



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIA ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK

Az NDST3 heparán szulfát bioszintézis enzim N-szulfotranszferáz doménjének előállítása és biokémiai vizsgálata

Készítette:

Iván Réka Boglárka

Biomérnök BSc IV. évfolyam

TDK dolgozat 2024

Témavezető:

Dr. Nagy Gergely Nándor

Tanársegéd, BME VBK ABÉT



Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani *Prof. Dr. Vértessy G. Beátának*, hogy lehetővé tette, hogy a kutatócsoportjába csatlakozhassak, és tanácsaival támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Nagy Gergely Nándornak*, a sok ismeretért, amit segítségével elsajátíthattam. Köszönöm az ösztönző szavakat, a sok időt, segítséget, és türelmet, amit tőle kaptam.

Hálás vagyok a kutatócsoportom tagjaiért, akik a laborban folyó munkám során mindig segítségemre voltak, bármilyen kérdésem merült fel, és támogató tanácsokkal láttak el.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Tartalomjegyzék.....	3
Rövidítésjegyzék	6
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. A sejtfelszíni proteoglikánok	9
2.2. A heparán szulfát és a heparin.....	10
2.2.1. Biológiai jelentősége	10
2.2.2. Szerkezet és bioszintézis	11
2.3. N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz enzimek.....	12
2.3.1. NDST enzimek szerepe a heparán szulfát bioszintézisben	12
2.3.2. NDST3 biológiai jelentősége	14
2.4. NDST enzimek szerkezeti vizsgálatai.....	15
2.4.1. Teljes lumenális NDST szerkezete	15
2.4.2. NST domén szerkezete	16
2.4.3. Az NST1 és NST3 HS kötőhely különbségei	16
2.4.4. Hőstabil NST létrehozása fehérjemérnökséggel	17
3. Célkitűzések	18
4. Kísérletek és módszerek.....	19
4.1. Molekuláris klónozás	19
4.1.1. Polimeráz láncreakció (PCR).....	20
4.1.2. Agaróz gélelektroforézis	20

4.1.3.	Restrikciós endonukleáz emésztés	21
4.1.4.	Ligálás	21
4.1.5.	Transzformálás	22
4.1.6.	Plazmid izolálás.....	22
4.2.	Fehérjetermelés és tisztítás.....	23
4.2.1.	Fehérjetermelés	23
4.2.2.	Sejtfeltárás	24
4.2.3.	Nikkel affinitás kromatográfia	24
4.2.4.	Glutation affinitás kromatográfia	25
4.2.5.	Heparin affinitás kromatográfia	26
4.2.6.	Dialízis	26
4.2.7.	Töményítés és fagyasztás	26
4.3.	Fehérje vizsgálati módszerek	27
4.3.1.	Nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	27
4.3.2.	Termofluorimetriás hőstabilitás mérés	27
4.3.3.	Enzimaktivitás mérés	29
5.	Eredmények és értékelésük	31
5.1.	N-szulfotranszferáz fehérjék előállítása és vizsgálata.....	31
5.1.1.	MBP-NST3 fúziós fehérjék tervezése	31
5.1.2.	MBP-NST3 fehérjék termelése és tisztítása.....	33
5.1.3.	MBP-NST3 fehérjék vizsgálata	34
5.1.4.	Hőstabilizált NST3 fehérje tervezése	37
5.1.5.	GST-NST3 és GST-NST1 fehérjék előállítása	40

5.1.6.	NST3 és NST1 fehérjék vizsgálata	43
5.2.	Enzimaktivitás vizsgálatok.....	46
5.2.1.	Enzimaktivitás mérés elve.....	46
5.2.2.	Arilszulfotranszferáz segédenzim kiválasztása	48
5.2.3.	N-szulfotranszferáz konstrukciók enzimaktivitás vizsgálata	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.2.4.	Kollaborációs partnereink NST reakció termékének diszacharid analízise	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
6.	Összefoglalás.....	54
6.1.	Módszerfejlesztés az NST3 domén rekombináns előállítására	54
6.2.	NST3/NST1 szulfotranszferázok előzetes összehasonlító vizsgálata	55
6.3.	További kutatási tervek	56
	Irodalomjegyzék.....	57
	Függelék.....	61
	F1 Molekuláris klónozáshoz használt oligonukleotidok	61
	F2 Termelt fehérjék aminosav szekvenciái	61
	F2.1. MBP-NST3 ₅₇₀	61
	F2.2. MBP-NST3 ₅₉₃	62
	F2.3. GST-NST1 ₅₅₈ -Mut15	62
	F2.4. GST-NST3 ₅₄₉ -Mut5	63
	F2.5. GST-NST3 ₅₄₉	63
	F2.6. SUL1A1 K65E/R68G.....	63
	F2.7. MBP-ASTIV-Mut35	64

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Teljes név
4-MU	4-metil-umbelliferon
4-MUS	4-metil-umbelliferil-szulfát
CBM	szénhidrátkötő domén
DTT	1,4-ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GAG	glükózaminoglikán
GST	glutation-S-transzferáz
Hep	heparin
HS	heparán szulfát
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani tápoldat
MBP	maltózkötő fehérje
Ndáz	N-Dezacetiláz domén
NDST	N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz
NST	N-Szulfotranszferáz domén
OD	optikai denzitás
PAP	5'-foszfoadenozil-3'-foszfát
PAPS	5'-foszfoadenozil-3'-foszfoszulfát

PCR	polimeráz láncreakció
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TAE puffer	Tris-Ecetsav-EDTA puffer
TEV	tobacco etch virus
WT	vad típus

1. Bevezetés

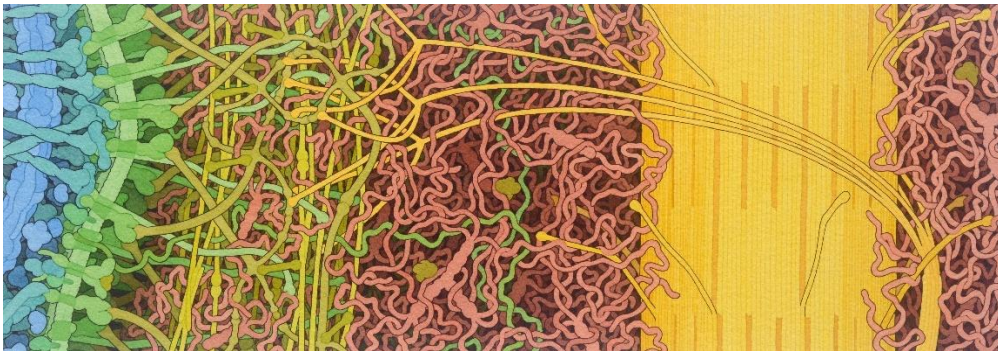
A heparán szulfátok (HS) lineáris sejtfelszíni poliszacharidok, melyek fontos szereppel bírnak számos biológiai folyamatban, beleértve a sejtek közötti kommunikációt, sejtfelszíni jelátvitelt, kötőszöveti mátrix stabilitást, valamint patogén-gazdasejt kölcsönhatásokat. A HS lánc molekuláris kölcsönhatásait döntően befolyásolja negatív töltésmintázata, melyet glükuronsav/iduronsav egységein túl változatos szulfát módosításai határoznak meg. A szulfatáció kialakítását a HS lánc polimerizációját követően a bifunkciós N-dezacetiláz-N-szulfotranszferáz (NDST) enzimek kezdik meg, a glükózamin egységek N-dezacetilációja és szulfatációja révén. Ezen módosítások azonban nem egységesek a HS lánc mentén, emiatt a négy humán NDST izoenzim (NDST1-4) eltérő glükózamin mintázatokat alakít ki. Mivel az NDST enzimátikus módosítások templátként szolgálnak a további HS szulfatációt és epimerizációt katalizáló enzimek számára, az NDST izoenzimek működése alapvetően határozza meg az érett HS szerkezetét és kölcsönhatásait. Az idegszövetekben kifejeződő NDST3 a többi NDST izoenzimhez képest kisebb szulfotranszferáz aktivitással rendelkezik, ennek molekuláris háttere az NDST3 részletes enzimátikus jellemzése híján azonban jelenleg nem tisztázott.

Kutatómunkám célja az NDST3 enzim egyedi szulfotranszferáz aktivitásának jellemzése volt. Ehhez irodalmi és fehérjemérnökségi megfontolások alapján kialakítottam egy olyan módszer folyamatot, mely révén hőstabil és enzimátikusan aktív NDST szulfotranszferáz domén fehérje konstrukciókat tudtam rekombinánsan termelni *E. coli* expressziós rendszerben. A sikeres fehérjetermeléshez megvizsgáltam az alkalmazott fehérje domén határokat, azonosítottam a fehérje termelést és tisztítást legjobban elősegítő fúziós fehérje konstrukciót, valamint optimalizáltam a fehérje előállítás folyamatát. A módszerrel előállítottam az NDST3 és az NDST1 szulfotranszferáz fehérjéket, és egy fluorimetriás csatolt enzim esszé alkalmazásával jellemeztem az NDST3 izoenzim NDST1-nél kisebb szulfotranszferáz enzimátikus aktivitását. Összességében a fehérjetermelés és enzimaktivitás módszerek optimalizálása révén munkám egy kísérletes rendszert alapoz meg az NDST1-4 enzimek szulfotranszferáz aktivitásának összehasonlító jellemzésére, mely hozzásegíthet ezen izoenzimek eltérő működésének és HS bioszintézisben betöltött szerepének értelmezéséhez.

2. Irodalomi áttekintés

2.1. A sejtfelszíni proteoglikánok

Az eukarióta sejtekben az egyik fontos poszttranszlációs módosítás a glikoziláció. A fehérje és cukor molekulák összekapcsolódásával kialakult szerkezet biológiai funkcióját sok esetben alapvetően a fehérje rész határozza meg, ekkor beszélhetünk glikoproteinekről. Azonban egyes esetekben ez pont fordítva történik: a proteoglikánok esetén a fehérjékhez kapcsolódó glükózaminoglikán (GAG) poliszacharid láncok a meghatározó funkciót betöltő egységek. [1] A sejtfelszínen található proteoglikán réteg, valamint az extracelluláris térben oldott állapotban jelen levő proteoglikánok számos biológiai folyamatban vesznek részt (1. ábra). [2] Ezen összetett molekulák hatását a GAG poliszacharid láncok igen változatos szerkezete határozza meg. [3] A glükózaminoglikán láncok összetétele rendkívül szabályozott, minden szövetre más jellemzőkkel bír, azonban a cukor lánc sokszínű felépítését nem kódolja közvetlenül a genom, mint a fehérjék esetében. [4] Akkor mégis hogyan lehetséges, hogy ennyire specifikus legyen a szerkezetük? A válasz a glükózaminoglikánok bioszintézisében rejtőzhet. [5] A GAG molekulák közül a heparán szulfátot és a heparint fogom bővebben bemutatni.



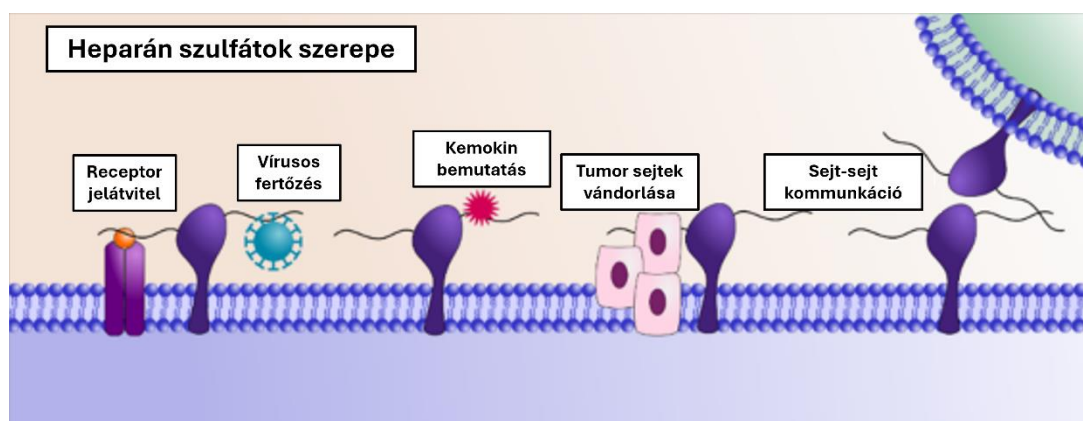
1. ábra: Az extracelluláris mátrix sematikus keresztmetszeti illusztrációja, ahol a rózsaszín molekulák reprezentálják a sejtfelszíni proteoglikánokat. Forrás: D. S. Goodsell, *The Machinery of Life* (2009).

2.2. A heparán szulfát és a heparin

2.2.1. Biológiai jelentősége

A heparán szulfát és a vele rokon szerkezetű heparin egyazon bioszintézis útvonalon keletkezik a humán szervezetben, azonban poliszacharid láncösszetételükben, valamint szulfatáció és epimerizáció módosítási mintázatukban eltérnek egymástól, mely különböző biológiai szerepüket is meghatározza. [6]

A heparán szulfát legtöbbször a sejtfelszínen található proteoglikánok részeként a szervezetben általánosan jelen van, ugyanakkor szövetspecifikus mintázattal rendelkezik. [4] Különböző fehérjékkel reagálhat, megváltoztatva azok konformációját, patogének sejtfelszíni dokkolásához biztosít helyeket [7], valamint szerepe van a sejtek közötti kommunikációban is. [8] A heparán szulfát többek között a növekedési faktor/receptor komplexek kialakításában vesz részt [9], valamint a kemokin gradiens létrehozásában, ezáltal befolyásolva a sejtek kemotaktikus mozgását (2. ábra). [10], [11]



2. ábra: A heparán szulfátok biológiai jelentősége. Az ábra Annaei és mtsai. 2020 tanulmány 1. ábrája alapján készült. [3]

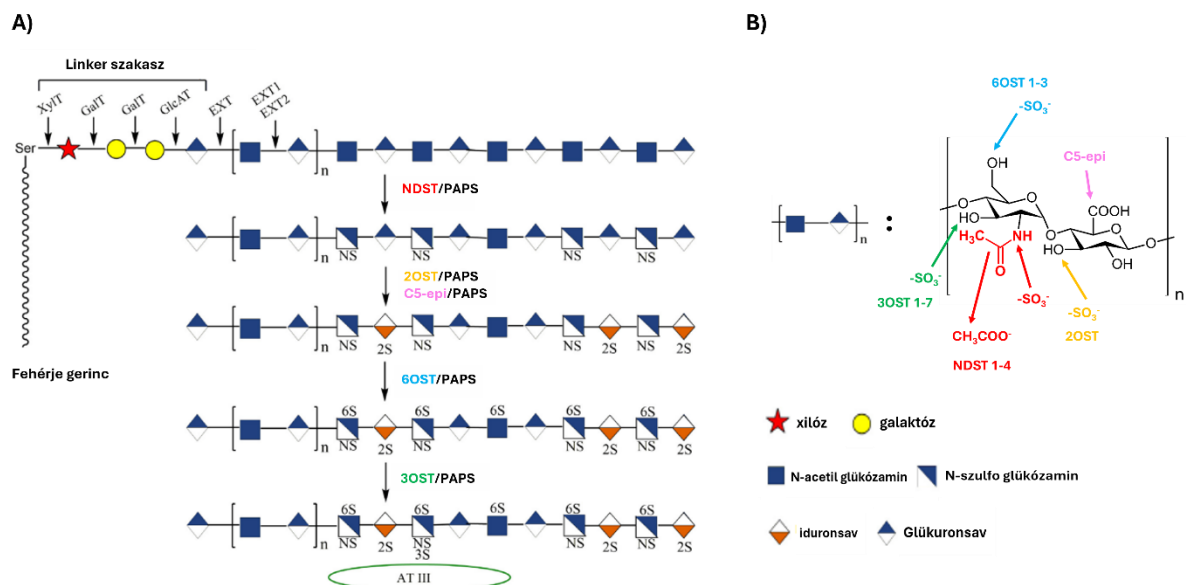
A heparint az immunrendszer hízósejtjei állítják elő, és a gyulladás vagy sérülés helyén felszabadítják, megelőzve ezzel a vérrögképződést. [12] A heparin fontos gyógyszerhatóanyag véralvadásgátló szerekben. A mai napig sertés bélnyálkahártyából nyerik ki, azonban ez gyakran nem a legmegfelelőbb, számos mellékhatása és lehetséges szennyeződései miatt. [13] Egy szintetikus alternatívája a heparinnak egy olyan pentaszacharid (Fondaparinux), ami a heparin véralvadásért felelős epitópja, mely a teljes hosszúságú heparinnál jelentősen kisebb trombocitopénia mellékhatással rendelkezik. Manapság ezt az útvonalat nem látják megfelelő alternatívának a kutatók, ugyanis a szintetikus gyógyszer maga is csökkenti a vérlemezkék

számát a betegek szervezetében. [14] Jó megközelítés lehet azonban erre a problémára a heparin biotechnológiai úton való előállítása: erre már kifejlesztettek kemoenzimátikus ipari előállításokat [15], azonban még nem tudták a bioszintézis összes lépését enzimek katalizálta reakciók révén megvalósítani. [16] Ezen kutatások előrehaladásában, valamint a heparán szulfát láncok mintázatának megértésében is fontos lehet a bioszintézis enzimeinek megfelelő ismerete.

2.2.2. Szerkezet és bioszintézis

A heparán szulfát (HS) és a heparin (Hep) glükózaminoglikánok diszacharid egységekből épülnek fel, melyek glükózamin, valamint hexuronsav (glükuronsav vagy iduronsav) monomereket tartalmaznak. A molekula cukorlánc módosításai, melyek a bioszintézis folyamán alakulnak ki szabályozott módon, igen változatosak lehetnek (3. ábra/B). [3]

A HS és Hep bioszintézise során a legtöbb enzim a Golgi apparátus falához kötve dolgozik. A fehérjegerincet adó molekula specifikus aminosavak mellett elhelyezkedő szerin oldalláncához kötődik az első monoszacharid. [17] Elsőként a négy cukorból álló linker szakasz alakul ki: először egy xilóz, majd ahhoz további két galaktóz kapcsolódik. Ezeket a reakciókat xilozil- és galaktozil-transzferázok (XylT, GalT) végzik. A linker szakaszt egy glükuronsav zárja, amit a glükuronsav-T1-transzferáz (GlcAT) enzim illeszt a linker szakaszra. Ezt a láncpolimerizáció lépés követi, melynek során az első N-acetilglükózamin kötődését az EXT glikoziltranszferáz enzimcsalád katalizálja, majd az EXT1-EXT2 enzimkomplex munkája során alakul ki a hosszú, alternáló N-acetilglükózamin-glükuronsav diszacharid szerkezetű cukorlánc, az úgynevezett heparozán (3. ábra/A). [6], [18] A polimerizációt követően a HS lánc első módosításait az N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz (NDST) enzimek végzik, melyeket további C5-epimeráz (C5-epi) enzim által katalizált glükuronsav→iduronsav cukor-izomerizáció, illetve a heparán szulfát O-szulfotranszferáz (2-,3-,6-OST) enzimek megfelelő cukor szulfatáció módosításai követnek (3. ábra/B). [6]

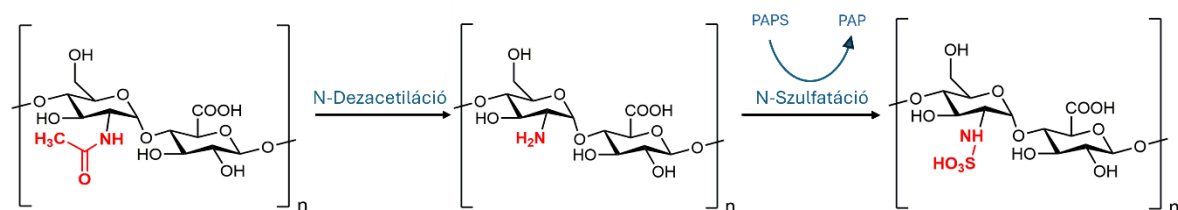


3. ábra: A heparán szulfát (HS) és heparin (Hep) bioszintézise. A) HS és Hep bioszintézisének lépései, a cukor szimbólumok a Symbol Nomenclature for Glycans egységesített megjelenítési formái (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfq.html>). B) HS diszaharid lehetséges oldallánc módosításai. Rövidítések: XylT=xiloziltranszferáz, GalT=galaktoziltranszferáz, GlcAT=Glükuronsav-T1-transzferáz, NDST=N-Dezacetiláz/N-szulfotranszferáz 1-4 (4 izoenzim), PAPS=5'-foszfoadenozil-3'-foszfoszulfát szulfátdonor kofaktor, 2OST=2-O-szulfotranszferáz, C5-epi=C5-epimeráz, 6OST=6-O-szulfotranszferáz 1-3 (3 izoenzim), 3OST=3-O-szulfotranszferáz 1-7 (7 izoenzim), ATIII=Antitrombin III kötő szekvencia. Az ábra Baytas és mtsai. 2020 tanulmány 2. ábrája alapján készült. [6]

2.3. N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz enzimek

2.3.1. NDST enzimek szerepe a heparán szulfát bioszintézisben

A HS és Hep bioszintézis első, meghatározó cukorlánc módosítási lépését a bifunkciós N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz (NDST) enzimek katalizálják, melyek a HS polimerizáció során keletkezett (N-acetilglükózamin-glükuronsav)_n szerkezetű láncok N-acetilglükózamin egységeiről hidrolizálják az acetylsoportot, majd szulfocsoportot helyeznek a szabad glükózamin amino csoportjára, amit a 3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát (PAPS) szulfátdonor kofaktor biztosít (4. ábra). [19]



4. ábra: Az N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz enzimek által katalizált reakció

