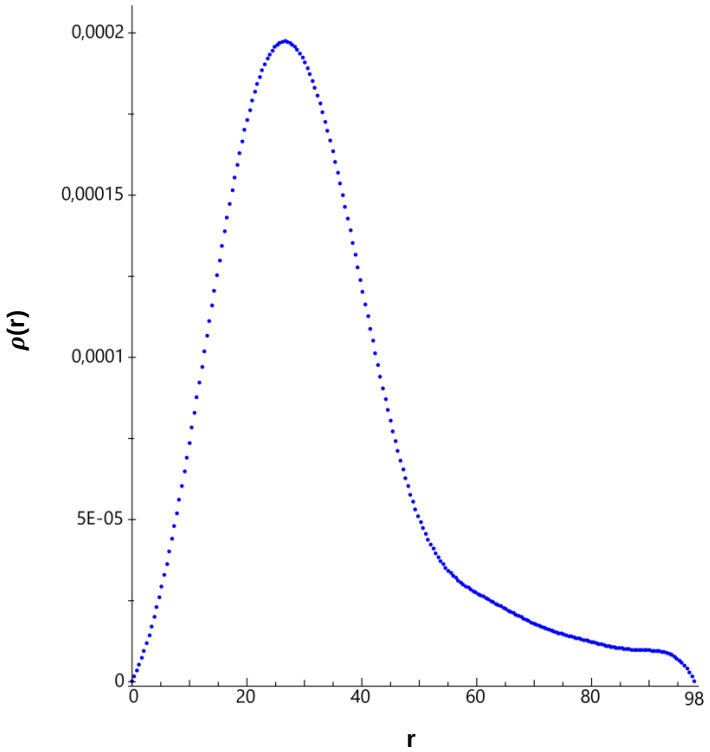

Рисунок 4.11 – Функция пар расстояний

Данный график имеет куполообразный вид, что свидетельствует о том, что белок структурирован, имеет слегка вытянутую глобулярную (эллипсообразную) форму. Полученный образец белка 17β-ГСД 5-го типа из

Mus musculus стабилен во времени (не образует конгломератов и не денатурирует).

4.4.3 Получение и анализ формы электронной плотности

Для восстановления формы электронной плотности исследуемого белка был использован *ab initio* метод, который основан на поиске глобального минимума (метод «имитации отжига»). Метод был предложен в работе [16].

Расчет формы электронной плотности был произведен в программном пакете DAMMIN [17]. Результат представлен на рисунке 4.12.

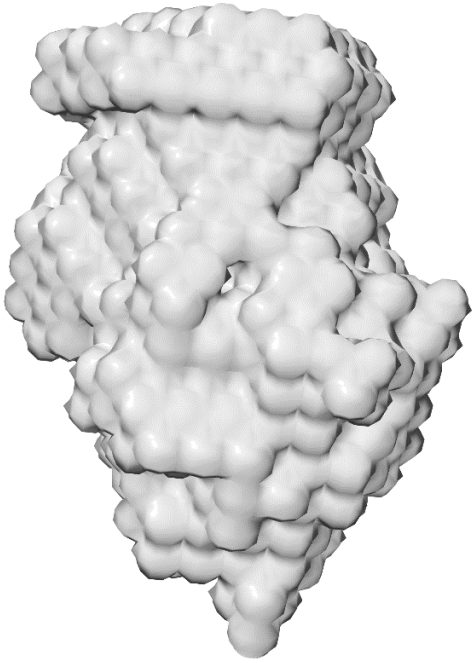

Рисунок 4.12 – Результат расчетов электронной плотности

Для дальнейшей интерпретации полученных данных было произведено сопоставление структур рассчитанной электронной плотности и предсказанной структуры из базы данных AlphaFold (рисунки 4.13, 4.14). Для графического отображения и визуализации структур была использована программа Chimera [18].

