

AZ NDST3 HEPARÁN SZULFÁT BIOSZINTÉZIS ENZIM BIOKÉMIAI VIZSGÁLATA

IVÁN Réka Boglárka^{1,2}, Dr. NAGY Gergely Nándor^{1,2}

¹HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Élettudományi Intézet, cím: 1117, Budapest, Magyar Tudósok Körútja 2.,

²Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, cím: 1111, Budapest, Műegyetem rakpart 1.



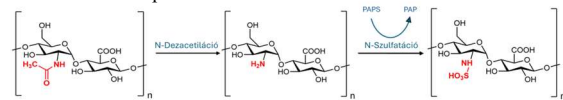
BEVEZETÉS



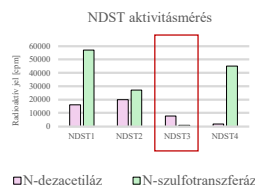
A heparán szulfátok a sejtfelületen található proteoglikánok részeként a szerkezetben általánosan jelen vannak, ugyanakkor szövetspecifikus mintázattal rendelkeznek. Fontos szereppel bírnak számos folyamatban¹:

- Receptor jelátvitel
- Patogének dokkolása
- Kemokin gradiens kialakítása
- Tumor sejtek vándorlása
- Sejt-Sejt közötti kommunikáció
- Extracelluláris mátrix komponens
- Rendkívül változatos cukorlánc módosításokkal rendelkeznek, ezek határozzák meg biológiai szerepüket is¹.

A heparán szulfát lánc polimerizációját követően az első cukormódosítási lépést az N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz 1-4 (NDST1-4) izoenzimek katalizálják. Az általuk kialakított szulfatációs mintázat határozza meg a bioszintézis további lépéseit¹.



Mindenkizoenzim más módosítási mintázatot alakít ki, más szereppel bír². Az NDST3 elsősorban az agyban és a fejlődés során termelődik. Rendellenes működése esetén neurodegeneratív megbetegedések léphetnek fel³.



KUTATÁSI KÉRDÉS



Mi állhat az NDST3 alacsonyabb N-szulfotranszferáz aktivitásának hátterében?

Szükségünk van egy **STABIL ÉS AKTÍV** fehérjére.
Módszerfejlesztés a fehérje tervezésére, termelésére, és tisztítására
Enzim aktivitásának jellemzése

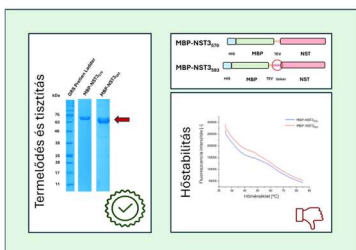
EREDMÉNYEK



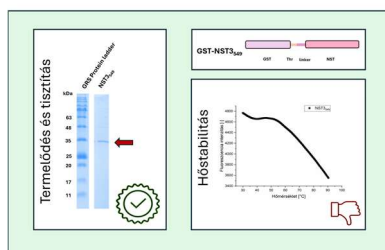
Fehérje termelése és tisztítása

KIPRÓBÁLT FÜZIÓS FEHÉRJÉK ÉS KONSTRUKTHATÁROK

MBP-NDST3 konstruktok

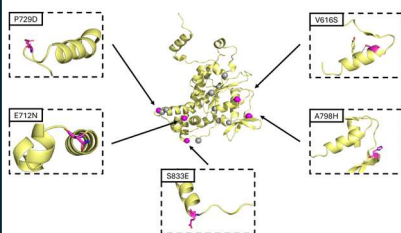


GST-NDST3 konstruktok



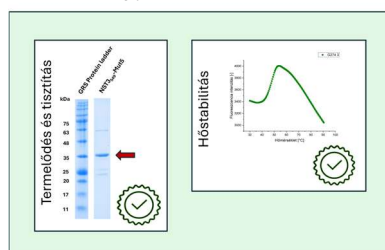
Előny: affinitás kromatográfiás tisztítás közben hasítható GST fúziós fehérje