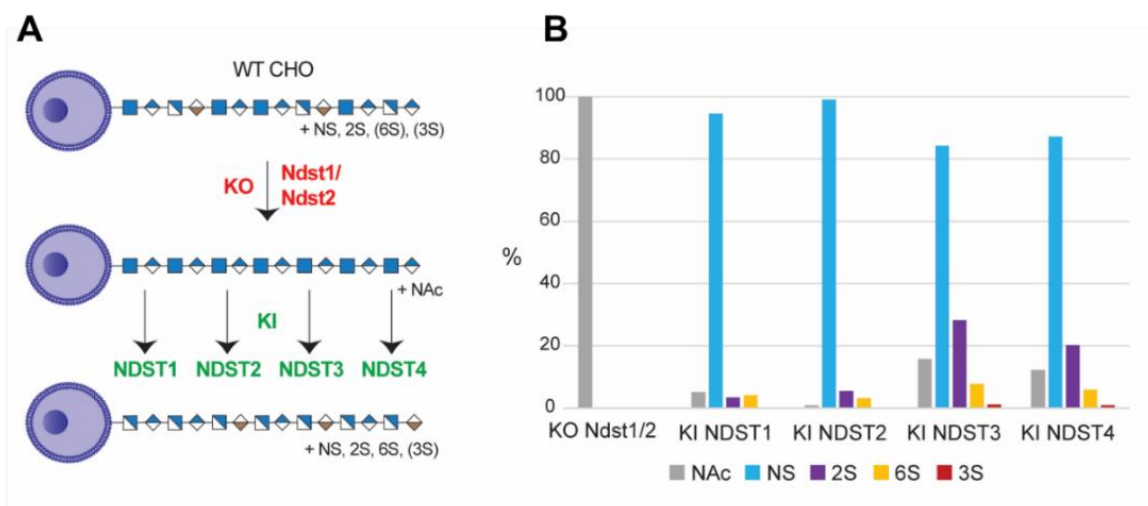
Az NDST enzim a GAG lánc nem minden diszacharid egységén végez módosítást, ezáltal kialakul egy N-acetilglükózamin / glükózamin / glükózamin-N-szulfát mintázat a HS lánc mentén. Ez a mintázat templátként szolgál a HS következő módosításait elvégző enzimek számára és így befolyásolja az érett HS/Hep szerkezeti felépítését és funkcióját. [5]

Az NDST enzimek családjába 4 izoenzim tartozik. Az emberi szervezetben általánosan jelen van az NDST1 és NDST2 izoenzim, ezek hasonlóan hatékony bifunkciós aktivitással rendelkeznek. Az NDST3 izoenzim elsősorban az agyban termelődik, és az N-szulfotranszferáz (NST) aktivitása jelentősen kisebb a többi izoenzimhez képest. Az NDST4 ehhez képest éppen ellentétesen működik: ennek az NST aktivitása jelentősebb, míg az N-dezacetiláz aktivitása alacsonyabb (1. táblázat). [20] Emiatt elképzelhető, hogy az NDST3-4 nem az eredeti poliszacharid szubsztrátot, a heparozánt alakítja át elsősorban, hanem a már korábban módosított heparán szulfátot módosítja, gyakorlatilag kiegészítve az NDST1-2 működését. [20], [21]

<i>Izoenzim</i>	<i>N-dezacetiláz aktivitás</i>	<i>N-szulfotranszferáz aktivitás</i>
mNDST1	16000±1300	57000±1900
mNDST2	20000±1400	27100±300
mNDST3	7700±1000	700±100
mNDST4	1700±100	45000±2600

1. táblázat: Az egér NDST 1-4 izoenzimeinek specifikus aktivitása Aikawa és mtsai. 2001 alapján. [20] A fehérjéket COS-7 sejtekben expresszálták. Az aktivitásokat radioaktív jelölésekkel mérték. Mértékegység cpm ± S.E.

Kollaborációs partnerünk (Dr. Rebecca Miller) egy még nem publikált kísérletében CHO sejtek vizsgálatával elemezte az NDST izoenzimek HS bioszintézisben betöltött szerepét. A CHO endogén *ndst1* és *ndst2* génjeinek kiütése után négy sejtvonalat hozott létre, melyekben génbevitel (knock-in, KI) révén az NDST1-4 izoenzimek egyikét expresszált (5. ábra/A). A négy sejtvonalt HS módosításait diszacharid elemzéssel vizsgálta. Az NDST3 jelentős 2-,6-O diszacharid szulfatáció többletet eredményezett, ami kisebb mértékben az NDST4 izoenzimet expresszáló sejtvonalt esetén is jelentkezett (5. ábra/B). Mindez meglepő annak tükrében, hogy az NDST3 és NDST4 enzimek szulfotranszferáz, illetve dezacetiláz aktivitása jelentősen elmaradt az NDST1-2 enzimekhez képest.



5. ábra: Az NDST3-4 izoenzim hatására megnövekedett 2-,6-O-szulfatáció. A) Kísérlet kivitelezésének módja. Rövidítések: WT=vad típus, KO= gén kiütés, KI= gén bevitel. B) Diszacharid analízis során kapott HS glükózamin módosítások eloszlása. Rövidítések: NAc=N-acetilglükózamin, NS=glükózamin-N-szulfát, 2S=2-O-szulfo-glükuronsav/iduronsav, 6S=6-O-szulfo-glükózamin, 3S=3-O-szulfo-glükózamin.

Ezen eredmények is alátámasztják, hogy egyes NDST izoenzimek különböző bifunkciós specificitásai jelentősen eltérő HS módosításokat eredményeznek, ami meghatározhatja a HS bioszintézisben betöltött szerepüket és biológiai jelentőségüket.

2.3.2. NDST3 biológiai jelentősége

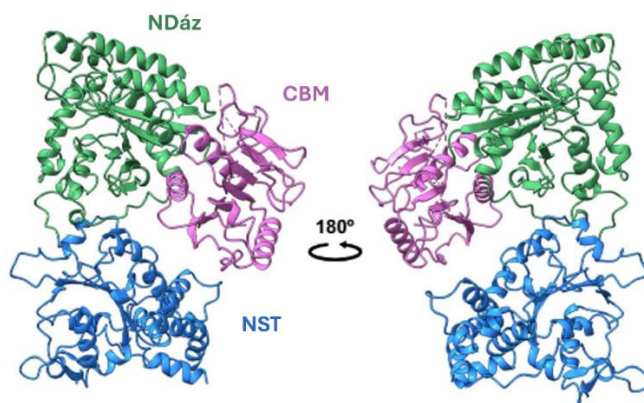
Az NDST3 izoenzim elsősorban az egyedfejlődés során, illetve agyi szövetekben termelődik. Az NDST3 knock-out egerek túléltek a genetikai módosítást, azonban viselkedésükben abnormalitásokat mutattak: elsősorban a szorongásra adott válaszreakcióik csökkentek. Ez mellett enyhe hematológias problémáik is voltak. Az NDST3 KO hatására a felnőtt egerek egyes agyi régióiban megváltozott a heparán szulfát cukorlánc módosítási mintázta, mely esetlegesen összefüggésbe hozható a viselkedésbeli rendellenességekkel. Az NDST3-nak emelett komoly jelentősége van az embrió szervi fejlődése során is, azonban, amikor csak a 3-as izoenzim hiányzik, a többi NDST enzim nagyjából helyettesíteni tudja a működését. [21] Vizsgálták az esetleges összefüggést az NDST3 és egyes neurodegeneratív betegségek között, hiszen a HS mintázat megváltozása az agyban befolyásolja annak megfelelő működését a neuroplaszticitás során. Azt tapasztalták, hogy vannak olyan szignalizációs utak, amikben a heparán szulfátok meghatározó szereppel bírnak. Ezek rendellenes működése összefügg a skizofréniával és a bipoláris zavarokkal. [22] A HS molekulák degradációját a lizoszómák végzik: ezek a sejtorganellumok nagyban hozzájárulnak a sejt megfelelő homeosztázisának fenntartásához, ugyanis számos makromolekula lebontására képesek. Amennyiben

lizosomális megbetegedés történik a szervezetben, a lebontandó molekulák aggregálódhatnak, ezáltal felborítva a sejt megfelelő működését. Az NDST3 befolyásolja a lizoszómák működését: csökkent lizosomális expressziós szintje összefüggésbe hozható az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS), és a frontotemporális demencia (FTD) neurodegeneratív betegségek kialakulásával. [23] Ahogy ezekből az eredményekből is látható, az NDST3 jelentős szereppel bír a szervezetben, elsősorban az idegszövetben, azonban ezen enzimről alkotott ismereteink igen hiányosak, mind működését, mind szerkezetét tekintve.

2.4. NDST enzimek szerkezeti vizsgálatai

2.4.1. Teljes lumenális NDST szerkezete

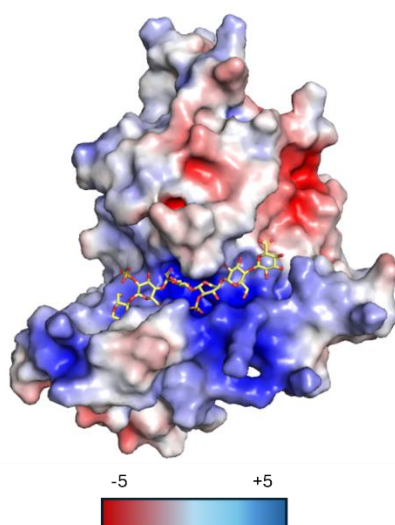
Az NDST teljes lumenális bifunkciós szerkezetéről sokáig korlátozottak voltak az ismereteink, azonban egy idei évben megjelent tanulmányban sikeresen határozták meg a bifunkciós NDST1 szerkezetét krio-elektronmikroszkópia révén. [24] Az NDST enzimek 3 doménból állnak, melyek V alakban helyezkednek el (6. ábra). Az N-terminális domén a szénhidrátkötő domén (CBM), ami önálló enzimatis funkcióval nem rendelkezik, és hozzájárulása a HS szubsztrát kötéshez jelenleg nem tisztázott. Ehhez kapcsolódik az N-dezacetiláz (NDáz) domén, ami az N-acetilglükózamin egységekről hidrolizálja az acetil csoportot, majd a harmadik molekula részlet, az N-szulfotranszferáz (NST) domén, ami a glükózamin csoportok reszulfatációját katalizálja. [24], [25]



6. ábra: NDST1 szerkezeti képe (PDB: 8CCY). Rövidítések: NDáz=N-dezacetiláz domén, CBM=Szénhidrátkötő domén, NST=N-szulfotranszferáz domén. A kép a Mycroft-West és mtsai. tanulmány 3. ábrája alapján készült. [24]

2.4.2. NST domén szerkezete

Az NDST1 N-szulfotranszferáz doménjét már korábban is vizsgálták, nagyjából 25 évvel ezelőtt. Előállították *E. coli* expressziós rendszerben és röntgendiffrakciós szerkezetét is megoldották (PDB: 1NST, 7. ábra). [26] Ebből meg tudták állapítani a PAPS és a HS kötőhelyek helyzetét. Helyspecifikus mutációkkal igazolták a PAPS kötésben és szulfotranszferáz aktivitásban kulcsfontosságú aminosavak szerepét az 1-es izoenzim esetében. [19]



7. ábra: NST1 domén kristályszerkezeti (PDB: 1NST, [26]) képe elektrosztatikus felületi megjelenítésben Pymol szoftver segítségével. A domén HS szubsztrát kötő árkanak illusztrálása céljából egy szerkezeti illesztéssel jelenítettem meg a hasonló szerkezetű heparán szulfát 3-O-szulfotranszferáz-3 (PDB: 6XL8) enzimmel ko-kristályosított HS hexaszacharidot (sárga pálca modell).

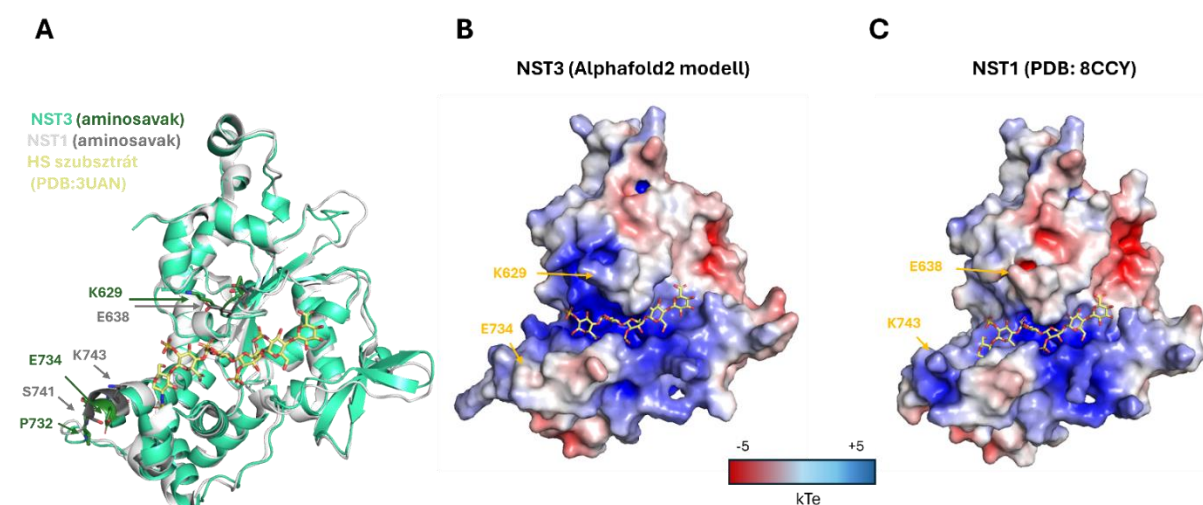
Az N-szulfotranszferáz domén hosszan elnyúló HS kötőhelye molekuladinamikai szimulációk alapján HS oktaszacharid kötésre alkalmas és számos aminosav vesz részt a kialakításában. [24] Az NDST izoenzimek különböző N-szulfotranszferáz aktivitását elsősorban ezen kötőhely változása okozhatja, hiszen a másik szubsztrát, a PAPS kötőhelye igen konzervált. [26]

2.4.3. Az NST1 és NST3 HS kötőhely különbségei

Az 1. táblázat alapján az NDST1 és 3 igen eltérő N-szulfotranszferáz aktivitással rendelkezik: az NDST1 ugyanis, az NDST2 és 4 izoenzimmal egyetemben, sokkal hatékonyabb szulfotranszferáz aktivitást mutat, mint az NDST3. [20] Az NST domén HS kötőhelyénél meglepő módon csak két, az NST1 és NST3 doménekben eltérő, lehetséges szubsztrát kötés

és katalitikus funkciót befolyásoló aminosav található, melyek a HS kötő árok két szélén helyezkednek el (8. ábra).

Az NST3 K629 ↔ NST1 E638, illetve az NST3 E734 ↔ NST1 K743 szerkezeti ekvivalens aminosavak egyaránt lokális töltés cserét okoznak (8. ábra/B,C). A szerkezeti összevetés alapján az NST3 E734 ↔ NST1 K743 aminosavak elhelyezkedését némileg befolyásolja, hogy a kettővel megelőző pozícióban (NST3 P732 ↔ NST1 S741) az NST3 egy prolint tartalmaz, mely megváltoztathatja a lokális polipeptid lánc konformációt (8. ábra/A). Ezen aminosavak aktivitásban lévő szerepe igen érdekes lehet az NST izoenzimek közötti különbségek megértésében, különösen az NST3 szokatlanul alacsony aktivitásának felderítésében.



8. ábra: Az NST1 és NST3 domének HS kötőhely aminosav különbségei. A) Az NST1 (PDB: 8CCY) és NST3 (AlphaFold2) szerkezeti modellek egymásra illesztett képe. B) Az NST3 AlphaFold2 szerkezeti modell elektrosztatikus potenciál felszíne. C) az NST1 kísérletesen megoldott szerkezet (PDB: 8CCY) elektrosztatikus potenciál felszíne. Az elektrosztatikus potenciál felszín számolást a Pymol szoftver ABPS plugin-je használatával végeztem.

2.4.4. Hőstabil NST létrehozása fehérjemérnökséggel

Az NST1 domént heparin analógok kemoenzimatis előállítására is fejlesztették: ehhez a domén hőstabilitását és enzimatis aktivitását növelő, PROSS szerver [27] által javasolt mutációkat hoztak létre. Sikeresen állítottak elő aktív NST1 enzimformákat *E. coli* bakteriális expresszió során, ami költséghatékonyasága révén előnyösnek tűnt ipari felhasználás szempontjából is. [28], [29] Az NST3 domén esetén egyelőre nincsenek ilyen jellegű kutatások.

3. Célkitűzések

Kutatásom témája a heparán szulfát molekula bioszintézisében jelentős szerepet játszó N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz (NDST) 3 enzim N-szulfotranszferáz aktivitásának jellemzése. Az ehhez szükséges vizsgálatok alapfeltétele egy, korábban még nem leírt, megfelelő feltekeredésű és enzimatikusan aktív NDST3 N-szulfotranszferáz (NST3) domén előállítása.

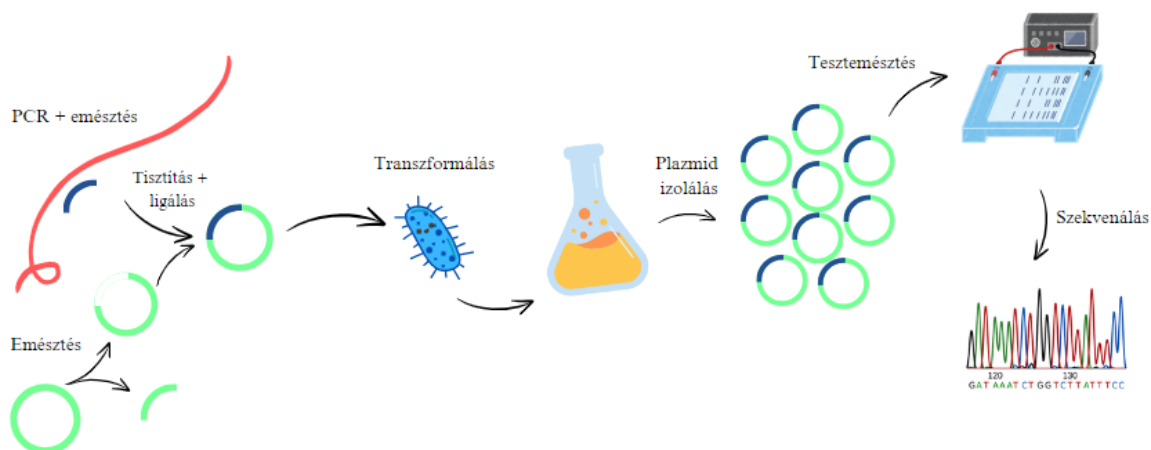
Kutatásom során az alábbi kérdésekre keresem a választ:

- Lehetséges-e fehérje termelési eljárás kialakítása az NDST3 N-szulfotranszferáz domén rekombináns előállítására *E. coli* expresszió rendszerben?
- A fehérje határok megválasztása és a fúziós fehérje címkék használata hogyan befolyásolja a fehérje termelődését és stabilitását?
- Hőstabilizációt célzó, de a szubsztrátkötést és enzimátikus hatékonyságot közvetlenül nem befolyásoló mutációk alkalmazása képes lehet korrigálni a nem megfelelő fehérje termelés, és/vagy oldatbeli stabilitás okozta szűk keresztmetszeteket a fehérje előállítás során?
- Lehetséges-e tervezett helyspecifikus mutációk beépítésével funkcionálisan vizsgálható NST3 fehérje létrehozása?

4. Kísérletek és módszerek

4.1. Molekuláris klónozás

Az általam termelni kívánt fehérjét kódoló génszakaszt tartalmazó plazmidokat molekuláris klónozás révén hoztam létre (9. ábra). Az inzertet felszaporítottam polimeráz láncreakció (PCR) segítségével, majd restriktációs endonukleáz enzim emésztés után agaróz gélből izoláltam. A vektort ugyancsak enzimekkel emésztettem, ezáltal ragadós végeket hozva létre, majd agaróz gélből tisztítottam. Az inzertet és a vektort ligáltam, majd a kész plazmidot transzformáltam a baktérium sejtekbe. Miután a baktériumokkal felszaporítottam, elválasztottam a plazmidot a sejt többi részétől. Ezt tesztelés után futattam agaróz gélen, hogy megnézzem, hogy megfelelő-e a mérete. Amennyiben a várakozásnak megfelelő méretet tapasztaltam, elküldtem Sanger szekvenálásra az adott DNS szakaszt, hogy biztos lehessen benne, hogy az általam termelni kívánt fehérje génjét sikerült létrehoznom. A továbbiakban az egyes részfolyamatokat részletesebben fejtem ki.



9. ábra: Plazmidok létrehozása molekuláris klónozással

4.1.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (PCR) során egy általunk kiválasztott DNS szakaszt tudunk sokszorozítani. A PCR reakcióhoz először primereket kell tervezni, amik rövid DNS szakaszok és nagyon specifikusan hozzá tudnak kapcsolódni a templát DNS kiválasztott szakaszához. Ezt a Snapgene program segítségével végeztem, figyelembe véve, hogy a két primer betapadási hőmérséklete hasonló legyen, illetve, hogy megfelelő hosszúságú, GC arányú legyen az adott DNS szakasz. Ellenőriztem, hogy hajtű milyen eséllyel keletkezhet a primerből, illetve, hogy egymással mennyire tapadnak össze a különböző primerek az IDT DNA Oligo Analyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) segítségével. A másik fontos folyamat a PCR reakció ciklusainak megtervezése. A ciklus a következőképpen épül fel: 98°C 15 másodperc, majd a primer betapadási hőmérsékletén (kb. 60°C) 30 másodperc, végül 72°C-on az enzim sebességétől függően nagyjából 50-100 másodperc. A 72°C-os szakasz a felszaporítandó DNS részlet hosszúságától is függ, tehát minden DNS szakaszra más. Általánosan az inzert bázispár számát kell elosztani 1300 bp/perc-el, ami az általam használt enzimnek a polimerizációs sebessége. A ciklus előtt van még egy 90 másodpercig tartó 98°C-os denaturációs szakasz, illetve a ciklus után 300 másodpercig tartó 72°C szakasz is. A PCR reakciót 200 µl PCR csövekben végeztem. Pyrobest DNS polimeráz (Takara) enzimet használtam, ebből 0,4 µl-t kell a reakcióhoz tenni. A Pyrobest pufferből 5 µl szükséges, dNTP oldatból pedig 4 µl, ami 2,5 mM dATP, dTTP, dCTP és dGTP elegye. A primerek 100 µM oldatából 0,5 µl-t tettem hozzá a reakció elegyhez, illetve a templát DNS-ből 10 ng-ot. A reakcióelegy maradék térfogatát RNáz mentes vízzel egészítettem ki, úgy, hogy 50 µl legyen az össztérfogat. A PCR reakciót egy Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler készülék használatával végeztem. A PCR reakció után Macherey-Nagel NucleSpin PCR Clean-up kit segítségével tisztítottam a terméket a gyártó útmutatása alapján.