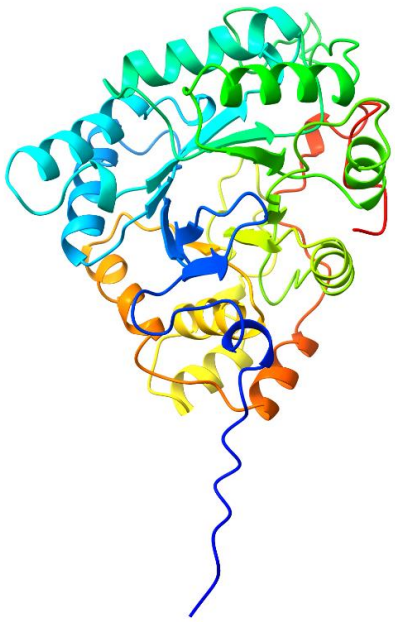

Рисунок 4.13 – Структура белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus*, полученная из базы данных AlphaFold

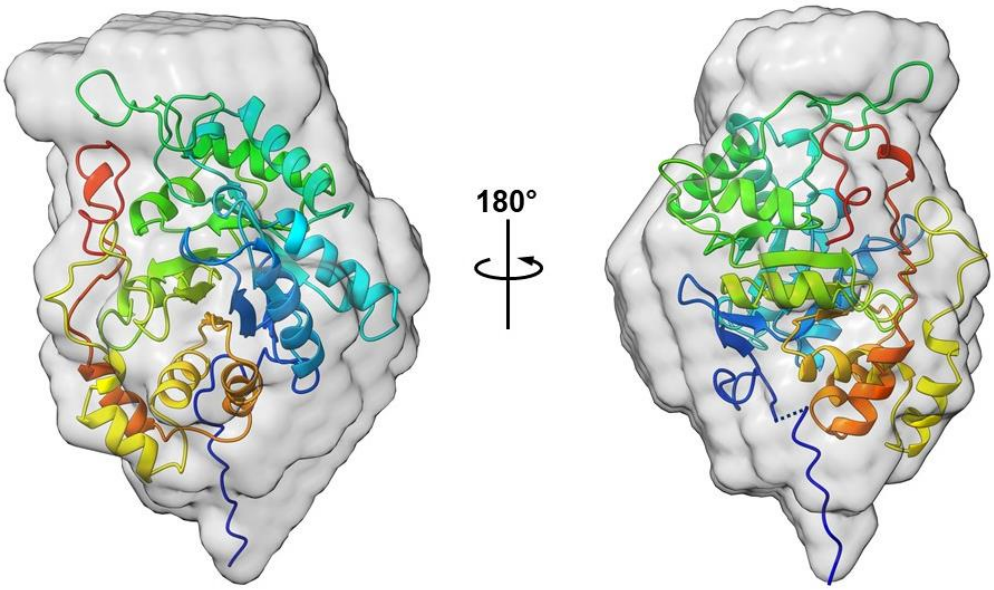

Рисунок 4.14 – Сопоставление структур

Полученная плотность сопоставляется с предсказанной структурой, что свидетельствует о том, что белок находится в растворе в виде мономера, не образует димерных форм и имеет глобулярную структуру. Таким образом, данный образец может быть использован для дальнейших структурных исследований методами рентгеноструктурного анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были получены следующие результаты:

- Выделен белок 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* и очищен при помощи аффинной и гель-фильтрационной хроматографии;
- Гомогенность и стабильность образца были оценены при помощи метода динамического рассеяния света;
- На основе данных эксперимента по малоугловому рентгеновскому рассеянию были получены структурные параметры (радиус гирации, объем и молекулярная масса), а также построена карта электронной плотности белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus*.

На основе полученных результатов сделан вывод:

Анализ данных МУРР показывает, что белок структурирован, имеет слегка вытянутую глобулярную (эллипсообразную) форму. Полученный образец белка 17β-ГСД 5-го типа из *Mus musculus* стабилен во времени (не образует конгломератов и не денатурирует). Таким образом, образец может быть использован для дальнейших структурных исследований методами рентгеноструктурного анализа.

Публикации по теме исследования

1) Егорова П. В. Оптимизация протокола экспрессии и очистки мышиной 17β-гидроксистероиддегидрогеназы 5-го типа / П.В. Егорова, А.Д. Биктимиров, В.Е. Гонялин, Н.С. Гараева, М.М. Юсупов, К.С. Усачев // Сборник тезисов XXIII Зимней молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии Петербургского института ядерной физики имени Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Гатчина, 26 февраля - 2 марта 2024)

2) Егорова П.В. Поиск условий кристаллизаций белка 17β-гидроксистероиддегидрогеназы 5-го типа мышей для структурных исследований методом рентгеноструктурного анализа / П.В. Егорова, В.Е. Гонялин, Н.С. Гараева, М.М. Юсупов, К.С. Усачев // Сборник научных статей Казанского федерального университета 2024 года [В печати].

Список литературы

1) Молашенко Н. В. Случай дефицита 17β-гидроксистероиддегидрогеназы 3-го типа в практике взрослого эндокринолога / Н.В. Молашенко, Н.Ю. Калинченко, В.А. Иоутси // Ожирение и метаболизм. – 2023. – Т. 20. – №. 1. – С. 73-83.