HÖSTABILIZÁLÓ MUTÁCIÓK TERVEZÉSE



PROSS szerver által javasolt hőstabilizáló mutációk
Fontos szempont: ne befolyásolja az aktivitást

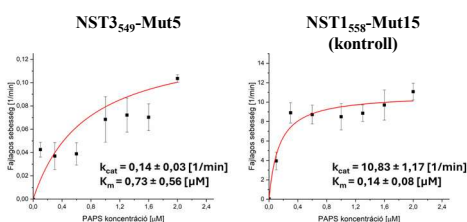
GST-NDST3₅₄₉-Mut5 konstruktok



Stabil fehérje, ami alkalmas további vizsgálatokra.

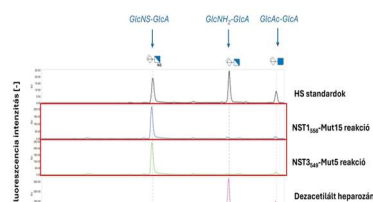
Enzimaktivitás vizsgálatok

KAPCSOLT FLUORIMETRIÁS ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS



Irodalomnak megfelelő aktivitáskülönbség NDST1/3 között. NDST3-Mut5 aktivitással rendelkezik.

REAKCIÓTERMÉK DISZACHARID ELEMZÉS

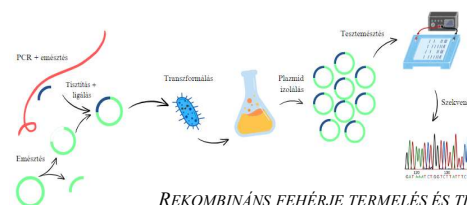


NDST3₅₄₉-Mut5 és NDST1₅₅₈-Mut15 a dezacetilált heparozán láncon (szubsztrát) az összes glükózamin egységet szulfatálta. Ezzel szemben a teljes NDST enzimek különböző N-szulfát mintázatokat alakítanak ki.

MÓDSZEREK



MOLEKULÁRIS KLÓNOZÁS



FEHÉRJE KONSTRUKCIÓK TERVEZÉSE

- AlphaFold3
- PROSS szerver

Evolúciós szekvenciaelemzés és szerkezetalapú modellezés kombinálásával stabilabb, jobban expresszálható fehérjeváltozatokat terveztünk⁴.

REKOMBINÁNS FEHÉRJE TERMELES ÉS TISZTÍTÁS, VALAMINT BIOKÉMIAI VIZSGÁLATOK



Thermofluorimetriás hőstabilitás mérés
Kapcsolt fluorimetriás enzimaktivitás mérés
Reakciótermék diszacharid elemzése

ÖSSZEFOGLALÁS



Módszerfejlesztés a fehérje tervezésére, termelésére, és tisztítására

- ✓ MBP és GST fúziós fehérjék kipróbálása
- ✓ Hőstabilizáló mutációk tervezése
- ✓ NDST3₅₄₉-Mut5 fehérje stabilnak bizonyult, további vizsgálatokra alkalmas

Enzimaktivitás jellemzése

- ✓ NDST3₅₄₉-Mut5 fehérje aktívnak bizonyult
- ✓ NDST1/3 fehérjék aktivitására az irodalomnak megfelelő arányt kaptunk.
- ✓ A reakciótermék vizsgálata során kimutattuk, hogy az NDST1₅₅₈-Mut15 és NDST3₅₄₉-Mut5 fehérjék a teljes dezacetilált heparozán láncot átalakították

HIVATKOZÁSOK

1. T. Anna et al, Molecules, vol. 25, no. 18, 2020
2. J. Aikawa et al, Biol. Chem., vol. 276, no. 8, 2001
3. T. Lencz et al., Nat. Commun., vol. 4, 2013
4. J. J. Weinstein et al, Bioinformatics, vol. 37, 2021

A kutatási projekt az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült.