4.1.2. Agaróz gélelektroforézis

A DNS molekula a foszfát csoportjai miatt negatív töltéssel rendelkezik, így, ha elektromos erőterbe kerül, elkezd a pozitív pólus irányába vándorolni. Ha ezek a DNS molekulák egy agaróz gélben helyezkednek el, az a térhálós szerkezete miatt akadályozza a molekulák mozgását azok méretének (és esetleg alakjának) megfelelően. A módszer segítségével meghatározhatjuk a lineáris DNS molekulák méretét, az általuk megtett elektroforetikus úthossz alapján. Az agaróz gelet úgy öntöttem meg, hogy 1%-os legyen: ez megfelelő elválasztást biztosít a kísérletek során releváns 1-5 kbp mérettartományban. Ehhez az agarózt

TAE pufferben (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,114 V/V% ecetsav, pH=7,6) oldottam. A gélhez még melegen, megdermedés előtt tettem hozzá 1:10000 hígítással a Gelred (Biotium) festéket, ami beékelődik a DNS molekulák kettős hélixébe, így azok UV fény hatására láthatóvá válnak. A mintákhoz Loading Dye festéket kevertem megfelelő hígításban: ez fogja mutatni a front vonalat a futtatás során. Viszonyítási alapként általában Generuler 1 kb plus laddert (Invitrogen) használtam. Az elektroforézist 100 V-on 60 percig végeztem. Az emésztett vektort és inzertet a gélből tisztítottam ki a Macherey-Nagel Nucleospin PCR Clean up kit segítségével a gyártó útmutatása alapján.

4.1.3. Restrikciós endonukleáz emésztés

A restrikciós endonukleáz enzimek specifikusan, egy adott szekvenciánál hasíthatják a DNS molekulánkat, gyakran aszimmetrikusan: így az egyik szál túlnyúlik, ezáltal ragadós végek képződnek. Ez azért hasznos, mert később az inzertet és a vektort sokkal egyszerűbb lesz specifikusan összeilleszteni. A Cutsmart puffert (New England Biolabs) használtam általánosan az emésztésekhez. Az enzim mennyisége és a reakciótérfogat attól függött, hogy a cél tesztelés, vagy DNS darabok preparatív elválasztása volt. Így az össztérfogat 25-70 μ l között volt, az enzim térfogata 0,5-1,5 μ l között (20 U/ml oldat), a DNS mennyisége nagyjából 300 ng teszteléshez, normál emésztéshez pedig 3-4 μ g. Ugyanez vonatkozott az emésztési időre is: a teszteléshez elég lehet akár fél óra is, míg a vektor tapadás végeinek létrehozásához szükség lehet akár egy éjszakán át tartó emésztésre is. Az enzimek 37°C-on dolgoznak ideális körülmények között, ezt asztali termosztátban vagy PCR készülékben biztosítottam.

4.1.4. Ligálás

A ligáz enzim működése során összeforrasztja a vektor és az inzert összetapadt ragadós végét, még pedig úgy, hogy összeköti az egyik molekula 5'-foszfátcsoportját a másik cukoregységének 3'-hidroxil csoportjával. A ligálás során először megterveztem a NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com>) segítségével, hogy milyen mennyiségben szükséges hozzáadni az elegyhez az inzertet és a vektort a méretük alapján, ehhez 3:1-es moláris arányt alkalmaztam. T4 DNS ligázzal (New England Biolabs) dolgoztam, és az ehhez szükséges puffert használtam. A vektorból minden esetben 50 ng-ot alkalmaztam, a ligáz enzimből 1 μ l-t (3 U/ μ l oldat), a pufferből 2 μ l-t, és az össztérfogat 20 μ l volt. A ligálást egy éjszakán át végeztem 16 °C-on.

4.1.5. Transzformálás

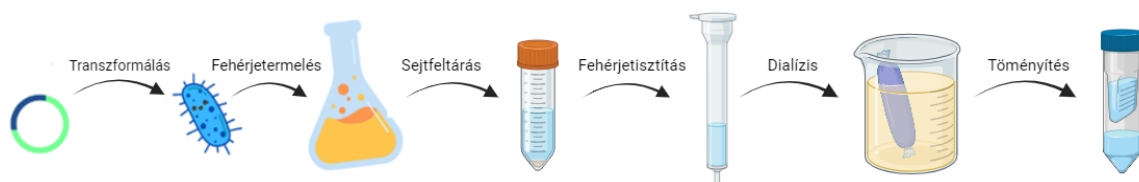
A kémiai transzformálás a plazmid DNS baktérium sejtbe juttatásának módja, mely során a DNS bejuttatásához kémiai és hőssokk hatással növelhető meg a sejtfa permeabilitása. Amennyiben a céloa a fehérjeterelés volt, az erre a célra kifejlesztett *E. coli* BL21 Rosetta vagy Origami sejteket, míg plazmid szaporítás esetén *E. coli* XL1-Blue baktérium törzset használtam. A kompetens sejtekhez 0,5-1 µl plazmid oldatot adtam (10-200 ng/µl), majd jégen tároltam 30 percig. Ezután 42°C hőssokk következett 45 másodpercig, ezután újabb 2 perc jégen. A sejtekhez 100 µl Luria-Bertani (LB) oldatot (10 g/l Tripton, 5 g/l élesztő, 0,17 M NaCl, pH=7) adtam, majd 37°C-on rázattam nagyjából 1 órát. Ezután, amennyiben én állítottam elő molekuláris klónozás révén a plazmidokat, először antibiotikus agar-LB táptalajra szélesztettem őket és 37°C-on növesztettem a telepeket egy éjszakán keresztül. Másnap inokuláltam a különböző telepeket antibiotikus (adott plazmidnak és baktérium törzsnek megfelelően) LB tápoldatokba, általában 5-10 ml-be, és szintén 37°C-on növesztettem éjszaka. Ezután következett a sejtek lizálása, majd a plazmid kitisztítása. Amennyiben nem én állítottam elő a plazmidot, vagy ismertem, hogy megfelelő szekvenciával rendelkezik, akkor a transzformálás után rögtön antibiotikus LB-be oltottam a sejteket, és már másnap lehetett izolálni a plazmidot.

4.1.6. Plazmid izolálás

Ahhoz, hogy a baktériumok által sokszorosított plazmidot genomi DNS szennyezés mentesen kinyerjem a baktérium sejtekből, plazmid izolálást végeztem a Macherey-Nagel Nucleospin Plazmid kit használatával, a gyártó utasításait követve. A sejteket először elválasztottam a tápoldattól centrifuga segítségével, majd a sejtpeletet reszuszpendáltam, erős lúggal lizáltam, majd neutralizáltam egy harmadik oldattal, aminek hatására a plazmid DNS visszarendeződött kettősszálú formába. A genomi DNS túl hosszú ahhoz, hogy visszakapcsolódjon, így az a fehérjékkel együtt kicsapódott. A csapadékot elválasztottam centrifuga segítségével, majd a felülúszóban maradt plazmidot kötöttem a szilika oszlopra. Ezután mostam etanolos oldattal, majd szárítottam az oszlopot, és végül eluáltam a plazmid DNS-t az oszlopról 2*25 µl RNáz mentes vízzel.

4.2. Fehérjetermelés és tisztítás

A plazmidot megfelelő baktérium törzsbe transzformálva, és IPTG-vel aktiválva a mikroorganizmusok célzott fehérjetermelése elindul. Ezután a nagymértékben expresszáldott fehérje elválasztható a sejtektől, amennyiben nem zárult inklúziós testbe. Az elválasztás során a sejteltávolítás kémiai és mechanikai módon is lehetséges. A célfehérje affinitás kromatográfia révén tisztítható. A fehérje tisztaságát és megfelelő méretét SDS poliakrilamid gélelektroforézissel lehet ellenőrizni. A fehérje amennyiben szükséges töményíthető, valamint dialízis segítségével puffercsere is végrehajtható (10. Ábra). Az alábbiakban ezeket a módszereket fejtem ki részletesebben.



10. Ábra: Rekombináns fehérjetermelés és tisztítás lépései

4.2.1. Fehérjetermelés

A pET expressziós plazmidokban egy olyan promóter található a fehérje génje előtt, amire csak a T7 polimeráz képes rákapcsolódni. Olyan baktérium törzset érdemes alkalmazni a fehérjetermeléshez, aminek a genomjában megtalálható ez a T7 polimeráz. A fehérje termelődése szabályozható úgy, hogy egy Lac operon kerül a gén elé: így csak akkor aktiválódik az átírás, amikor található laktóz a rendszerben. Laktóz helyett izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozidot (IPTG) alkalmazhatunk, ami egy laktóz-analóg, így ez is aktiválja a fehérje átíródását, ugyanakkor a prokarióta nem tudja metabolizálni. A baktériumkultúra 37°C-on történő felnevelése után, IPTG hozzáadásával indukáltam a rekombináns fehérjetermelést, melyet alacsonyabb hőmérsékleten végeztem, ezzel lassabb riboszomális fehérjeszintézist elősegítve. A fehérjetermeléshez BL21 Rosetta (DE3) és Origami B (DE3) *E. coli* törzseket használtam, a transzformálást a Kísérletek és módszerek 4.1.5. fejezete alapján végeztem. A transzformálás után másnap a baktériumokat beoltottam egy 50 vagy 500 ml-t tartalmazó LB oldatba, majd 37°C-on növesztettem őket, egészen addig, amíg az optikai denzitásuk (OD) elérte a kellő nagyságot (általában 0,4-0,8 között). Ezután hozzáadtam a receptnek megfelelő

IPTG-t, ami 0,2-1 mM nagyságrendbe esett, majd lehűtöttem a lombikokat. Egy éjszakán keresztül termeltem a fehérjét 16 vagy 22 °C-on.

4.2.2. Sejtfeltárás

A sejtfeltárás azért fontos, mivel a baktériumok sejtjeinek belsejében található általában a célfehérje. A sejtfeltárás közben fontos, hogy a sejtek membránja lizálódjon, de a fehérje ne sérüljön. Használtam kémiai és mechanikai sejtfeltárási eszközöket is. A teljes feltárás és fehérjetisztítás folyamatot jégen illetve 4°C-on hűtve végeztem. A sejtek oldatát centrifugáltam 4 °C-on, 4000 rpm-en, 20 percig, majd a pelletről leöntöttem a felülúszót. A lízis pufferhez (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH=8) hozzáadtam még 0,1 V/V% Triton-X-100 oldatot, EDTA mentes proteázgátló tablettát, valamint spatulahegynyi DNázi-t, RNázi-t, és lizozimot. A sejteket felfuszpendáltam ebben az oldatban. Ezután mechanikai sejtfeltárást végeztem potterek segítségével, amíg látszólag homogén oldatot nem kaptam. A következő lépés a szonikálás volt, ami a gerjesztett kavitáció hatására kilyukasztja a sejteket, így sokkal tisztább oldatot eredményez. Ezt 1 percig végeztem 6 ciklusszámmal 60%-os teljesítménnyel. Ötször valósítottam meg minden fehérjeoldaton, úgy, hogy hagytam 30 másodperc hűtési időt a folyamatok között, hiszen fontos volt, hogy ne melegedjen fel az oldat. Ezután újabb centrifugálás következett 4°C-on, 11000 rpm-n, 30 percig. A centrifugálás után a felülúszót tartottam meg, és ezt tisztítottam tovább. A feltárások előtt végeztem előzetes feltárást is, hogy láthassam, hogy a pelletben vagy a felülúszóban van-e a célfehérje. Ennek a menete hasonlít a korábban leírtakhoz, csak a lízis pufferhez nem kell más összetevőt keverni ezen kísérlet során.

4.2.3. Nikkel affinitás kromatográfia

Amennyiben a fehérjén található His-tag, az az 6 hisztidin egymás mellett, a fehérje átvezetve a nikkel-nitrilotriecetsav (Ni-NTA) oszlopon (Macherey-Nagel) kötődik az oszlop falára a nikkel ionokhoz. Az imidazol szerkezetileg hasonlít a hisztidinhez, így a nagy mennyiségű imidazol kompetícióba lép a kötőhelyekért a hisztidinnel szemben. Az imidazol koncentráció növelésével eluálhatóak a fehérjék, mégpedig sorrendben aszerint, hogy mennyi hisztidin található rajtuk: ha van rajtuk His-tag, akkor általában 250 mM imidazol oldat hatására eluálódnak. A baktérium többi fehérjéje azonban átesik, vagy kisebb imidazol koncentráció hatására lemosódik az affinitás oszlopról, így el lehet választani a célfehérjét. A nikkel oszlopot 20%-os etanolos oldatban tárolom, a nikkel gyanta nagyjából 2-3 ml térfogatú volt. Az oszlopot először vízzel mostam tízszeres oszloptérfogattal. Ezután 20 mM imidazol tartalmú lízis

pufferrel mostam, ugyanekkora mennyiségben. A mosások után az oszlopra óvatosan rávittem a feltárás során keletkezett felülúszót. Ezután az oszlopot mostam 20 majd 40 mM imidazol oldattal: mindkettőből hússzoros oszloptérfogatot alkalmaztam. A 250 mM imidazol oldatból 25 ml-t vittem fel az oszlopra, és a frakciókat 1 ml-ként gyűjtöttem, hogy lássam, hogy pontosan hol volt az eluálódó fehérje csúcsa. A gyantát ezután 1 M imidazollal, majd vízzel, végül 20% etanollal mostam, és ebben is tároltam.

4.2.4. Glutation affinitás kromatográfia

Amennyiben a termelt enzim Glutation-S-Transzferáz (GST) fúziós fehérjéhez van kötve, a fehérjetisztítás során specifikusan el lehet választani a GST taggel rendelkező enzimet a sejt többi fehérjéjétől, ugyanis hozzákötődik a gravitációs oszlopba töltött Glutathione Sepharose 4B (Cytivia) gyantához. A gyantához trombin proteázt adva, ha egy éjszakán keresztül hasítjuk a fehérjét: a GST tag rajta marad az oszlopon, azonban a lemosódó folyadékban megtalálható lesz a célfehérje. Ezt a glutation oszlop regenerálása követi, 10 mM redukált glutationos pufferrel, aminek hatására lemosódik a GST fehérje is. Összességében a tisztítás végén egy olyan tiszta célfehérjét kaphatunk, ami nem rendelkezik fúziós fehérjével. A glutation gyantát 20%-os etanolban tároltam, a gyanta nagyjából 2 ml térfogatú volt. Először mostam az oszlopot tízszeres oszloptérfogat desztillált vízzel, majd 20 ml lízis pufferrel. Ezután a gyantát kipipettáztam az oszlopból, majd beletettem abba a csőbe, amiben a felülúszó volt. A felülúszót enyhe billegtetés mellett 30 percig inkubáltam 18°C-on, ekkor kötött meg a fehérje a gyantán. Az oldatot visszapipettáztam az oszlopba, majd leengedtem róla a folyadékot (ez volt az áteső frakció), miközben jéggel hűtöttem. A gyantához hozzáadtam még 2 ml lízis puffert, majd 40 Unit trombin enzimet. Az oszlopot billegtettem 4°C vagy 18°C-on egy éjszakán keresztül, amíg a trombin elhasította a fehérjét. Másnap reggel az oszlopokról a folyadékot leeresztettem: ez lesz elvileg a tiszta, hasított fehérje. Az oszlopot mostam lízis pufferrel 1 ml-ként, amíg az oldat koncentrációja 0 nem lett. A GST elúcióhoz, amivel regenerálhatjuk az oszlopot, a puffert mindig érdemes frissen elkészíteni. Nagyjából 20 ml elúciós pufferrel (50 mM Tris, 10 mM redukált glutation, pH=8) mostam az oszlopot. A tisztítás végén az oszlopot mostam tízszeres oszloptérfogat lízis pufferrel, vízzel, majd 20% etanollal, majd az oszlopot 4°C-on tároltam.

4.2.5. Heparin affinitás kromatográfia

A heparin kromatográfia egy olyan adszorpción alapuló folyadék kromatográfiás módszer, mely során a vizsgált fehérjék reverzibilis kölcsönhatást alakítanak ki a hordozó gyantán megkötött heparinnal. [30] A heparin kromatográfiás elválasztás különlegessége, hogy benne a magas szulfatációja révén negatív töltést hordozó heparin egyszerre alkalmas specifikus affinitás kölcsönhatások kialakítására, valamint nagy töltéssűrűségű kationos ioncserélőként is működik.

A heparin affinitás kromatográfiás méréseket AKTA-FPLC műszerrel végeztem, ami hűtött körülmények között üzemelt 6-10 °C-on. A rendszert és a HiTrap Heparin 5 ml oszlopot is mostam tízszeres oszloptérfogat vízzel, majd tízszeres oszloptérfogatnyi 'A' mosó oldattal (20mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl). A fehérje mintáimat a kísérlet előtt dializáltam az 'A' mosó oldatba. Ezután injektáltam a mintáimat az oszlopra, és 5 oszloptérfogat A puffer mosással gyűjtöttem az oszlopon nem kötődő fehérje frakciókat. Az oszlopon kötődött mintát sógradiens alkalmazásával eluáltam, mely során egyes esetben 150 mM-ról 1 M-ra, más esetben 2 M-ra vittem fel a NaCl koncentrációt nagyjából 40 perc alatt. Az elválasztás végén az oszlopot mostam A pufferrel, vízzel, végül 20%-os etanolban tároltam.

4.2.6. Dialízis

A fehérjetisztítás során puffercsere célból alkalmaztam dialízist. A fehérje mellől a kémiai potenciál különbség hatására a membrán pórusainál kisebb méretű molekulák a dialízis pufferbe diffundálhatnak, és fordítva: így hasonló összetételű oldatot kapunk, mint amilyen a dialízis puffer volt, amennyiben elegendően nagy térfogatú pufferben történt a kísérlet. A dialízist általában a laborban előfőzött 10 kDa pórusméretű cellulóz zsákokban végeztem (Merck, katalógusszám: D9652), ebbe töltöttem a fehérje oldatokat. A puffer összetétele attól függött, hogy éppen milyen kísérletet szerettem volna végezni a fehérjével a továbbiakban. A dialízist két óráig vagy egy éjszakán át kevertettem 4°C-on.

4.2.7. Töményítés és fagyasztás

A koncentrálnálást, azaz töményítést olyan membránnal végeztem, ami a puffer komponenseit átengedi, azonban a makromolekulákat nem. A membránon való átpréseléshez a centrifugális erőt használhatjuk ki. A koncentrálnálás előtt ekvilibrálni kell a membránt: Ezt a puffer oldat segítségével tehettem meg. A koncentrálnálás során 4°C-on centrifugáltam a mintákat 3-5 percig,

4000 rpm-en, figyelve rá, hogy ne csapódjon ki a fehérje. A fehérje koncentrációját Nanodrop 2000 készülékkel (Thermo Scientific) mérve tudtam megállapítani, így láttam, hogy elegendő volt-e a koncentrálás. 4 ml-es és 10 ml-es, 10 kDa pórusméretű koncentráló oszlopokat (Vivaspin, Cytiva) alkalmaztam. A koncentrálás után gyakran a fehérjék gyorsfagyasztása következett. Ekkor kimértem 200 µl-es PCR csövekbe 100 µl adagonként a töményített fehérje oldatot, a csöveket csipesszel folyékony nitrogénbe helyezve lefagyasztottam a mintákat. Ezután a csöveket -80°C-os hűtőben tároltam.

4.3. Fehérje vizsgálati módszerek

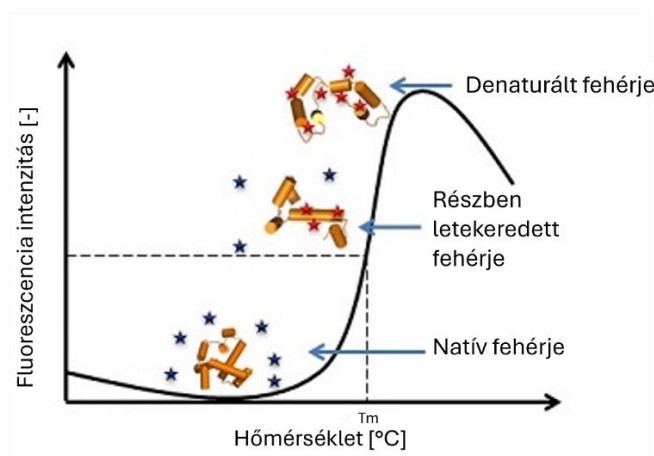
4.3.1. Nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjék sokféle töltéssel és alakkal rendelkezhetnek, így az elektroforézis során olyan eljárást érdemes alkalmazni, aminek hatására a fajlagos töltés egyenlő lesz a fehérjéken: így elválaszthatóvá válnak csupán a méretük alapján. A fehérjék széttekeredését segíti a 1,4-ditiothreitol (DTT), ami a diszulfid hidakat szünteti meg, illetve a nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate, SDS), ami a széttekeredés mellett kialakítja az azonos fajlagos töltést is a fehérjéken detergens tulajdonságai miatt. Ezután, ha a fehérjékre elektromos erőteret kapcsolunk, akkor mind egy irányba fognak mozogni, a méretük szerinti gyorsasággal: ez az elektroforézis poliakrilamid gélben zajlik, ami térhálós szerkezetű. Kétrétegű poliakrilamid gelet használtam, a felső tömörítő réteg akrilamid koncentrációja 4%, az alsó elválasztó rétegé 12% volt. A fehérjemintákat előkezelttem SDS-PAGE mintakotéllal (250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 10% DTT, 50% glicerol, 0,05% brómfenolkék), majd 95°C-on melegítettem 5 percig. Egy rövid centrifugálás után vittem fel a mintákat a gél zsebeibe Hamilton fecskendővel. Fehérje létraként GRS Protein Ladder Multicolort alkalmaztam (GRiSP Research Solutions). Az elektroforézist 180 V-on 50 percig végeztem, ELFO puffert (25 mM Tris, 192 mM glicin, 3,5 mM SDS, pH=8,7) használva az elválasztás során. A gelet ezután Commassie blue festékkel kezeltem, majd a desztillált vízbe történő kiáztatás után láthatóvá váltak a fehérjeminták.