2) Häggström M. Diagram of the pathways of human steroidogenesis / M. Häggström, D. Richfield // Wikijournal of Medicine. – 2014. – №1. – С. 1-5.

3) Labrie F. The key role of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology / F. Labrie и др. //Steroids. – 1997. – Т. 62. – №. 1. – С. 148-158.

4) Luu-The V. Type 5 17β-hydroxysteroid dehydrogenase: its role in the formation of androgens in women /V. Luu-The и др. //Molecular and Cellular Endocrinology. – 2001. – Т. 171. – №. 1-2. – С. 77-82.

5) Berne B. J. Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. / B.J. Berne, R. Pecora // Courier Corporation – 2000.

6) Сердюк И. Н. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: в 2 т. Т. 1 / И. Н. Сердюк, Н. Заккаи, Д. Заккаи // М.: КДУ. – 2009, 568 с.

7) Сердюк И. Н. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: в 2 т. Т. 2 / И.Н. Сердюк, Н. Заккаи, Д. Заккаи // М.: КДУ. – 2009, 736 с.

8) Гараева Н.С. Структурно-функциональный анализ факторов созревания рибосомы M (RimM) и P (RimP) патогенной бактерии Staphylococcus aureus по данным малоуглового рентгеновского рассеяния, спектроскопии ЯМР и ЭПР, и криогенной просвечивающей электронной микроскопии: дис. канд. физ.-мат. наук: 1.5.2. - Казань, 2024. - 166 с.

9) Debye, P. Scattering by an inhomogeneous solid / P. Debye, A. M. Bueche// J. Appl. Phys. – 1949. – Т.20. – С. 518–525.

10) Debye P. Scattering by an inhomogeneous solid the correlation function and its application / P. Debye, H. R. J. Anderson, H. Brumberger // Journal of Applied Physics. – 1957. – T.28. – C. 679–683.

11) Porod G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden / G. Porod, Z. Kolloid // Systemen. – 1951. – T.124. – C.83

12) Chacon P. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm / P. Chacon, F. Moran, J.F. Diaz и др. // Biophys.J. –1998 – № 74 – C. 2760-75.

13) Hilborn E. Estrogen and androgen-converting enzymes 17β-hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: with a special focus on 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer / E. Hillborn, O. Stål, A. Jansson // Oncotarget. – 2017. – T. 8. – №. 18. – C. 30552.

14) Varadi M. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models / M. Varadi // Nucleic Acids Research. – 2021. – T.50. – C.439-444.

15) Konarev P.V. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis / P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova и др. // Journal of Applied Crystallography. – 2003. – T. 36. – №. 5. – C. 1277-1282.

16) Chacon P. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm / P. Chacon, F. Moran, J.F. Diaz и др. // Biophys.J. – 1998 – № 74 – C. 2760-75.

17) Svergun D.I. Ab initio shape determination by simulated annealing using a single phase dummy atom model / D.I. Svergun, M. Kozin, M. Petoukhov, V. Volkov // Biophys. J. – 1999. – T. 76. – C. 2879-2886.

18) Pettersen, E.F. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers/ E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang и др. // Protein Sci. – 2021. – T.30. – C. 70–82.

Приложение

В данной работе были использованы следующие буферы, питательные среды, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Используемые в работе буферы, питательные среды

Название	Компоненты
Питательная среда LB	Триптон 1%, NaCl 1%, дрожжевой экстракт 0,5%
Питательная среда 2xYT	Триптон 1%, NaCl 1%, дрожжевой экстракт 1%
Агаризованная питательная среда LB	Триптон 1%, NaCl 1%, дрожжевой экстракт 0,5%, агар 1%
Буфер CRB	50мМ Tris-HCl pH=7,8, 300мМ NaCl, 0,5мМ EDTA, 20% Glycerol, 2мМ 2-mercaptoethanol
Буфер CRB GF	50мМ Tris-HCl pH=7,8, 350мМ NaCl, 0,5мМ EDTA, 20% Glycerol, 2мМ 2-mercaptoethanol
Элюирующий буфер	50мМ Tris-HCl pH=7,8, 300мМ NaCl, 500мМ Imidazole, 0,5мМ EDTA, 20% Glycerol, 2мМ 2-mercaptoethanol
Буфер TGB	Tris-HCl 25мМ, Glycine 250мМ, SDS (доцетилсульфат) 0,1%