4.3.2. Termofluorimetriás hőstabilitás mérés

A fehérjék apoláris oldalláncainak nagy része feltekeredett formában, vizes közegben a fehérje belseje felé orientálódik, egy apoláris magot kialakítva. Melegítés hatására a globuláris fehérjék elveszítik natív szerkezetüket, letekerednek, és eközben az apoláris oldalláncaik oldószer által elérhetővé válnak. A termofluorimetriás hőstabilitás mérés egy indirekt módszer, mely a

mintához adott festék fluoreszcencia jelét követi a minta hőmérsékletének fokozatos emelése során. A módszer során a fehérje megolvadási átmenet azonosítását az ekkor elérhetővé váló fehérje apoláris oldalláncok festékekkel való kölcsönhatásai teszik lehetővé, ugyanis a fehérjéhez kötődéssel a festék fluoreszcencia intenzitása megnő. A fluoreszcencia intenzitás detektálható a hőmérséklet függvényében. Ez alapján kirajzolódik egy görbe, aminek az inflexiós pontja fogja meghatározni a célfehérje olvadáspontját. Egy fehérje olvadáspontja az a hőmérséklet, aminél a fehérje molekulák fele van natív állapotban. Az olvadáspontok eltérő helyzetéből következtetni lehet a hőstabilitásbeli különbségekre (11. ábra).



11. ábra: Termofluorimetriás hőstabilitás mérés elve. A mérés során a hőmérséklet emelkedésével a fehérje egyre inkább denaturálódik, így a fluoreszcens festék be tud kötődni az apoláris oldalláncokhoz, és a fluoreszcencia intenzitás is nő. T_m: a fehérje olvadási hőmérséklete, ahol a fehérjék 50%-a van natív formában, ez a görbe inflexiós pontjához tartozó hőmérséklet.

Forrás: <https://www.jenabioscience.com/crystallography/optimization/chemical-environment/jbscreen-thermofluor>

A mérésekhez Biorad qPCR C1000 készüléket alkalmaztam. Minden mérési összetételből 3 párhuzamost készítettem. Az osztérfogat minden esetben 25 µl volt, és 96 lyukú lemezen dolgoztam. A fehérjéből nagyjából 0,1-1 mg/ml-es koncentrációt alkalmaztam. A méréshez Sypro Orange (Invitrogen) festéket használtam. Ezt először hígítottam negyvenszeresen a fehérje pufferében, majd a törzsoldatból 1 µl-t mértem az elegyhez. Minden esetben megmértem a kontroll jelét is viszonyítási alapként: ez csak a puffert és a festéket tartalmazta. A fehérjék olvadási hőmérsékleteit (T_m) a fluoreszcencia intenzitás-hőmérséklet görbék BioRad qPCR készülék által számított negatív deriváltjának minimuma alapján azonosítottam.

4.3.3. Enzimaktivitás mérés

Az NDST enzim N-szulfotranszferáz aktivitásának vizsgálatához egy kapcsolt fluorimetriás enzimaktivitás mérést szoktak alkalmazni. [24], [31] A glükózamin egység reszulfatációja során az N-szulfotranszferáz szulfát donorként 3'-foszfoadenozil-5'-foszfoszulfát (PAPS) kofaktort használ fel, amelyet 3'-foszfoadenozil-5'-foszfáttá (PAP) alakít. Egy kapcsolt reakcióban egy arilszulfotranszferáz segédenzim képes a PAP-ot visszaalakítani PAPS-sá, miközben a fluorogén 4-metil-umbelliferilszulfátról (4-MUS) veszi le a szulfát csoportot, ezzel létrehozva egy fluoreszcens molekulát a 4-metil-umbelliferont (4-MU). Segédenzim gyanánt általában a patkány citoszólikus szulfotranszferáz (SULT1A1-K65E/R68G) [32] 2 mutációt tartalmazó változatát, illetve ugyan ennek az enzimnek egy másik, 35 mutációt tartalmazó MBP-ASTIV-Mut35 változatát [28] alkalmaztam.

Az NST enzimek szubsztrátját, az N-dezacetilált heparozánt Dr. Rebecca Miller kollaborációs partnertől kaptuk. Ez az *E. coli* K5 törzsből kinyert heparozán (N-Acetil-glükózamin-glükurónsav)_n (BOC Sciences) kémiai dezacetilezésével készült Wang és mtsai. 2011 publikációban részletezett eljárás alapján. [33] Az enzim aktivitás méréseket irodalmi eljárások alapján végeztem. [24] A kísérleteket Molecular Devices SpectraMax készüléken végeztem, minden esetben 200 µl volt az össztérfogat. Az enzimaktivitás mérés során először a 4-MU fluorimetriás jelének kalibrációját végeztem el. Ehhez egy 7 pontos felező hígítási sort hoztam létre, 0-10 µM 4-MU koncentráció tartományban, mindegyik körülmény esetén 3 párhuzamost alkalmazva. A fluorimetria intenzitást végpontméréssel mértem, 37°C-os hőmérsékleten, a gerjesztési hullámhossz 360 nm, az emissziós hullámhossz 450 nm, a gerjesztési és emissziós sáv szélesség egyaránt 10 nm volt. A reakcióhoz az alábbi puffert használtam: 50 mM Tris, 15 mM MgCl₂, pH=7,5.

A segédenzimek (SULT1A1-K65E/R68G vagy MBP-ASTIV-Mut35) reakciójának méréséhez minden esetben az alábbi puffert alkalmaztam: 50 mM Tris, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH=7,5. A reakcióhoz 4 mM 4-MUS-t tettem, valamint változó koncentrációt a PAP szubsztrátból és az enzimből is. Az enzimaktivitást kinetikai méréssel követtem. Egy mérés 40 percig folyt 37°C-on, az enzimek hozzátétele előtt az oldatot inkubáltam 5 percig. A besugárzások 5 percenként érték a reakciókat. Kontrollként a segédenzim nélküli puffer jelét vettem.

Az N-szulfotranszferáz enzimek reakciói során a puffer az alábbi volt: 50 mM Tris, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH=7,5. A Michaelis-Menten görbék felvétele esetén 0,1 μM NST, 3 μM SULT1A1-K65E/R68G, 4 mM 4-MUS, és 0,6 mg/ml dezacetilált heparozán került a reakcióelegybe. A PAPS koncentráció mérési pontjai: 35; 25; 15; 10; 5; 2,5; 0 μM. Minden reakciókörülmeny esetén 2 párhuzamos mérést végeztem. Egy mérés 40 percig folyt 37°C-on, az NST enzimek hozzátétele előtt az oldatot inkubáltam 5 percig. A besugárzások 1 percenként történtek. Kontrollként az NST nélküli reakciót használtam 20 μM PAPS koncentráció mellett.

A Michaelis-Menten mérések kiértékelése során mindegyik görbe egyenes szakaszára külön illesztettem egyenest, majd ezek meredekségét átlagolva számítottam ki az átlagos fajlagos sebességet a különböző szubsztrátkoncentrációk esetén. Ehhez a meredekséget elosztottam a 4-MU kalibrációban kapott egyenes meredekségével, majd a fehérje tömegével:

$$v_{fajlagos} \left[\frac{nM \text{ PAPS}}{min * \mu g \text{ enzim}} \right] = \frac{\text{meredekség} \left[\frac{RFU}{s} \right] * 60}{2237 \left[\frac{RFU}{\mu M \text{ PAPS}} \right]} * \frac{1000}{0,76 [\mu g]}$$

Ezek alapján illesztettem Michaelis-Menten görbéket az OriginPro 2018 program segítségével. Az illesztéseknél az alábbi szubsztrát inhibíció modellt választottam, hiszen egyértelműen tűnt egy ilyen típusú látszólagos hatás.

$$v_{fajlagos} = \frac{v_{max} * S}{K_m + S * \left(1 + \frac{S}{K_i} \right)}$$

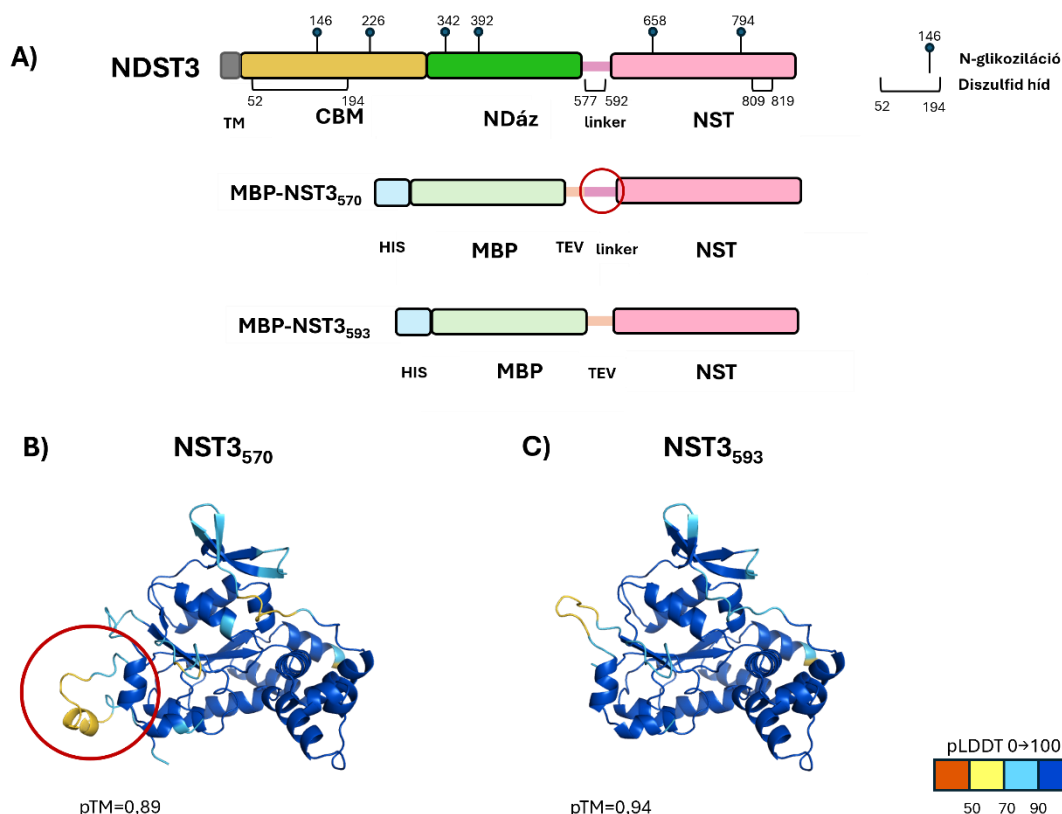
Az egyenletben v_{max}=maximális fajlagos sebesség [μM/min/μg enzim], K_m=Michaelis-Menten állandó [μM], K_i=inhibíciós állandó [μM].

5. Eredmények és értékelésük

5.1. N-szulfotranszferáz fehérjék előállítása és vizsgálata

5.1.1. MBP-NST3 fúziós fehérjék tervezése

A humán NDST3 N-szulfotranszferáz (NST3) doménjének előállítását *E. coli* expressziós rendszerben terveztem, a homológ humán NDST1 N-szulfotranszferáz domén (NST1) előállítás irodalmi analógiáit alapul véve a konstrukció határok és a termelés körülményeinek megválasztásában. Az egyik meghatározó fehérje előállítási referencia az NST1 kristályszerkezete volt (NST1, PDB: 1NST1) [26], ahol a kristályszerkezetben látható NST1 régió határainak (NST1₅₇₉₋₈₈₂) az NST3₅₇₀₋₈₇₃ szakasz (12. ábra/B) felelt meg. Egy további NST3 konstrukciót egy 2023-ban megjelent tanulmány alapján terveztem. [29] Ezen tanulmányban az NST1 N-terminálisán elhelyezkedő NDáz és NST doméneket összekötő linker szakasz eltávolításával (579-602) (12. ábra piros körrel jelölve) a rekombinánsan termelt NST1 megnövekedett hőstabilitását észlelték. A termelt NST1₆₀₃₋₈₈₂ méretének NDST3 megfelelője az NST3₅₉₃₋₈₇₃ volt (12. ábra/C). A két tanulmányban az NST1-t eltérő fúziós fehérje formákban termelték N-terminális glutation S-transzferáz (GST) [26], illetve maltóz-kötő fehérje (MBP) [29] címkékkel. Első fehérje termelési kísérleteimben az utóbbi megoldást választva MBP-NST3₅₇₀₋₈₇₃ és MBP-NST3₅₉₃₋₈₇₃ fehérjéket terveztem, (F2.1. MBP-NST3₅₇₀, F2.2. MBP-NST3₅₉₃) melyeket a továbbiakban rendre egy rövidebb MBP-NST3₅₇₀ és MBP-NST3₅₉₃ névvel említek. Mindkét tervezett NST3 konstrukció klónozását pMAL-c6T vektorba (New England Biolabs) végeztem, mely segítségével a His₆-MBP-TEV-NST3 fúziós fehérje formát kaptam. A fehérje konstrukcióban a TEV a dohány karcos vírus (tobacco etch virus) rendkívül specifikus cisztein proteázának hasítóhelyét jelzi, ami lehetővé teszi az MBP hasítását a fúziós fehérje konstrukcióról. Az N-terminális végen található His₆ epitóp címke révén lehetőségem volt a fehérje Ni-NTA kromatográfiás tisztítására (12. ábra/A).

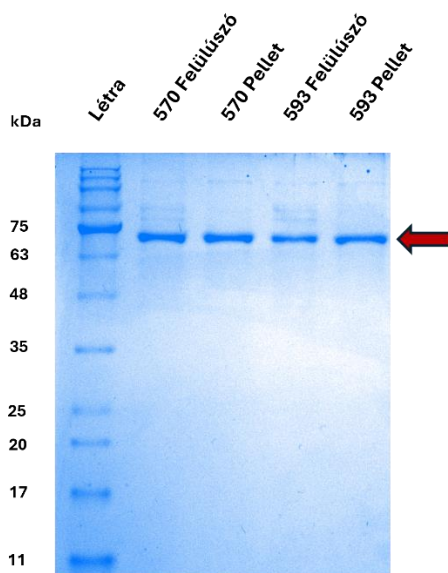


12. ábra MBP-NST3 fúziós fehérjék tervezése. A) MBP-NST3₅₇₀ és MBP-NST3₅₉₃ konstrukciók sematikus rajza. Rövidítések: CBM=Szénhidrátkötő domén, NDáz = N-dezacetiláz domén, NST = N-szulfotranszferáz domén, MBP = Maltóz-kötő fehérje, HIS = hexahisztidin epitóp címke, TEV= TEV proteáz hasítóhely. Pirossal bekarikázva látható a két konstrukció közötti különbség. B) NST3₅₇₀ AlphaFold3 modellje C) NST3₅₉₃ AlphaFold3 modellje. A szerkezeti modellek megjelenítésekor alkalmazott narancs-kék színskála az AlphaFold által jósolt pLDDT (predicted local distance difference test) pontszámot jelzi, amely egy aminosav szintű szerkezeti megbízhatóság becslési értéke a modell és egy kísérletes szerkezet egyezéseire. A molekulamodell egészének megbízhatóságát az AlphaFold által jósolt pTM (predicted template modelling) értékek is jellemzik.

Az MBP-NST3₅₇₀ és MBP-NST3₅₉₃ konstrukciók restriktációs endonukleáz alapú molekuláris klónozásához a csoportunkban rendelkezésre álló *E. coli* gazdára kodon optimalizált humán *ndst3* gént használtam. A klónozást a Kísérletek és módszerek 4.1 fejezetében leírtak szerint végeztem. A pMAL-c6T vektort és a PCR reakcióval előállított inzerteket NotI-HF és EcoRI-HF restriktációs endonukleáz enzimekkel emésztettem, majd preparatív agaróz gélelektroforézis elválasztással tisztítottam. Az emésztett és tisztított vektor és inzert ligálását T4 ligáz enzimmal végeztem, majd a ligálási reakció termékével transzformáltam a klónozásra optimalizált *E. coli* XL1-Blue törzset. LB-agar táptalajon egysejt kolóniákat izoláltam, majd ezeket inokuláltam LB folyadékkultúrába. Izoláltam a plazmid DNS-t, majd Sanger szekvenálás révén (Microsynth GmbH) ellenőriztem a plazmidok inzert régiójának helyes nukleobázis sorrendjét.

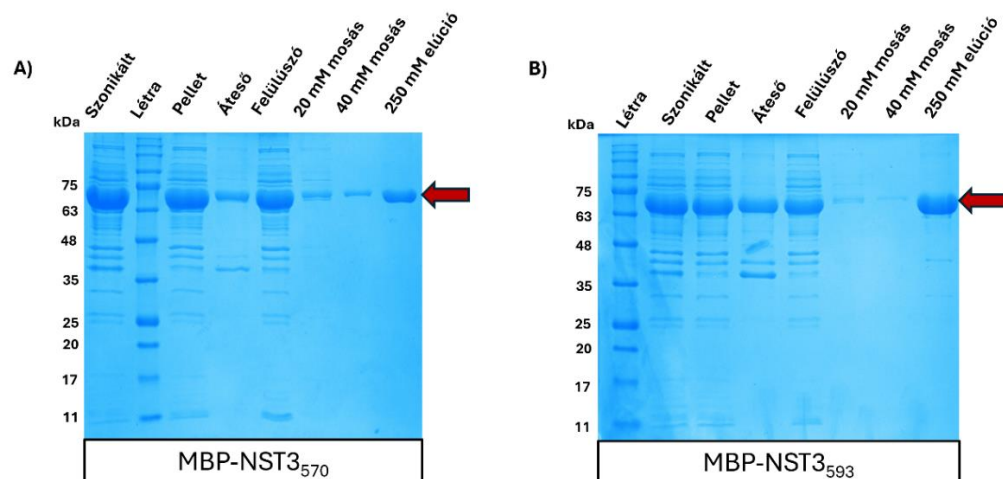
5.1.2. MBP-NST3 fehérjék termelése és tisztítása

Az MBP-NST3₅₇₀ és MBP-NST3₅₉₃ konstrukciókat kódoló plazmidokat *E. coli* Rosetta (DE3) sejtekbe transzformáltam, majd, az egy éjszakán át 37°C-on rázatott, 5 ml LB előkultúrából 50 ml LB médiumot inokuláltam. Ezt addig rázattam 37°C-on, amíg a kultúra optikai denzitása (OD) elérte a 0,6-0,7 értéket. Ekkor 0,5 mM IPTG-t adtam a sejtekhez, majd a fehérjetermelést 16°C-on egy éjszakán át rázatással folytattam. Ezután a sejteket centrifugáltam, majd előzetes feltárást végeztem a Kísérletek és módszerek 4.2.2 fejezetében leírt protokoll alapján. Mindkét fehérje jelen volt a feltárás során nyert felülúszóban, így nem vált szükségessé a zárványtestből történő, denaturációt is magában foglaló fehérjetisztítás (13. ábra).



13. ábra MBP-NST3 fehérjék próbaexpressziója és feltárása. 570: MBP-NST3₅₇₀, 593: MBP-NST3₅₉₃. Fehérje létra: GRS Protein Ladder Multicolor. A termelt fehérjék pozícióját piros nyíl jelöli. Elméleti molekulatömegek (Protparam) MBP-NST3₅₇₀: 79,82 kDa, az MBP-NST3₅₉₃: 76,85 kDa.

A fehérjék termelését 500 mL LB kultúra léptékben is elvégeztem, majd a feltárás után nikkell affinitás kromatográfiával tisztítottam (14. ábra). Mindkét fehérjét sikerült jó mennyiségben és tisztaságban kinyerni (15-18 mg), a tisztítás során fehérje kicsapódást nem tapasztaltam.

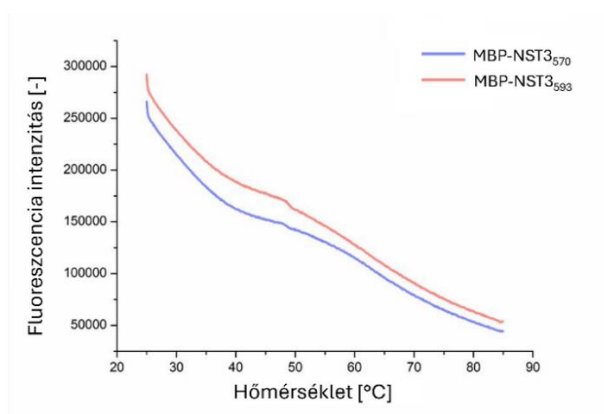


14. ábra MBP-NST3₅₇₀ és MBP-NST3₅₉₃ konstruktok termelése és tisztítása. Fehérje létra: GRS Protein Ladder Multicolor. A termelt fehérjék pozícióját piros nyíl jelöli. Elméleti molekulatömegek (Protparam) MBP-NST3₅₇₀: 79,82 kDa, az MBP-NST3₅₉₃: 76,85 kDa.

5.1.3. MBP-NST3 fehérjék vizsgálata

Termofluorimetria alapú hőstabilitás mérés

Az MBP-NST fehérjék biokémiai jellemzésének előkísérleteként ellenőriztem a fehérjék helyes feltekeredését és oldatbeli stabilitását termofluorimetriás hőstabilitás mérés alapján (Kísérletek és módszerek 4.3.2). Meglepő módon mindkét fehérje minta esetén a kezdeti 25°C-os hőmérsékleten váratlanul nagy fluoreszcencia intenzitás értékek adódtak, amit a hőmérséklet emelésével a fluoreszcencia fokozatos csökkenése követett (15. ábra). Ezt a csökkenő tendenciát csak részlegesen enyhíti a kb. 45°C hőmérsékletnél látható válla a görbének, ami arra utal, hogy a vizsgálat során a fehérjék egy kisebb hányadának feltekeredése volt megfelelő.



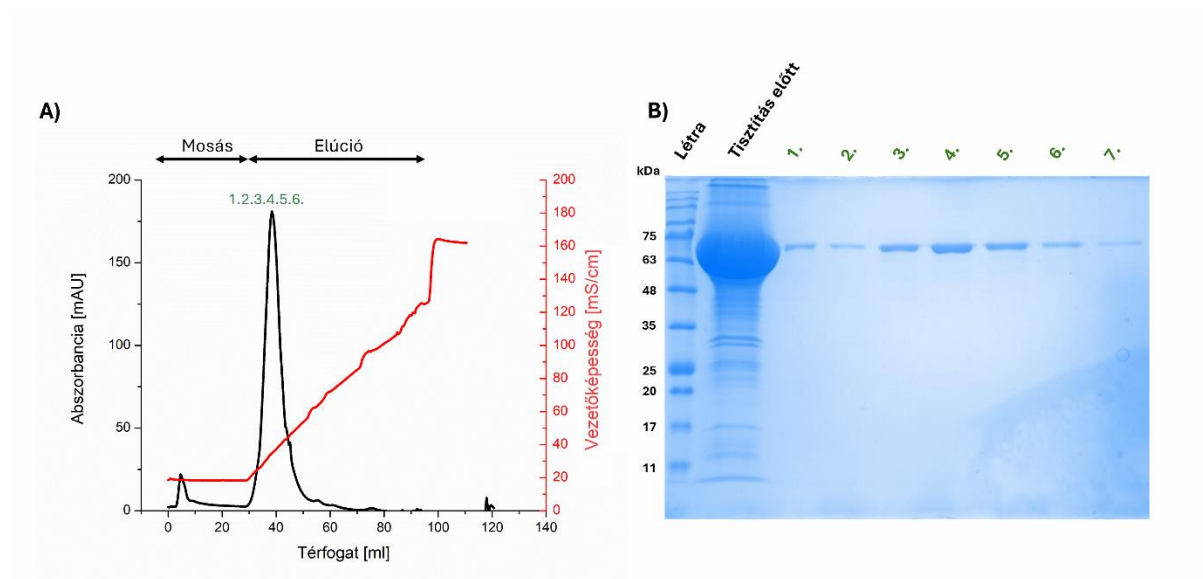
15. ábra MBP-NST3₅₇₀ és MBP-NST3₅₉₃ fehérjék termofluorimetriás görbéi.

Mindez a mérési körülmények közt az MBP-NST fehérjéknek csak részleges feltekeredését, vagy egy ‘molten globule’ típusú állapotát sejteti, melyben a fehérje hidrofób magja jelentősen destabilizált állapotú. Noha a Xi és mtsai. közlemény alapján [29] a szulfotranszferáz domén N-terminális rövidítésével létrehozott változatát tartalmazó MBP-NST3₅₉₃ esetén nagyobb hőstabilitást vártam, nem tapasztaltam számottevő különbséget a két vizsgált MBP-NST3 fehérje között. A fehérjék korlátozott hőstabilitását megerősítette mintáik negyedórás szobahőmérsékleten tárolása közben tapasztalt jelentős fehérje kicsapódás, ami magyarázatot adhat a termofluorimetria görbék magas kezdeti fluoreszcencia intenzitására.

Heparin affinitás kromatográfia

Az MBP-NST3 fehérjék hőstabilitás problémája miatt további jellemzésükhöz heparin affinitás kromatográfia vizsgálatot választottam, mivel ezt az elválasztást hűtött körülmények között, egy 5-10°C közötti hőmérsékletet biztosító hűtőben elhelyezett AKTA FPLC készüléken tudtam végezni (Kísérletek és módszerek 4.2.5). A heparin affinitás kromatográfia kationcserélő tulajdonsága révén egy gyakran használt kiegészítő lépése a rekombináns fehérje tisztítási eljárásoknak. A heparán szulfátot módosító NDST enzimeknek emellett a heparin a bioszintézis terméke és egyben inhibitora, mely nagy affinitással képes kötődni a rekombinánsan termelt NDST1 enzimhez. [25] Mivel az NST3 HS kötő képessége enzimatisztikus funkciójának alapfeltétele, ezért a rekombináns NST3 fehérjék szelektív adszorpciója a heparin oszlophoz alkalmas lehet indirekt módon a fehérje HS szubsztrát kötőhely funkcionalitásának jellemzésére. A Ni-affinitás kromatográfiával tisztított MBP-NST3₅₇₀ heparin affinitás kromatográfiás vizsgálatokor a 20 mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl mosó pufferbe dializált fehérje döntő mennyisége kötődött az oszlophoz, majd arról 150 mM – 2000 mM NaCl gradiens elúció során ~356 mM só koncentrációnál vált le (16. ábra/A).

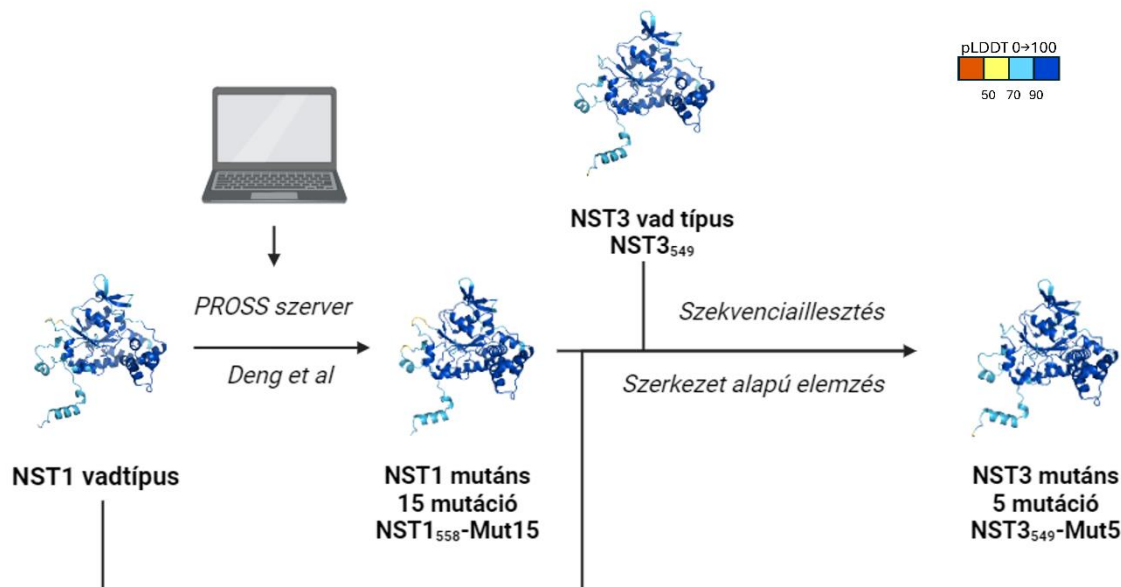
Az elválasztás frakcióinak SDS-PAGE elemzése igazolta, hogy az elúciós csúcs a MBP- NST3₅₇₀ fehérje jeléből adódott, a viszonylag híg elúciós fehérjeminta nem tartalmazott látható szennyezőt (16. ábra/B). Elképzelhető, hogy ez a kísérlet a NST3₅₇₀ glükózaminoglikán kölcsönható képességére utal, ezt további kísérletekkel lehetne igazolni, megvizsgálva az MBP fehérje és az NST3 hatását külön-külön a heparin oszlophoz kötődésben.



16. ábra MBP-NST3₅₇₀ heparin affinitás kromatográfiás vizsgálata. A) MBP-NST3₅₇₀ kromatogramja. B) MBP-NST3₅₇₀ heparin affinitás kromatográfia SDS-PAGE elemzése. MBP-NST3₅₇₀ várt molekulamérete: 79,82 kDa.

A heparin affinitás kromatográfiás vizsgálat biztató lehet MBP-NST3₅₇₀ megfelelő feltekeredésének feltételezéséhez a kísérlet 6-10 °C-os hőmérsékletén. Ugyanakkor az MBP-NST3 fehérjék alapvető hőstabilitási korlátai lényegében megakadályozzák további hatékony enzimológiai jellemzésüket, mivel a szubsztrát kötés és enzim aktivitás mérésekhez jellemzően a fehérje szobahőmérsékleti vagy 37°C-os inkubációja szükséges. Emiatt a továbblépéshez új NST3 fehérje konstrukciókat terveztem.

5.1.4. Hőstabilizált NST3 fehérje tervezése



17. ábra Hőstabilizált NST3 tervezésének folyamata. A Deng és mtsai által [28] a PROSS szerver segítségével tervezett és kísérletesen is tesztelt 15 mutációt tartalmazó NST1 fehérje és az NST3 szekvencia és szerkezeti alapú összevetése alapján azonosítottam egy öt mutációt tartalmazó NST3 variánst. A megjelenített fehérje homológia modelleket AlphaFold3 szerver segítségével készítettem. A modellek narancs-kék színskálája az AlphaFold által jósolt pLDDT (predicted local distance difference test) pontszámot jelzi, amely egy aminosav szintű szerkezeti megbízhatóság becslési érték a modell és egy kísérletes szerkezet egyezése.

Az NST3 fehérje hőstabilizált formájának tervezésénél hasznát vehettem egy, a kutatómunkám közben, 2024 tavaszán megjelent tanulmány eredményeinek [28]. E munka fő célja egy *E. coli* expressziós rendszerben termelt hőstabil NST1₅₅₈₋₈₈₂ domén létrehozása volt, melyet heparin kemoenzimatiszta előállításánál egy hatékony enzim reagensként hasznosítottak. A hőstabil NST1 tervezéséhez a PROSS szerver [27] által javasolt, vélhetően szerkezet stabilizáló hatású fehérje pontmutációkat azonosítottak, majd ezek különböző kombinációinak hatását kísérletesen vizsgálták hőstabilitás és enzimaktivitás módszerekkel. Ezt a fehérje optimalizációs eljárást alkalmaztam az NST3 esetén is. Az NST3 mutációk tervezéséhez nem egy új PROSS szerver futtatást indítottam, hanem az NST1 hőstabil formát vettem alapul, mivel az ebben eszközölt mutációk kedvező hatása – az NST1 fehérje kontextusában - kísérletesen is igazolódott (17. ábra).

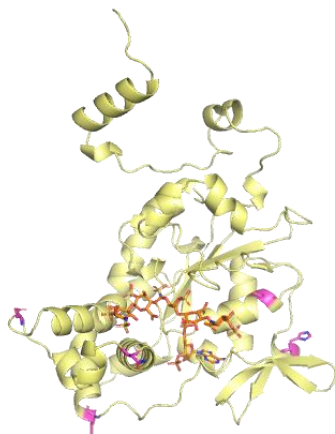
Az NST3 remélhetően hőstabilizáló mutációinak kiválasztásakor ügyeltem arra, hogy kizárjam az összes olyan NST1 mutációt, mely az enzim HS és PAPS szubsztrát kötőhelyén található,

mivel ezek közvetlenül befolyásolhatják az enzim katalitikus tulajdonságait. Ennek megvizsgálásához a Deng és mtsai. cikkben leírt [28], 15 mutációt tartalmazó NST1 fehérje (NST1₅₅₈-Mut15) valamint a vad típusú NST1 (NST1₅₅₈-wt) és NST3 (NST3₅₄₉-wt) szekvenciaillesztését valósítottam meg (18. ábra).

NST1_558_wt	LQTLPPVQLAQKYFQIFSEEKDPLWQDPCEDKRHKDIWSKEKTCDRFPKLLIIGP	618
NST1_558_Mut15	LQTLPPVQLAQKYFQIFSEEKDPLWQDPCEDKRHKDIWSKEKTCDRFPKLLIIGPQKTGT	618
NST3_549_wt	LQTLPPVQLAHKYFELFPDQKDLWQNPCCDKRHRDIWSKEKTCDRLPKFLVIGPQKTGT	609
*****:***:!* :*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
NST1_558_wt	TALY ^L FLGMHPDLSSNYPSE ^E TFEE ^I QFFNGHNYHKGIDWYMEFFPIPSNTTSDFYFEKS	678
NST1_558_Mut15	TALYFL ^M HMPDLSSNYPSE ^E TFEEI ^Q FFNGHNYHKGIDWY ^M FFPIPSNTTSDFYFEKS	678
NST3_549_wt	TALYFL ^M HPSILSNSPSPKTFEEVQFFNRNNYHRGIDWY ^M FFPVPSNVTTDFLFEKS	669
***** ***:! ** ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
NST1_558_wt	ANYFDESEVAPRRAAALLPKAKVLTILINPADRAYSWYQHQR ^A H ^D DPV ^A ALKYTFHEVITAG	738
NST1_558_Mut15	ANYFDESEVAPRRAAALLPKAK ^I LTILINPADRAYSWYQHQR ^A H ^D PAVALKYTFHEVITAG	738
NST3_549_wt	ANYFHSEEPKRAASLVPKAK ^I ITILIDPSDRAYSWYQHQR ^S H ^D PAALKFSFYEVISAG	729
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
NST1_558_wt	SDASS ^L R ^A LQNR ^R CLVPGWYATHIERWLSAYHANQILVLDGKLLRTEPAKVM ^D MDVQKFLG	798
NST1_558_Mut15	SDA ^S SE ^L R ^A LQNR ^R CLVPGWYATHIERWLS ^S YHANQILVLDG ^S LLRT ^D PAKVM ^D MDVQKFLG	798
NST3_549_wt	PRAPSELRALQKRCLVPGWYASHIERWL ^V YFPFQLLIIDGQLRTDPATVMDEVQKFLG	789
* *****:*****:***** : *!*:*****: *****:*****:*****		
NST1_558_wt	VTNTIDYHKT ^L AFDPKKG ^F WC ^Q LLEGGKT ^K CLGK ^S KGRKYPMD ^L DSRAFLKDYYRDHNI	858
NST1_558_Mut15	VTNTIDYHKT ^L AFDPKKG ^F WC ^Q LLEGGKT ^K CLGKSKGRKYP ^M MD ^L DSRAFLKDYYRDHNI	858
NST3_549_wt	VLPHYNYSE ^L TFDSHKGFWC ^Q LLEGGKT ^K CLGKSKGRKYP ^M MD ^L DSRTFLSSYYRDHNV	849
* :* :!* ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
NST1_558_wt	ELSKLLYKMGQTLPTWLREDLQNTR*	883
NST1_558_Mut15	ELSKLLYKMG ^Q LPTWLREDLQNTR*	883
NST3_549_wt	ELSKLLHKLGG ^Q LPSWLRQELQKVR*	874
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		

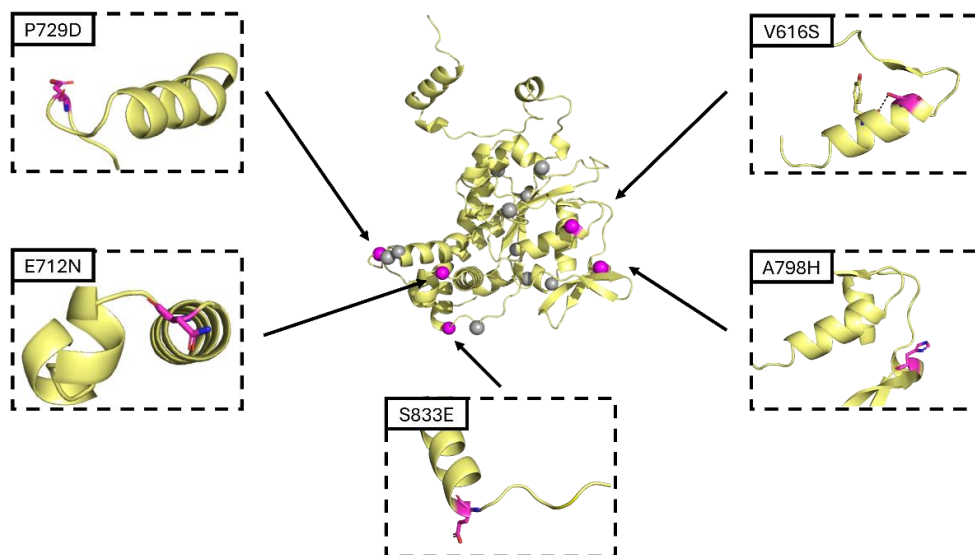
18. ábra NST1-NST3 szekvenciaillesztés az NST3 vélhetően hőstabilizáló mutációinak kiválasztására. A szekvenciaillesztést a Clustal Omega szerver segítségével végeztem, összehasonlítva az NDST1 NST domént (558-882 aminosavak, UniProt kód: P52848) az NDST3 NST domént (549-873 aminosavak, UniProt kód: O95803) valamint a Deng és mtsai. közleményben leírt 15 hőstabilizáló mutációt tartalmazó NST1 variánst (NST1₅₅₈-Mut15, [28]). Sárga színnel jelöltem az NST1 aktív helyet felépítő aminosavakat (forrás: Mycroft-West és mtsai. S17/b ábra [24]), zölddel az NST1 mutációit. Szürke színnel látszanak azok az aminosavak, amik megegyeznek az NST1 mutánsban és az NST3-ban. Lila színnel jelöltem a lehetséges mutagenézis helyeket az NST3 esetén.

Meglepő módon a tizenöt NST1 pontmutáció közül tíz esetben a mutációval bevitt aminosavak megegyeztek az NST3 szekvenciában megfelelő helyen szereplő aminosavval (18. ábra, az NST3 szekvencián szürke színnel kiemelve). Emiatt csupán a maradék öt aminosav esetén vizsgáltam meg az NST1 mutagenézis alkalmazhatóságát az NST3-ra. Az öt mutáció egyike se befolyásolta az NST3 HS és PAPS szubsztrátkötő helyét, így ezek kombinációja előzetesen alkalmasnak tűnt az NST3 kísérletes módosítására (19. ábra).



19. ábra. NST3₅₄₉₋₅₆₉-Mut5 mutációk elhelyezkedése az enzim aktív helyéhez képest. A fehérje AlphaFold3 szerkezeti modelljében a mutációk helyét *lila* szín jelöli. A *narancssárgával* jelölt HS oktaszacharid és PAP szubsztrát molekulák a NST3₅₄₉₋₅₆₉-Mut5 szerkezetre illesztett homológ enzim, a HS 3-O-szulfotranszferáz-3 enzim kristályszerkezetéből származnak (PDB: 3UAN).

Az egyes mutációk szerkezeti hatását az NST3₅₄₉₋₅₆₉-Mut5 AlphaFold3 szerkezeti modellje alapján vizsgáltam (20. ábra). Az öt mutációból négy (P729D, E712N, S833E, A798H) a fehérje felszíni polaritás viszonyait változtatva módosíthatja a hőstabilitást. Az ötödik mutáció, a V616S szerin oldallánca H hidat képezhet a hélix formában vele szemben elhelyezkedő tirozin aminosavval, mely így képes meghosszabbítani az α -hélix hidrogén-híd kötés rendszerét, stabilizálva a hélix C-terminális végét az úgynevezett helix capping jelenség révén.



20. ábra. NST3 hőstabilizációra tervezett pontmutációk szerkezeti hatása. Az öt pontmutációt tartalmazó NST3₅₄₉₋₅₆₉-Mut5 fehérje AlphaFold3 modelljét Pymol szoftverrel jelenítettem meg. Szürke gömbök jelölik azokat az aminosavakat, amik az NST1 esetén mutánsok voltak, de az NST3 esetén az eredeti szekvenciában is szerepeltek. *Lila* gömbök jelölik a lehetséges mutációkat. A közeli nézetek az egyes aminosavak elhelyezkedését mutatják. A V616S szerin oldallánca a megjelenített hidrogénhíd kölcsönhatás kialakításával képes lehet stabilizálni az α -hélix C-terminális végét.

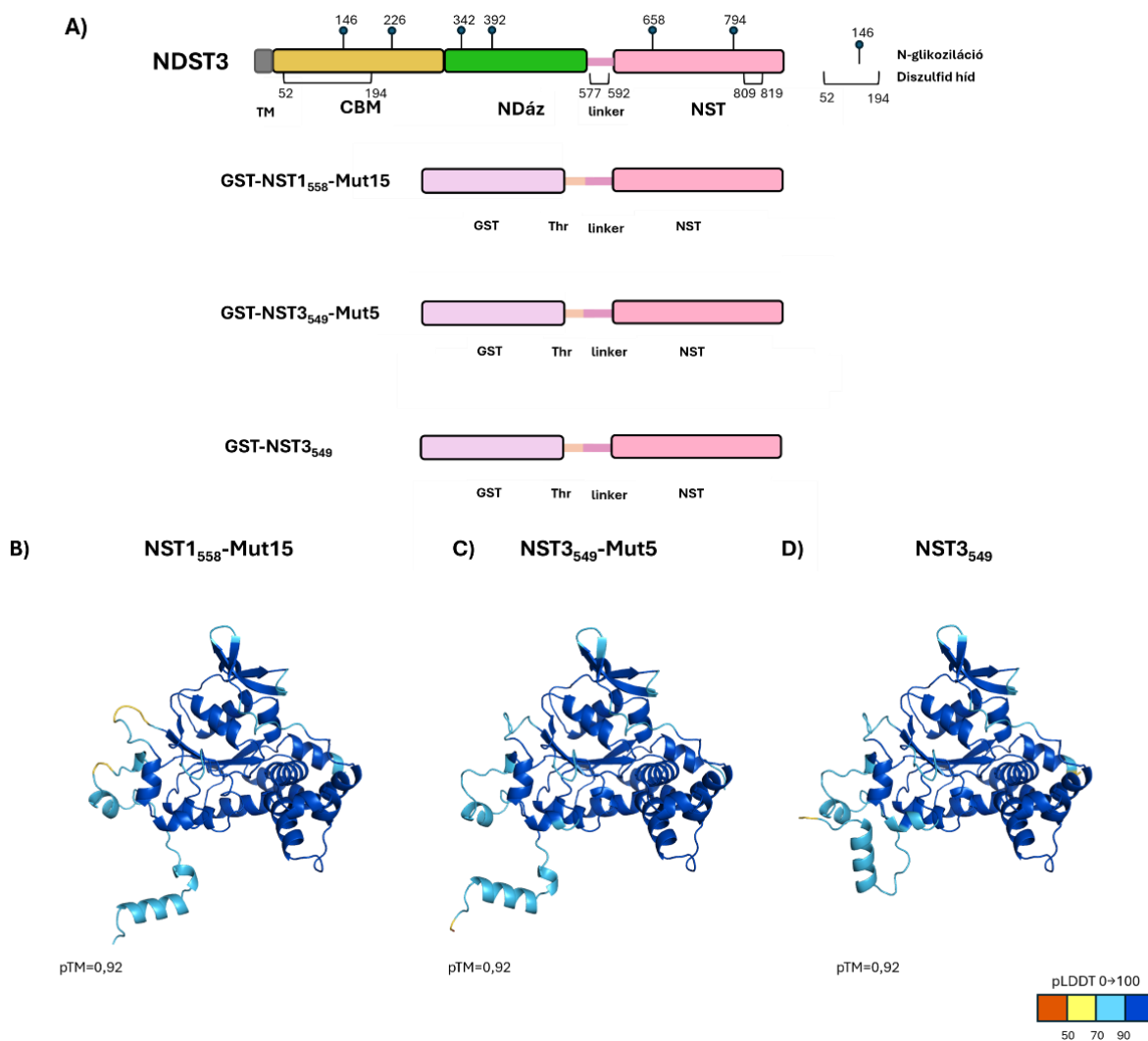
5.1.5. GST-NST3 és GST-NST1 fehérjék előállítása

GST-NST₃₅₄₉-Mut5 és GST-NST₁₅₅₈-Mut15 konstrukciók génszintézise

A megtervezett NST₃₅₄₉-Mut5 fehérje előállításához az expressziós plazmidot génszintézissel rendeltük meg a GeneUniversal cégtől. Ehhez a csoportunkban rendelkezésre álló *E. coli* gazdára kodon optimalizált humán *ndst3* gén NST₃₅₄₉₋₈₇₃ fehérjét kódoló szakaszába a megfelelő báziscserékkel megterveztem a feljebb ismertetett öt helyspecifikus mutációt, majd az így módosított *ndst3* génszakaszt pGEX-4T-1 vektor klónozási helyére illesztettem EcoRI-XhoI hasítóhelyek közé. Így a plazmidról termelődő fehérje egy GST fúziós fehérjét és trombin hasítóhelyet tartalmazott az NST3 szakasz előtt (GST-NST₃₅₄₉-Mut5) (21. ábra/A, C). Ez az elrendezés megfelelt a Deng és mtsai. [28] és Kakuta és mtsai. [26] említett NST1 tanulmányokban termelt GST-NST fehérjéknek. A GST fúziós címke jelenléte segítheti a fehérje feltekeredését, a trombin hasítóhely pedig a glutation affinitás kromatográfia során a GST címke hatékony eltávolítását teszi lehetővé. Az NST₃₅₄₉-Mut5 összehasonlító jellemzéséhez emellett pozitív kontrollként megrendeltem az NST1 15 hőstabilizáló mutációt tartalmazó fehérjét kódoló [28] humán *ndst1* (CCDS adatbázis azonosító: CCDS34277.1) génszakaszt, szintén pGEX-4T-1 vektor klónozási helyre illesztve, melyről a GST-NST₁₅₅₈-Mut15 fehérje termelődhet (21. ábra/A, B).

GST-NST₃₅₄₉ konstrukció létrehozása molekuláris klónozással

Az NST3 hőstabilizáló mutációk hatásának ellenőrzéséhez molekuláris klónozással létrehoztam a GST-NST₃₅₄₉-Mut5-nek megfelelő méretű vad típusú NST3 konstrukciót (GST-NST₃₅₄₉) (21. ábra/A, D). Ehhez primert terveztem (F1 Molekuláris klónozáshoz használt oligonukleotidok), majd PCR reakció során az *E. coli*-ra kodon optimalizált humán *ndst3* génről felszaporított, majd EcoRI-HF és XhoI restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztett inzertet, illetve pGEX-4T-1 vektort ligáltam T4 ligáz használatával, majd *E. coli* XL1-Blue sejtekbe transzformálás után kapott egysejt kolóniákból plazmidot izoláltam. A plazmid inzert régiójának méretét EcoRI-HF+XhoI tesztémésztéssel ellenőriztem, majd bázissorrendjét Sanger szekvenálással (Microsynth GmbH) igazoltam.

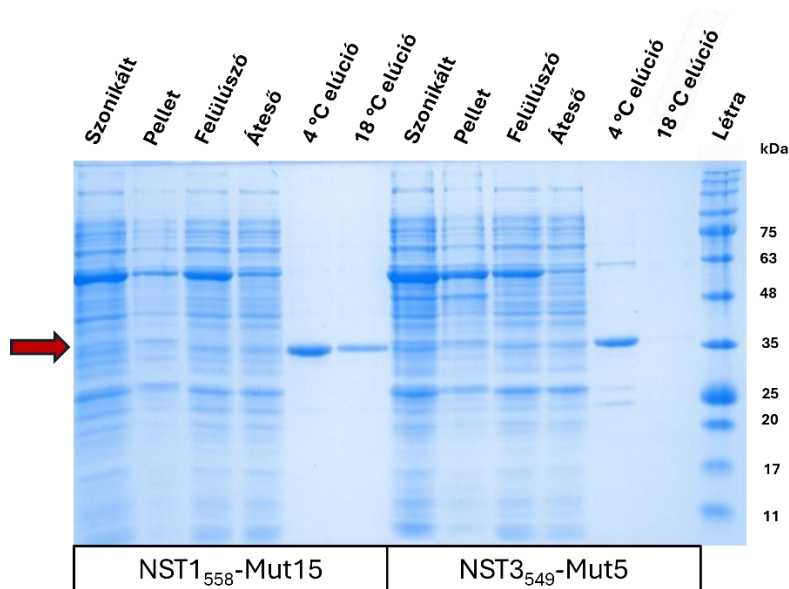


21. ábra. GST-NST konstrukciók szerkezeti felépítése. A) GST-NST₁₅₅₈-Mut15, GST-NST₃₅₄₉-Mut5 és GST-NST₃₅₄₉ konstrukciók sematikus rajza. Rövidítések: GST=Glutation-S-Transzferáz, Thr=Trombin hasítóhely, NST=N-szulfotranszferáz domén, NDáz=N-dezacetiláz domén, CBM=Szénhidrátkötő domén. B) GST-NST₁₅₅₈-Mut15 C) GST-NST₃₅₄₉-Mut5 és D) GST-NST₃₅₄₉ konstrukciók AlphaFold3 modelljei. A szerkezeti modellek megjelenítéskor alkalmazott narancs-kék színskála az AlphaFold által jósolt pLDDT (predicted local distance difference test) pontszámot jelzi, amely egy aminosav szintű szerkezeti megbízhatóság becslési értéke a modell és egy kísérletes szerkezet egyezésére. A molekulamodell egészének megbízhatóságát az AlphaFold által jósolt pTM (predicted template modelling) értékek is jellemzik.

Előzetes fehérjetermelés és tisztítás

A GST-NST₁₅₅₈-Mut15 és GST-NST₃₅₄₉-Mut5 konstrukciókat kódoló plazmidokat *E. coli* Rosetta (DE3) sejtekbe transzformáltam, majd másnap 50 ml LB tápoldatot inokuláltam a baktérium tenyészzel. 0,8-as OD elérése után 0,2 mM IPTG-t adtam a kultúrákhoz, majd 22°C-on egy éjszakán keresztül termeltem a fehérjéket. Másnap a sejteket centrifugáltam, feltártam, majd glutation affinitás kromatográfia révén tisztítottam (Kísérletek és módszerek 4.2.1, 4.2.2, 4.2.4) (22. ábra). Ennek során a GST fúziós címkét lehasítottam a fehérjéről 40

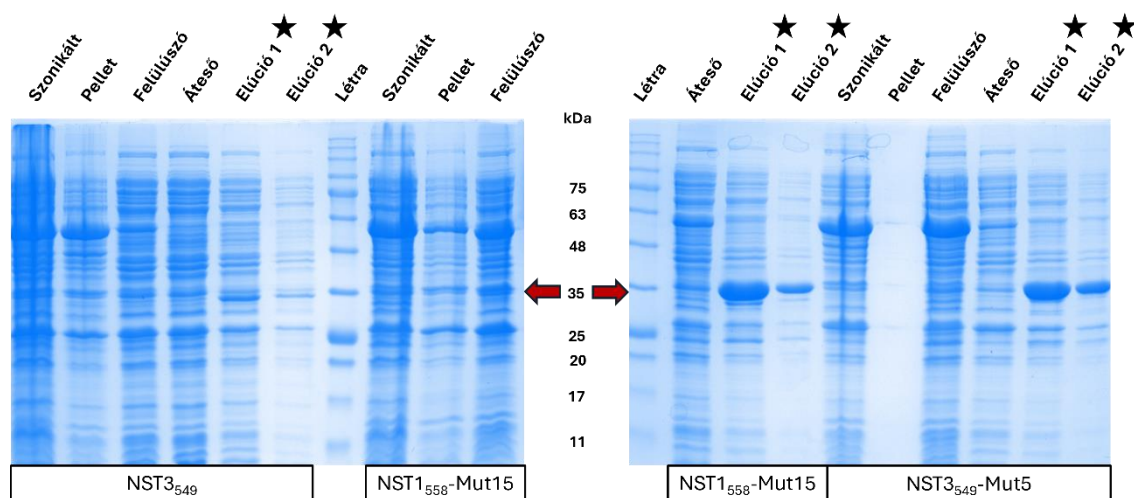
Unit trombin enzim (Merck Millipore) segítségével. Az egy éjszakán át végzett trombin hasítás esetén összehasonlítottam a 4°C és 18 °C inkubáció hatását. A 18°C-on végzett inkubáció során két tisztított fehérje közül az NST3₅₄₉-Mut5 fehérje kicsapódását tapasztaltam. Mivel 4°C-os hasítás esetén mindkét NST fehérje kicsapódás nélkül kinyerhető volt, ezért a továbbiakban ezt a lépést 4°C-on végeztem.



22. ábra GST-NST₁₅₅₈-Mut15, GST-NST₃₅₄₉-Mut5 fehérjetisztítás SDS-PAGE elemzése. 4°C/18°C elúció: az NST elúciót megelőző trombin hasítás inkubációs hőmérsékletére utal. Piros nyíl jelöli a fehérjét, melyeknek ProtParam szerver használatával számolt elméleti molekulatömege GST-NST₃₅₄₉-Mut5: 38,63 kDa, illetve GST-NST₁₅₅₈-Mut15: 38,55 kDa. GRS Protein Ladder Multicolor-t használtam létraként.

Nagyobb léptékű fehérjetermelés és tisztítás eredményei

Ezután 500 ml LB kultúra léptékben termeltem és tisztítottam a GST-NST₁₅₅₈-Mut15, GST-NST₃₅₄₉-Mut5 és GST-NST₃₅₄₉ fehérjéket az előbbieken ismertetett eljárás során. A tisztítás a méretnövelt léptékben nem sikerült megfelelően, aminek feltételezhető oka a glutation oszlop nem elégséges mosása volt a trombin hasítást megelőzően. Az NST1/3 fehérjéket emiatt szennyezőkkel együtt mostam le az oszlopról (23. ábra), mely során szembetűnő volt az NST₃₅₄₉ másik két fehérjénél jelentősen kisebb termelési hatékonysága.

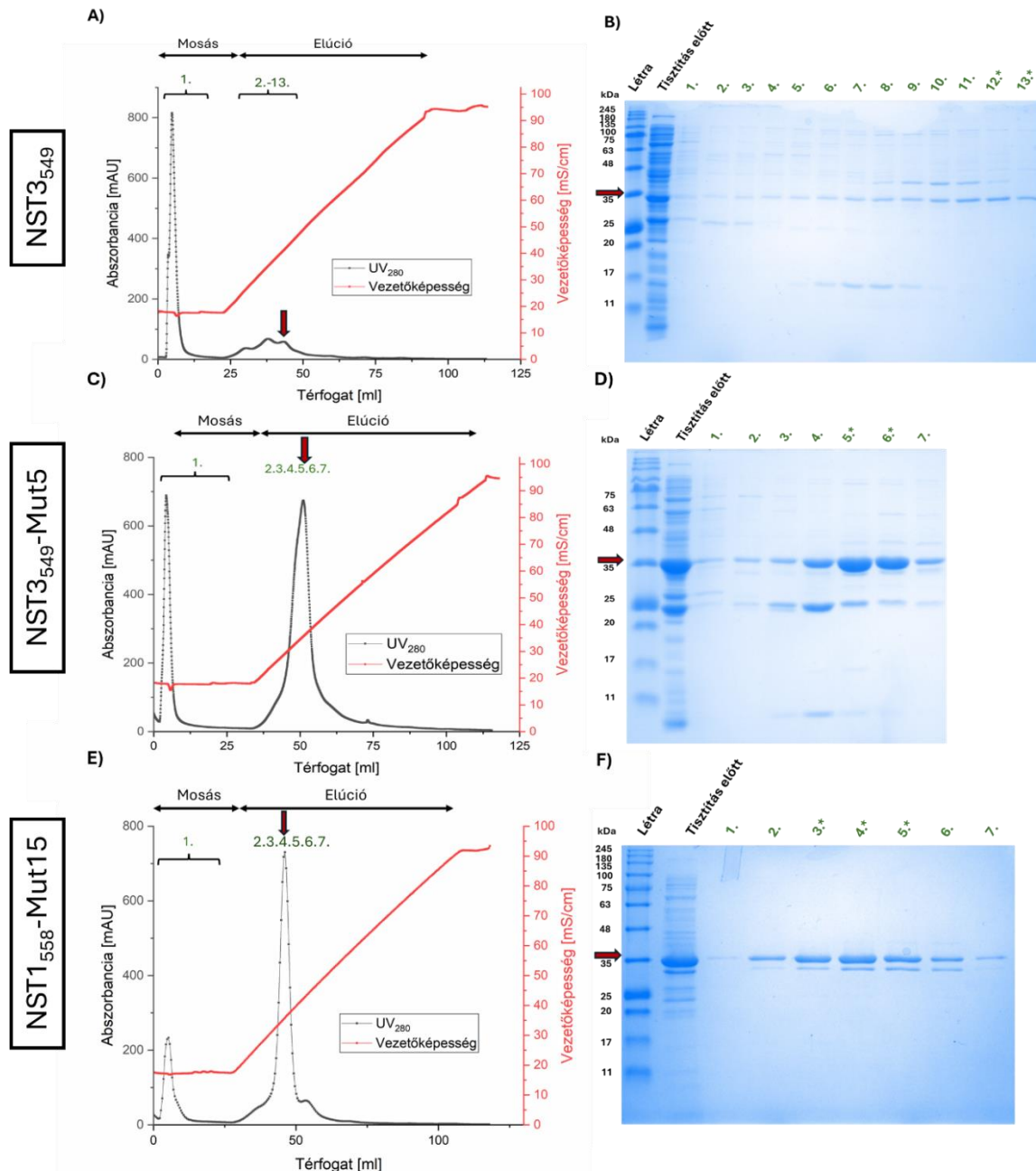


23. ábra GST-NST1/3 fehérjék 500 ml-es léptékű fehérje tisztítása. Piros nyíl jelöli a fehérjéket, melyeknek Protparam szerver használatával számolt elméleti molekulatömege NST3₅₄₉: 38,53 kDa, NST1₅₅₈-Mut15: 38,55 kDa, illetve NST3₅₄₉-Mut5: 38,63 kDa. Az NST3₅₄₉-Mut5 pellet mintavétel nem sikerült megfelelően, feltehetően emiatt nem látható fehérje abban a sávban. A csillaggal jelölt frakciókat egyesítettem az egyes konstruktok esetén, majd ezekkel dolgoztam tovább. GRS Protein Ladder Multicolor-t használtam létraként.

5.1.6. NST3 és NST1 fehérjék vizsgálata

Heparin affinitás kromatográfia

Annak érdekében, hogy az új fehérjéket megfelelő tisztaságban tudjam használni, heparin affinitás kromatográfiát alkalmaztam, kihasználva, hogy korábbi kísérleteim során az MBP-NST3 specifikusan kötődött a heparin oszlophoz (16. ábra). Az NST1/3 fehérje mintákat a glutation affinitás kromatográfia eljárás során 300 mM NaCl tartalmú pufferrel mostam a glutation gyantáról, emiatt a hatékony heparin affinitás kromatográfiás tisztítás előkészületeként a mintákat egy éjszakán át dializáltam 4°C-on 20 mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl puffer használatával. A heparin kromatográfiás elválasztás során mindhárom NST1/3 fehérje kötődött a heparin oszlophoz és arról a sóoldat koncentráció gradiens növelésével (150 mM-tól 1 M-ig) vált le. Az SDS-PAGE elemzés alapján az egyes NST fehérjék elúciója 340-405 mM NaCl koncentrációnál következett be (24. ábra) (2. táblázat). Hasonló sókoncentrációnál vált le a MBP-NST3₅₇₀ fehérje is a heparin oszlopról (2. táblázat). Mindhárom NST fehérje esetén az eredeti mintában jelen levő szennyezők többségét eltávolítottam, így a módszert sikeresen alkalmaztam fehérje tisztításra. Az egyes fehérjék csillag jellel megjelölt frakcióit egyesíttem és ezeket használtam a további vizsgálatokhoz.



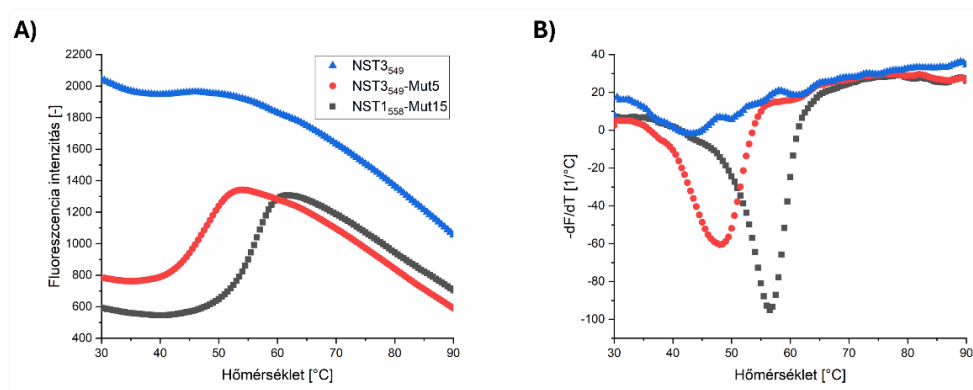
24. ábra. NST fehérjék heparin affinitás kromatográfiás tisztítása és vizsgálata. A) NST₃₅₄₉ kromatogram, B) NST₃₅₄₉ heparin tisztítás utáni SDS-PAGE elemzése, C) NST₃₅₄₉-Mut5 kromatogram, D) NST₃₅₄₉-Mut5 heparin tisztítás utáni SDS-PAGE elemzés E) NST₁₅₅₈-Mut15 kromatogram, F) NST₁₅₅₈-Mut15 heparin tisztítás utáni SDS-PAGE elemzés. Piros nyíl jelöli minden esetben a célfehérjét, és csillaggal jelöltem azokat a frakciókat, amiket továbbvittem a következő vizsgálatokhoz. A mosás 150 mM NaCl (Vezetőképesség=18 mS/cm) koncentrációt tartalmazó 'A' mosó pufferrel történt, majd a sógradiens 40 perc alatt emelkedett 1000 mM NaCl koncentrációig (Vezetőképesség=95 mS/cm). A méréseket AKTA-FPLC műszerrel végeztem ~ 6-10°C-on. GRS Protein Ladder Multicolort használtam létraként az SDS-PAGE gélen.

	<i>Vezetőképesség [mS/cm]</i>	<i>NaCl koncentráció [mM]</i>
<i>MBP-NST3₅₇₀</i>	36,66	356
<i>NST3₅₄₉</i>	41,03	404
<i>NST3₅₄₉-Mut5</i>	35,54	344
<i>NST1₅₅₈-Mut15</i>	35,93	348

2. táblázat: Előállított NST domének sógradiens hatására történő elúciója.

Termofluorimetriás hőstabilitás mérés

A heparin affinitás kromatográfia során tisztított NST3₅₄₉, NST3₅₄₉-Mut5 és NST1₅₅₈-Mut15 konstruktok hőstabilitását az MBP-NST3 fehérjéknél már alkalmazott (Eredmények és értékelésük 5.1.3) termofluorimetria módszerrel vizsgáltam a Kísérletek és módszerek 4.3.2 fejezetben leírtak alapján (25. ábra). A fehérjék oladási hőmérsékletét (T_m) a fluoreszcencia-hőmérséklet görbék (25. ábra/A) negatív deriváltjának (25. ábra/B) minimum értékéhez tartozó hőmérséklet leolvasásával állapítottam meg. Három párhuzamos mérést végeztem.



25. ábra: Az NST1₅₅₈-Mut15, NST3₅₄₉-Mut5, NST3₅₄₉ fehérjék hőstabilitás mérése termofluorimetriás módszerrel. A) A vizsgált fehérjék fluoreszcencia-hőmérséklet termofluorimetria görbéi. B) A fluoreszcencia-hőmérséklet görbék negatív deriváltja.

<i>Fehérje konstrukció</i>	<i>Oladási hőmérséklet (T_m) [°C]</i>
<i>NST1₅₅₈-Mut15</i>	$56,5 \pm 0,0$
<i>NST3₅₄₉-Mut5</i>	$48,2 \pm 0,3$
<i>NST3₅₄₉</i>	$43,3 \pm 0,6$

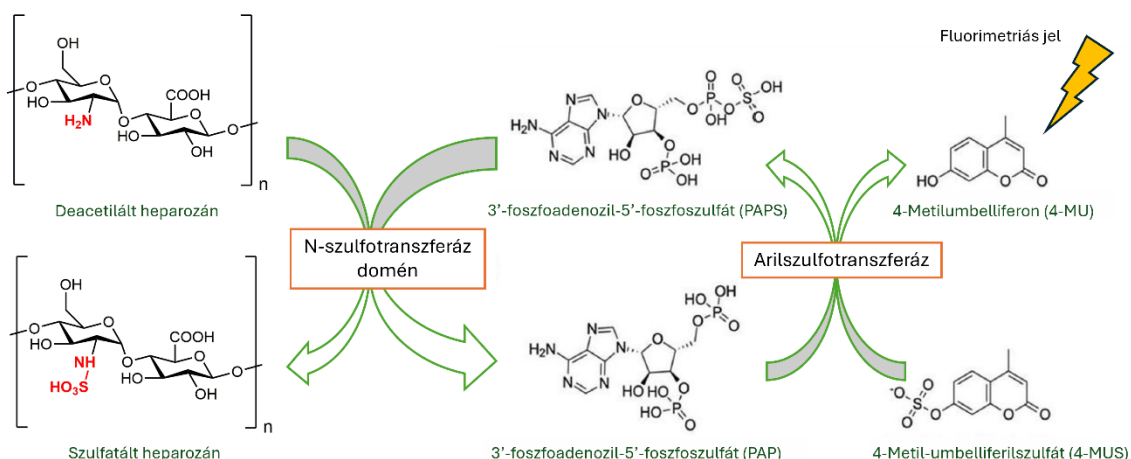
3. táblázat: NST fehérjék oladási hőmérséklete termofluorimetriás hőstabilitás mérés során.

Az egyes fehérjék termofluorimetria görbéi jelentősen eltérő jelleget mutattak. Az NST3₅₄₉ fehérje görbéje a korábban vizsgált MBP-NST fehérjék görbéihez hasonlóan (15. ábra) magas kezdeti fluoreszcenciát mutatott, azonban az NST3₅₄₉ esetén a T_m legalább meghatározható volt. Az NST3₅₄₉-Mut5 fehérje esetén a jól feltekeredett fehérjék termofluorimetria görbéjéhez sokkal hasonlóbb eredményt kaptam. E fehérje olvadáspontja 4,9°C-kal magasabb, mint a vad típusé, így az öt pontmutáció együttesen számottevően megnövelte a fehérje hőstabilitását. A Deng és mtsai. cikkben [28] hőstabilitásra optimalizált NST1₅₅₈-Mut15 fehérje olvadási hőmérséklete 8,3°C-kal haladta meg a NST3₅₄₉-Mut5 fehérje értékét (3. táblázat). Összességében mindhárom fehérje forma stabilabbnak tűnik a korábban kipróbált MBP-NST3 konstrukciónál. Ebben közrejátszhat az MBP helyett GST fúziós fehérje használata, a konstrukthatók változtatása, valamint a termelés körülményeinek változtatása is. Egyértelmű következtetés ugyanakkor nem vonható le ebből a kísérletből, hogy ezen hatások közül melyik okozza a jobb hőstabilitást. A hőstabilitási mutációk az NST3 esetén sikeresnek bizonyultak, így az NST3₅₄₉-Mut5 fehérje alkalmas lehet további N-szulfotranszferáz enzimátikus vizsgálatok elvégzésére.

5.2. Enzimaktivitás vizsgálatok

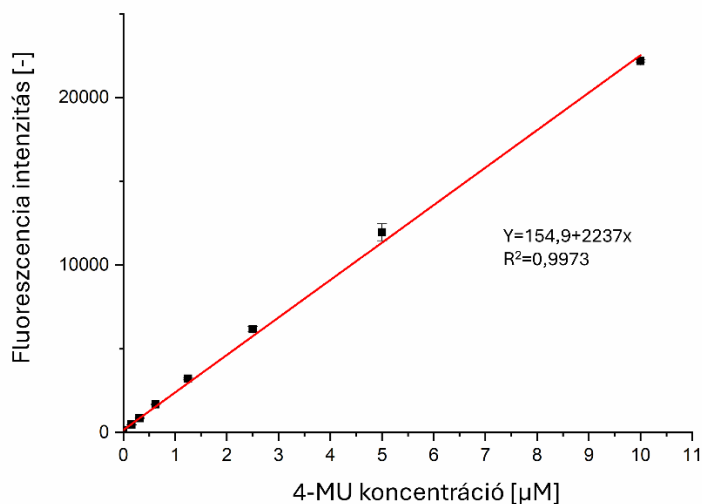
5.2.1. Enzimaktivitás mérés elve

A NST fehérjék N-szulfotranszferáz aktivitását egy irodalomban leírt, csatolt fluorimetriás enzim aktivitás módszer alapján vizsgáltam. [24], [31] A reakcióhoz a csoportunkban rendelkezésre álló dezacetilált heparozán poliszacharid szolgált az NST szubsztrátjaként (Kísérletek és módszerek 4.3.3). Az NDST N-szulfotranszferáz aktivitása során szulfát donorként a 3'-foszfoadenozil-5'-foszfoszulfát (PAPS) nukleotid kofaktort használja, melyből a reakció során 3'-foszfoadenozil-5'-foszfát (PAP) keletkezik. A kapcsolt reakcióban egy arilszulfotranszferáz segédenzim visszaalakítja a PAP molekulát az eredeti PAPS állapotba, miközben a fluorogén 4-metil-umbelliferil-szulfátról (4-MUS) veszi le a szulfát csoportot, melyből a fluoreszcens 4-metil-umbelliferon (4-MU) keletkezik (26. ábra).



26. ábra: Kapcsolt fluorimetriás N-szulfotranszferáz enzimaktivitás mérés elve

A csatolt enzim reakció adaptálásához számos kontroll vizsgálatot végeztem. A 4-MU fluoreszcencia koncentráció függését egy hét pontos, felező hígítás kalibrációval vizsgáltam. A vizsgált 0-10 μM tartományban a 4-MU fluoreszcencia jele egyenesen arányos volt az oldatbeli koncentrációval (27. ábra). A lineáris regresszióból kapott meredekséget használtam a továbbiakban az enzimaktivitás jellemzésére.



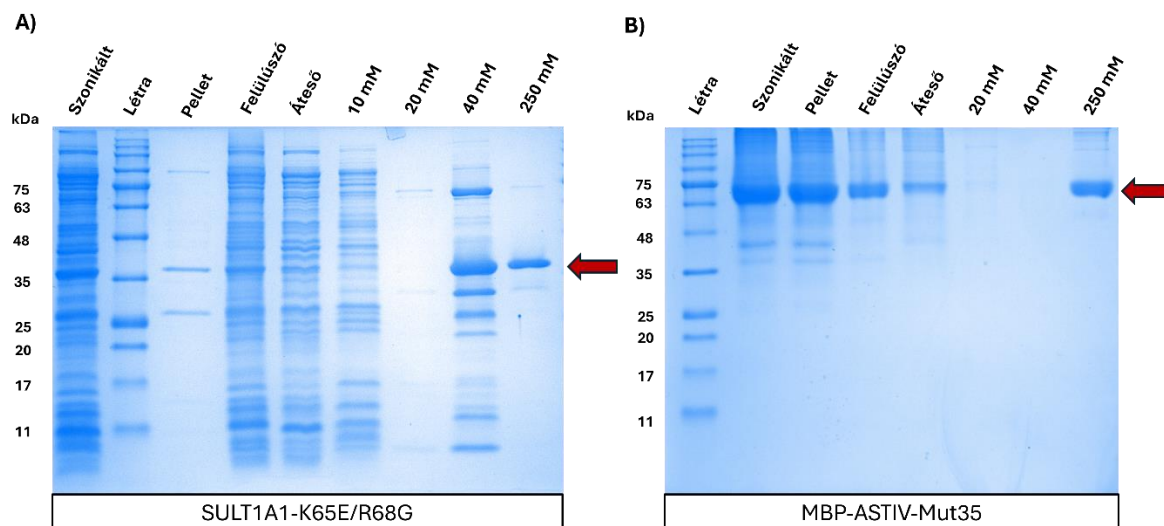
27. ábra. 4-metil-umbelliferon (4-MU) fluorimetriás jelének kalibrációja. A mérés során 3 párhuzamost mértem végpontméréssel 37°C-os inkubáció mellett, majd ezek átlagát vettem, és azt ábrázoltam.

5.2.2. Arilszulfotranszferáz segédenzim kiválasztása

Az arilszulfotranszferáz segédenzim az aktivitás mérés módszer kulcsreagense, mellyel szemben alapvető elvárás volt, hogy a csatolt enzim rendszerben létrehozott fluoreszcencia növekedés jel valóban az NST reakcióhoz legyen köthető. Emellett a segédenzim minél nagyobb NST-hez viszonyított aktivitása előnyös a csatolt enzim reakció során. Az irodalomban patkány arilszulfotranszferáz enzimet használtak az NDST vagy NST reakciók segédenzimeként. [24], [31] Ezt az enzimet egyaránt említik SULT1A1, illetve Arylsulfotransferase IV (ASTIV) neveken. Ez az enzim reverzibilis működése során a szulfotranszferáz reakció mindkét irányba történő lejátszódását ($\text{PAP} \rightarrow \text{PAPS}$ és $\text{PAPS} \rightarrow \text{PAP}$) lehetővé teszi. Az egyik alkalmazott segédenzim forma a SULT1A1-K65E/R68G volt, mely két mutációja révén a szulfát transzfer reakcióban a $\text{PAP} \rightarrow \text{PAPS}$ átalakítás vált preferálttá, [32] így 4-MUS szulfát donor jelenlétében a PAPS visszaalakítására volt használható a csatolt enzim reakcióban [31] (26. ábra). Az arilszulfotranszferáz másik formáját az NST1 hőstabilizált mutánst leíró Deng és mtsai. cikk [28] említette. Az enzim aktivitásának megnöveléséhez harmincöt helyen hoztak létre pontmutációt és MBP fúziós fehérje formában állították elő. Az eredeti közleményekben használt megjelöléseket követve erre a két enzim formára a továbbiakban SULT1A1-K65E/R68G, illetve MBP-ASTIV-Mut35 nevekkkel hivatkozom.

Mindkét arilszulfotranszferáz enzimet előállítottam, majd összehasonlítottam alkalmazhatóságukat az NST enzimaktivitás mérés során. A SULT1A1-K65E/R68G enzim pET-19b expressziós plazmidja csoportunkban rendelkezésre állt, gén szintézise az Atienza és mtsai. leírását követte [31]. A plazmidot *E. coli* Rosetta (DE3) sejtekbe transzformáltam, majd 500 ml LB inokulálását követően a kultúra OD=0,6 optikai denzitás elérésekor 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltam a fehérjetermelést. A fehérjetermelés egy éjszakán át zajlott 16 °C-on. A fehérje tisztítását Ni-NTA oszlopon végeztem (28. ábra/A). A kísérletek során megfelelő mennyiségű (12 mg) és tisztaságú enzim mintát nyertem.

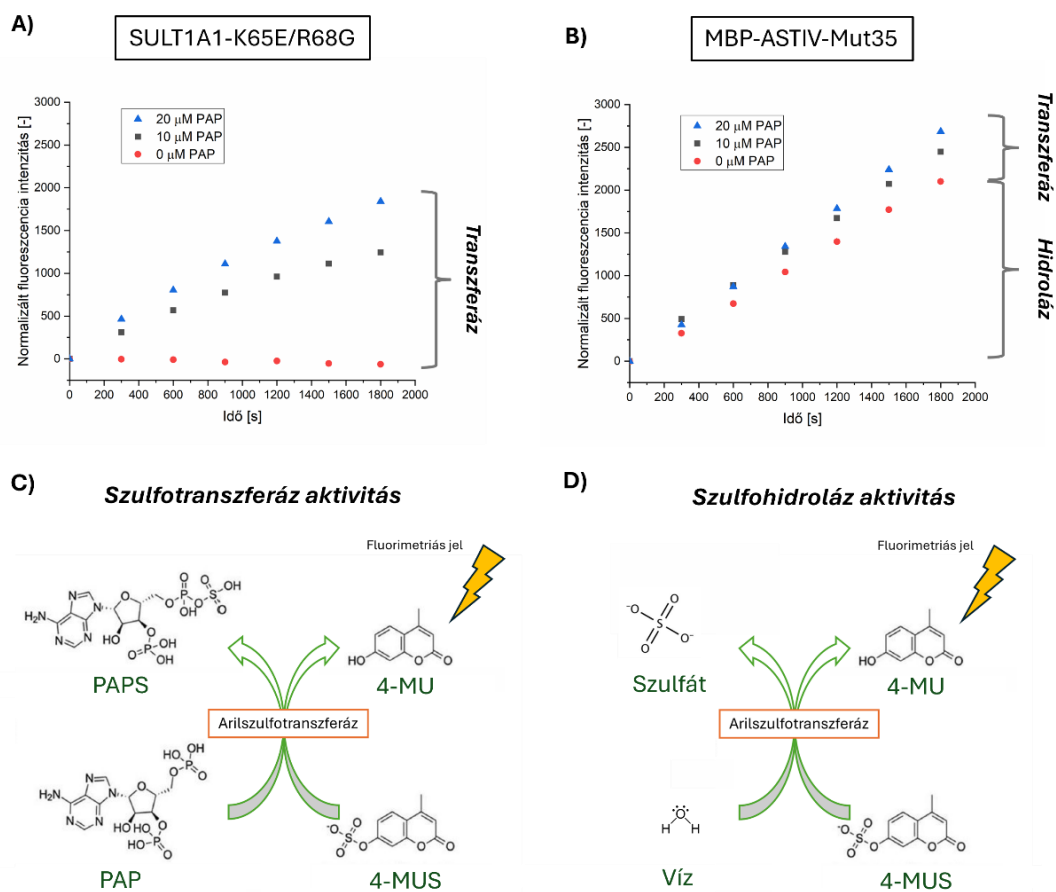
Az MBP-ASTIV-Mut35 esetén a plazmidot a Deng és mtsai. cikknek [28] megfelelően pMAL-c5-x expressziós vektorban rendeltük gén szintézissel a GeneUniversal cégtől témavezetőmmel közösen. A beérkezett plazmiddal *E. coli* Origami B (DE3) törzset transzformáltam, majd 500 ml LB inokulálását követően a kultúra OD=0,8 optikai denzitás elérésekor 0,2 mM IPTG hozzáadásával indukáltam a fehérjetermelést, mely 20 órán át 22°C-on történt. Az MBP-ASTIV-Mut35 fehérjét is eredményesen tisztítottam Ni-NTA oszlopon (28. ábra/B).



28. ábra: A) SULT1A1-K65E/R68G és B) MBP-ASTIV-Mut35 fehérje tisztítása Ni-NTA oszlopon. Rövidítések: 10-20-40-250 mM koncentrációk mind az oldat imidazol tartalmára vonatkoznak. Piros nyíl jelöli a fehérjék méretét: 36,57 kDa (SULT1A1-K65E/R68G), 79,40 kDa (MBP-ASTIV-Mut35).

Mindkét arilszulfotranszferáz esetén kipróbáltam a segédenzim reakcióját, 1 μ M enzim mennyiséget alkalmazva és a PAP (SULT1A1 szubsztrát) koncentrációt 0-20 μ M tartományban változtatva (Kísérletek és módszerek 4.3.3-as fejezet). A kiértékelés során a kinetikai görbékből kivontam az arilszulfotranszferáz enzim nélküli kontroll jelét.

A SULT1A1-K65E/R68G vizsgálatokor fluoreszcencia növekedést csak PAP hozzáadásakor tapasztaltam (29. ábra/A), azonban az MBP-ASTIV-Mut35 enzim reakciója esetén 0 μ M PAP koncentráció mellett is jelentős fluoreszcencia növekedés adódott, amelyet arányosan kisebb mértékben növelt a PAP jelenléte (29. ábra/B). A PAP nélküli fluoreszcencia növekedés vélhetően a segédenzim kívánt szulfotranszferáz aktivitása (29. ábra/C) helyett 4-MUS szulfohidroláz aktivitását jelezheti (29. ábra/D). Mindez jelentős háttérjelet és hibát okozhat az N-szulfotranszferáz csatolt enzim reakció során. Emiatt a két vizsgált arilszulfotranszferáz közül a hidroláz hatást nem mutató SULT1A1-K65E/R68G enzimet használtam enzimaktivitás vizsgálatokhoz.

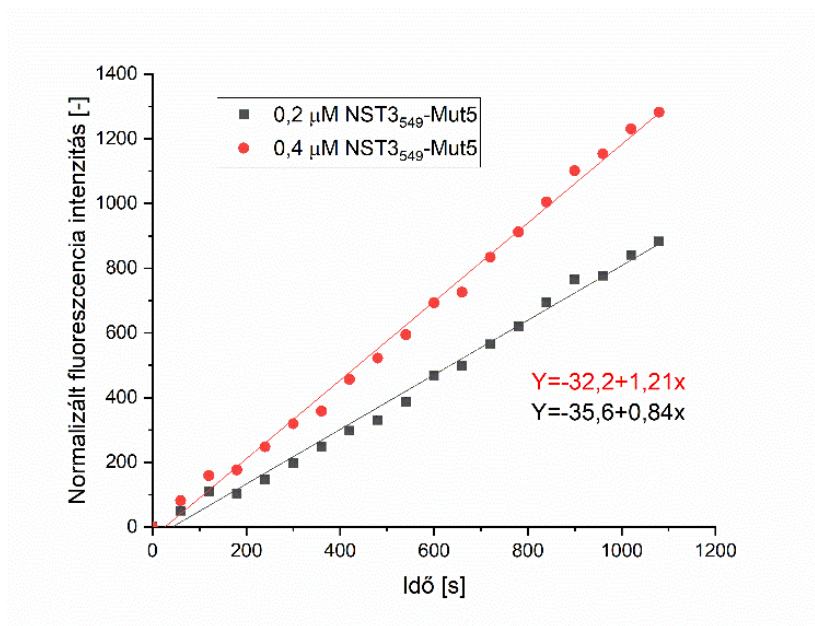


29. ábra: Arilszulfotranszferáz segédenzimek reakciója és aktivitásmérése. A) SULT1A1-K65E/R68G enzim aktivitása különböző PAP koncentrációk esetén. B) MBP-ASTIV-Mut35 enzim aktivitása különböző PAP koncentrációk esetén. C) Segédenzim kapcsolt szulfotranszferáz reakciója D) Segédenzim szulfhidroláz reakciója.

5.2.3. N-szulfotranszferáz konstrukciók enzimaktivitás vizsgálata

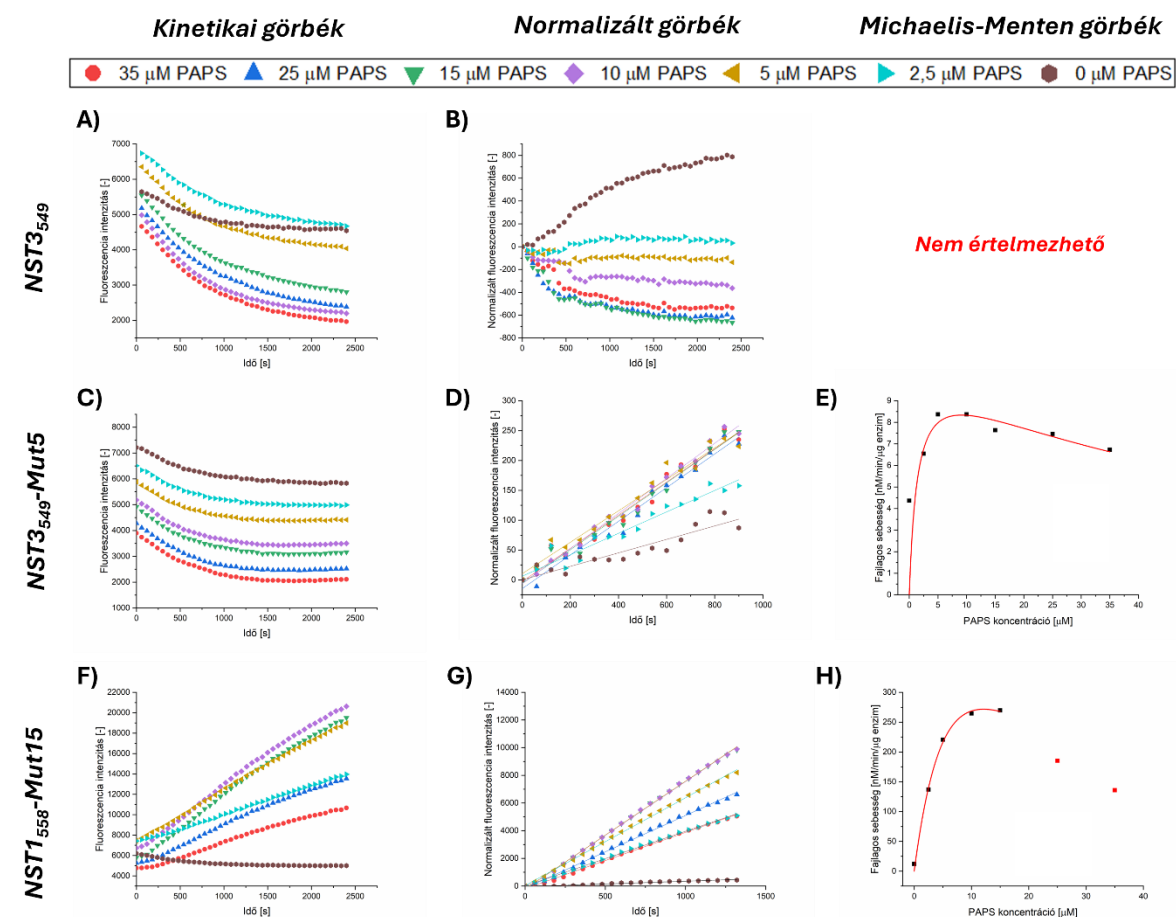
A kapcsolt enzimaktivitás módszer fontos feltétele, hogy a fluorimetriás jel valóban az N-szulfotranszferáz működését jellemezze. Ehhez a mérési körülmények közt a segédenzim gyorsabb működésének biztosítására van szükség, hogy az NST enzim katalizálhassa a sebességhatározó lépést. A sebességhatározó lépés kísérletes ellenőrzésére megvizsgáltam, hogy ugyanakkora segédenzim mennyiség esetén, az NST koncentráció növelésének hatására hogyan változik az aktivitás. Amennyiben a SULT1A1-K65E/R68G reakciója a sebességhatározó lépés, az aktivitása a két mérési pontnak nem fog változni, azonban ha a segédenzim gyorsabb, az NST koncentráció kétszeres növelésével a sebesség is arányosan nő. Rögzített 4 μ M SULT1A1-K65E/R68G segédenzim és 20 μ M PAPS kofaktor mellett elvégeztem a csatolt enzim reakciót 0,2 μ M, illetve 0,4 μ M NST₃₅₄₉-Mut5 használatával. A kiértékelés során kivontam a megfelelő NST nélküli kontrollokat a kinetikai görbékből, a kezdeti fluoreszcencia értékek kivonása után, majd a lineáris szakaszokra egyenest

illesztettem. A 0,4 μM NST3₅₄₉-Mut5 körülmény esetén az egyenes meredeksége kb. 1,5-szer nagyobbak adódott (30. ábra). Mindez igazolja, hogy a vizsgált körülmények közt az NST3 enzim reakciója legalább részlegesen sebességhatározó jellegű. A vizsgált rendszerben a reakciósebesség NST koncentrációval azonos mértékű növekedését korlátozhatja, hogy nem teljesül a Michaelis-Menten kinetika azon alapfeltétele, hogy az enzim szubsztráthoz képest elhanyagolható mennyiségben van jelen. A további kísérleteket 3 μM SULT1A1-K65E/R68G és 0,1 μM NST1/3 használatával végeztem.



30. ábra: Sebességhatározó lépés vizsgálata az enzim aktivitás mérés során. NST3₅₄₉-Mut5: 0,2 és 0,4 μM mennyiségének hatása 4 μM SULT1A1-K65E/R68G segédenzim, 4 mM 4-MUS, 20 μM PAPS, és 0,6 mg/ml dezacetilált heparozán tartalmú reakciókban.

A kapcsolt enzimreakció körülményeinek beállítása után megvizsgáltam az NST3₅₄₉, NST3₅₄₉-Mut5 és NST1₅₅₈-Mut15 enzimek aktivitásának PAPS koncentráció függését 0,6 mg/ml N-dezacetilált heparozán jelenlétében, két párhuzamos mérést végezve a Kísérletek és módszerek 4.3.3 fejezetben leírt eljárást követve (31. ábra).



31. ábra: Az *N*-szulfotranszferáz konstruktok enzimaktivitás mérése. A bal oldali oszlopban találhatóak a kinetikai görbék mindhárom konstrukt esetén (A,C,F), a középső oszlopban azok a görbék, amik az origóból indulnak, és ki van belőlük vonva az NST mentes kontroll (B,D,G), a jobb szélső oszlopban pedig a meredekségekből számított fajlagos sebesség alapján a Michaelis-Menten görbék a szubsztrát koncentráció függvényében. Az NST3₅₄₉ konstrukt esetén a görbék alapján nem lehetett fajlagos sebességet értelmezni.

Fehérje	$v_{max, látsz.}$ [nM/min/μg enzim]	$K_m, látsz.$ [μM]	$K_i, látsz.$ [μM]
NST3 ₅₄₉ -Mut5	11±7,2	1,5±3,2	56±118
NST1 ₅₅₈ -Mut15	710±39	9,8±7,1	15,0±15,5

4. táblázat: Nem-lineáris illesztés alapján látszólagos Michaelis-Menten kinetikai állandók

A 31. ábra alapján az eredeti kinetikai görbék (A,C,F) mindegyikén megfigyelhető fluoreszcencia csökkenés hatása. Ennek feltételezett oka a 4-MU vagy a 4-MUS mennyiségének csökkenése az oldatban, melyet okozhat e reagensek kicsapódása, vagy fotodestrukciója az inkubáció során. E hatást az eredeti kinetikai görbék NST mentes, 20 μM PAPS kofaktort tartalmazó kontroll kivonásával próbáltam eliminálni a kiértékelés során. A kivonás

után a kezdő fluoreszcencia értékek 0-ba eltolásával kaptam normalizált kinetikai görbéket (31. ábra/B,D,G). Az ekkor kapott görbék vizsgálatakor, a B ábra (NST3 vad) esetén a fluoreszcencia értékek látszólagos csökkenését tapasztaltam. Mindez a PAPS szubsztrát inhibíciójának erőteljes hatását mutatta. Itt vált szembetűnővé, hogy a PAPS koncentráció hatását nem vettem figyelembe a kontroll kivonásakor, hiszen mindig a 20 μM PAPS reakcióhoz tartozó NST mentes kontrollt használtam a kivonáshoz, ami egy PAPS koncentráció függő torzítást adott a kiértékelés során. A továbbiakban szükségszerű lesz az egyes mérési pontokból a megfelelő PAPS koncentrációt tartalmazó NST mentes kontroll kivonása a korrekt kiértékeléshez.

Az enzimek Michaelis-Menten görbéinek ábrázolása (31. ábra/E,H) során a vad típusú enzim (NST₃₅₄₉) esetében az adatok alapján nem voltak meghatározhatók a kinetikai paraméterek, amit az enzim limitált stabilitása, valamint a mérés során említett torzítások okozhattak. Az NST₁₅₅₈-Mut15 és NST₃₅₄₉-Mut5 enzimek aktivitását szubsztrát inhibíciós kinetikai modell illesztésével jellemeztem, ahol az NST₁₅₅₈-Mut15 esetén nem vettem figyelembe a 25, 35 μM PAPS koncentráció mérési pontokat, a tapasztalt markáns szubsztrát inhibíciós jelleg miatt. (31. ábra, 4. táblázat). Noha az eredmények értelmezését korlátozza a kontroll választás problémája és szubsztrát inhibíció, egyértelműnek látszik az NST₃₅₄₉-Mut5 enzim aktivitása, melynél több tízszer nagyobb lehet az NST₁₅₅₈-Mut15 aktivitása. Mindez ugyanakkor összhangban van az egér NDST1 és NDST3 izoenzimek korábban meghatározott szulfotranszferáz aktivitásainak relációjával (1. táblázat, [20]).

6. Összefoglalás

6.1. Módszerfejlesztés az NST3 domén rekombináns előállítására

Kutatómunkám célja a heparán szulfát bioszintézis egy kulcsenzimének, a bifunkciós heparán szulfát N-dezacetiláz/N-szulfotranszferáz 3 (NDST3) enzim N-szulfotranszferáz doménjének (NST3) rekombináns előállítása és biokémiai jellemzése volt. Munkám során támpontot jelentettek az NDST1 enzim NST1 doménjének irodalomban leírt korábbi termelése *E. coli* expressziós rendszerben, az NST3 fehérje előállítása során ezen eljárások alkalmazhatóságát próbáltam ki.

Kutatásom során kialakítottam egy olyan fehérje termelési eljárást, mely révén hőstabil és enzimatikusan aktív NDST3 szulfotranszferázt tudtam létrehozni *E. coli* expressziós rendszerben. E folyamat számos lépésénél sikeresen alkalmaztam módszerfejlesztési lehetőségeket. A fehérje konstrukció tervezése során megvizsgáltam az NST3 domén határainak, valamint különböző fúziós fehérjék változtatásának hatását a rekombináns fehérje termelésre. Az NST3 rekombináns előállítása sikeres volt mindhárom vizsgált N-terminális domén határ esetén (NST3₅₄₉₋₈₇₃, NST3₅₇₀₋₈₇₃, NST3₅₉₃₋₈₇₃), amit vélhetően nagyban elősegített a hozzájuk fuzionált His₆-MBP és GST fehérjék hatása. E fúziós fehérjék a sejtfeltárást követő affinitás kromatográfiás tisztítás módját is meghatározták, a Ni-NTA, illetve glutation oszlopos elválasztások a vártnak megfelelően egyaránt jól bevált és hatékony módszereknek bizonyultak. A glutation oszlopos tisztítás során egy jelentős előnyként azonosítottam a gyantán megkötött GST-NST3 fehérje trombin proteolitikus hasításának lehetőségét, mely a fúziós fehérje hatékony eltávolítását is eredményezte az affinitás kromatográfiás tisztítás során. A GST és MBP fúziós fehérjék egyaránt elősegítik a rekombináns fehérjetermelést *E. coli* expressziós rendszerben, megnövelve a termelt fehérje oldhatóságát és a termelési hozamot. [34] A fúziós fehérjék aggregációt megakadályozó hatása azonban esetenként úgy stabilizálhatja a termelt fehérjét oldható állapotban, hogy a jól feltekeredett fúziós fehérjét egy szerkezeti instabilitással rendelkező célfehérje szakasz követhet, mintegy ‘oldható aggregátum’ formában. [35] Vizsgálataim alapján ez a hatás valószínűsíthető az MBP-NST3 konstruktok esetén is, melyre a tisztított fehérjék limitált oldatbeli stabilitása, hőstabilitása (Eredmények és értékelésük 5.1.3) utal.

A fehérje termelés és tisztítás számos lépésének optimalizációja javíthatná a célfehérje oldatbeli stabilitását, ideértve az alkalmazott pufferek összetételét, illetve a His₆-MBP-NST3 fehérje amilóz affinitás kromatográfia alapú tisztítását, mely során az elúciót végző 10-20 mM maltóz várhatóan kevésbé zavarja a fehérje oldatbeli stabilitását, mint a Ni-NTA elúciókor alkalmazott 250 mM imidazol. Kutatómunkám során azonban ezeket az optimalizációs lehetőségeket nem vizsgáltam, ehelyett várhatóan stabilizáló szerkezeti hatású helyspecifikus mutációkat terveztem hőstabil és enzimatikusan aktív GST-NST3₅₄₉-Mut5 létrehozására.

6.2. NST3/NST1 szulfotranszferázok előzetes összehasonlító vizsgálata

A NST3 enzimatikusan vizsgálható formájának előállításához egy friss irodalmi analógiát követve [28], NST1-3 szekvencia és szerkezeti modell összehasonlítások alapján terveztem egy öt mutációt tartalmazó GST-NST3₅₄₉-Mut5 fehérje formát. Az NST3 szulfotranszferáz működésének jellemzéséhez ezt a reagenst egy, a fenti közleményben leírt, hőstabilizáló mutációkat tartalmazó GST-NST1₅₅₈-mut15 konstrukcióval hasonlítottam össze. Az NST3 hőstabilizáló mutációk hatásának értelmezéséhez előállítottam továbbá a GST-NST3₅₄₉ eredeti fehérje formát is. Mindhárom fehérje forma rekombináns termelése sikeres volt, a GST-NST3₅₄₉ esetén azonban jelentősen kisebb fehérje mennyiség keletkezett.

A termofluorimetriás mérések az NST3₅₄₉ limitált oldatbeli stabilitásával szemben NST3₅₄₉-Mut5 megfelelő hőstabilitását jelezték, ami a pontmutáció tervezési stratégia hatékonyságát mutatja. Az NST fehérjék heparin affinitás kromatográfiás vizsgálatai alkalmasak voltak a fehérje preparátum hatékony tisztítására, valamint a fehérjék heparin inhibitor kötését is igazolták. Végül reagens és reakció körülmény optimalizációk után sikeresen alkalmaztam egy csatolt fluorimetriás enzimaktivitás módszert a hőstabilizált NST3₅₄₉-Mut5 és NST1₅₅₈-Mut15 fehérjék aktivitásának jellemzésére. Méréseim alapján az NST1₅₅₈-Mut15 több tízszeres aktivitással rendelkezett az NST3₅₄₉-mut5 fehérjéhez képest, ami megfelel az irodalomban szereplő aktivitás aránynak. Az enzimaktivitás mérés a jövőben további lépésekkel javítható, úgymint a megfelelő kontroll használata minden mérési pontban, valamint a szubsztrát koncentráció tartomány csökkentése a mérés során.

6.3. További kutatási tervek

Az NST fehérje előállítása és a bemutatott előzetes biokémiai vizsgálatok a dolgozatban vázolt szükséges optimalizációs lépések figyelembevételével egy olyan összetett kísérletes elrendezés gerincét adják, mely a vizsgált NST enzimekre hatékony előállítási és tisztítási módszereket biztosíthat. A folyamaton belül kulcsfontossággal bír a fehérje tervezés lépése, ahol a hőstabilizációt célzó, de a szubsztrátkötés és enzimatis hatékonyaságot közvetlenül nem befolyásoló mutációk alkalmazása képes lehet korrigálni a nem megfelelő fehérjetermelés, és/vagy oldatbeli stabilitás okozta szűk keresztmetszeteket a fehérje előállítás során. Ezen jellemzők alapján a kísérleteim során optimalizált eljárás jó eséllyel lehetőséget biztosíthat az NST2, NST4 enzim domének előállítására is, és így a négy humán NDST szulfotranszferáz aktivitás átfogó vizsgálatára.

Az előállított NST3₅₄₉-mut5 fehérje alkalmas további szerkezeti és funkcionális vizsgálatokra, így a jövőben kristályosítani tervezem, majd sikeres fehérje egykristály növekedés esetén szerkezetét röntgenkristallográfia alapján tervezem meghatározni. Az enzim-szubsztrát kötés erősségének felderítéséhez szubsztrátkötés vizsgálatokat is szeretnék végezni, izotermális titrációs kalorimetria (ITC) vagy bioréteg interferometria (BLI) segítségével. Az NST fehérjék előállítása és előzetes biokémiai vizsgálata szempontjából meghatározó kutatásaim lehetővé tehetik az NST3 és NST1 szulfotranszferáz aktivitás különbségek molekuláris hátterének részletesebb vizsgálatát. Az Irodalmi áttekintés 2.4.3 fejezete alapján, az NST3 K629E/P732S/E734K kombinált helyspecifikus mutációt tartalmazó formáját a jelen dolgozat eredményei okán érdemesnek tartom előállítani, majd jellemezni enzimatis aktivitását és HS szubsztrát kötő képességét. Ezen mutáns tulajdonságainak összehasonlítása a vad típusú aktív hellyel rendelkező hőstabil konstrukcióval fontos információkkal szolgálhat az NDST1/3 enzimek szulfotranszferáz aktivitásának értelmezéséhez.

Irodalomjegyzék

- [1] R. V. Iozzo and L. Schaefer, “Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans,” *Matrix Biol.*, vol. 42, pp. 11–55, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.003.
- [2] A. Varki and P. Gagneux, “Biological functions of glycans,” in *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, and P. H. Seeberger, Eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
- [3] T. Annaïval, R. Wild, Y. Créton, R. Sadir, R. R. Vivès, and H. Lortat-Jacob, “Heparan sulfate proteoglycans biosynthesis and post synthesis mechanisms combine few enzymes and few core proteins to generate extensive structural and functional diversity,” *Molecules*, vol. 25, no. 18, Sep. 2020, doi: 10.3390/molecules25184215.
- [4] C. L. R. Merry, U. Lindahl, J. Couchman, and J. D. Esko, “Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans,” in *Essentials of Glycobiology*, 4th ed., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, and P. H. Seeberger, Eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
- [5] X. Zhang, F. Wang, and J. Sheng, “‘Coding’ and ‘Decoding’: hypothesis for the regulatory mechanism involved in heparan sulfate biosynthesis,” *Carbohydr. Res.*, vol. 428, pp. 1–7, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.carres.2016.04.002.
- [6] S. N. Baytas and R. J. Linhardt, “Advances in the preparation and synthesis of heparin and related products,” *Drug Discov. Today*, vol. 25, no. 12, pp. 2095–2109, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.drudis.2020.09.011.
- [7] B. J. Connell and H. Lortat-Jacob, “Human immunodeficiency virus and heparan sulfate: from attachment to entry inhibition,” *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 385, Nov. 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00385.
- [8] D. Soares da Costa, R. L. Reis, and I. Pashkuleva, “Sulfation of glycosaminoglycans and its implications in human health and disorders,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 19, pp. 1–26, Jun. 2017, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044610.
- [9] M. Mohammadi, S. K. Olsen, and R. Goetz, “A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 506–516, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.sbi.2005.09.002.
- [10] Y. Monneau, F. Arenzana-Seisdedos, and H. Lortat-Jacob, “The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 99, no. 6, pp. 935–953, Jun. 2016, doi: 10.1189/jlb.3MR0915-440R.

- [11] B. J. Connell *et al.*, “Heparan sulfate differentially controls CXCL12 α - and CXCL12 γ -mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4.,” *Sci. Signal.*, vol. 9, no. 452, p. ra107, Nov. 2016, doi: 10.1126/scisignal.aaf1839.
- [12] I. Björk and U. Lindahl, “Mechanism of the anticoagulant action of heparin.,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 48, no. 3, pp. 161–182, Oct. 1982, doi: 10.1007/bf00421226.
- [13] E. Vilanova, A. M. F. Tovar, and P. A. S. Mourão, “Imminent risk of a global shortage of heparin caused by the African Swine Fever afflicting the Chinese pig herd.,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 17, no. 2, pp. 254–256, Feb. 2019, doi: 10.1111/jth.14372.
- [14] H. Liu, Z. Zhang, and R. J. Linhardt, “Lessons learned from the contamination of heparin.,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 26, no. 3, pp. 313–321, Mar. 2009, doi: 10.1039/b819896a.
- [15] Z. Zhang *et al.*, “Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 39, pp. 12998–13007, Oct. 2008, doi: 10.1021/ja8026345.
- [16] R. Karlsson *et al.*, “Dissecting structure-function of 3-O-sulfated heparin and engineered heparan sulfates.,” *Sci. Adv.*, vol. 7, no. 52, p. eabl6026, Dec. 2021, doi: 10.1126/sciadv.abl6026.
- [17] D. C. Briggs and E. Hohenester, “Structural basis for the initiation of glycosaminoglycan biosynthesis by human xylosyltransferase 1.,” *Structure*, vol. 26, no. 6, pp. 801–809.e3, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.str.2018.03.014.
- [18] J. Kreuger and L. Kjellén, “Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability.,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 60, no. 12, pp. 898–907, Dec. 2012, doi: 10.1369/0022155412464972.
- [19] Y. Kakuta, L. Li, L. C. Pedersen, L. G. Pedersen, and M. Negishi, “Heparan sulphate N-sulphotransferase activity: reaction mechanism and substrate recognition.,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, no. 2, pp. 331–334, Apr. 2003, doi: 10.1042/bst0310331.
- [20] J. Aikawa, K. Grobe, M. Tsujimoto, and J. D. Esko, “Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 8, pp. 5876–5882, Feb. 2001, doi: 10.1074/jbc.M009606200.
- [21] S. R. Pallerla *et al.*, “Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 24, pp. 16885–16894, Jun. 2008, doi: 10.1074/jbc.M709774200.
- [22] T. Lencz *et al.*, “Genome-wide association study implicates NDST3 in schizophrenia and bipolar disorder.,” *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2739, 2013, doi: 10.1038/ncomms3739.

- [23] Q. Tang, M. Liu, Y. Liu, R.-D. Hwang, T. Zhang, and J. Wang, “NDST3 deacetylates α -tubulin and suppresses V-ATPase assembly and lysosomal acidification,” *EMBO J.*, vol. 40, no. 19, p. e107204, Oct. 2021, doi: 10.15252/embj.2020107204.
- [24] C. J. Mycroft-West *et al.*, “Structural and mechanistic characterization of bifunctional heparan sulfate N-deacetylase-N-sulfotransferase 1,” *Nat. Commun.*, vol. 15, no. 1, p. 1326, Feb. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-45419-4.
- [25] S. D. Vallet *et al.*, “Functional and structural insights into human N -deacetylase/ N -sulfotransferase activities,” *Proteoglycan Res.*, vol. 1, no. 3, Jul. 2023, doi: 10.1002/pgr2.8.
- [26] Y. Kakuta, T. Sueyoshi, M. Negishi, and L. C. Pedersen, “Crystal structure of the sulfotransferase domain of human heparan sulfate N-deacetylase/ N-sulfotransferase 1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 16, pp. 10673–10676, Apr. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.16.10673.
- [27] J. J. Weinstein, A. Goldenzweig, S. Hoch, and S. J. Fleishman, “PROSS 2: a new server for the design of stable and highly expressed protein variants,” *Bioinformatics*, vol. 37, no. 1, pp. 123–125, Apr. 2021, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa1071.
- [28] J.-Q. Deng *et al.*, “Biosynthetic production of anticoagulant heparin polysaccharides through metabolic and sulfotransferases engineering strategies,” *Nat. Commun.*, vol. 15, no. 1, p. 3755, May 2024, doi: 10.1038/s41467-024-48193-5.
- [29] X. Xi *et al.*, “Improvement of the stability and catalytic efficiency of heparan sulfate N-sulfotransferase for preparing N-sulfated heparosan,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 50, no. 1, Feb. 2023, doi: 10.1093/jimb/kuad012.
- [30] S. Xiong, L. Zhang, and Q.-Y. He, “Fractionation of proteins by heparin chromatography,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 424, pp. 213–221, 2008, doi: 10.1007/978-1-60327-064-9_18.
- [31] J. Atienza, I. Tkachyova, M. Tropak, X. Fan, and A. Schulze, “Fluorometric coupled enzyme assay for N-sulfotransferase activity of N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST),” *Glycobiology*, vol. 31, no. 9, pp. 1093–1101, Sep. 2021, doi: 10.1093/glycob/cwab048.
- [32] Y. S. Yang *et al.*, “Two phenol sulfotransferase species from one cDNA: nature of the differences,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 8, no. 4, pp. 423–429, Dec. 1996, doi: 10.1006/prep.1996.0120.
- [33] Z. Wang *et al.*, “Control of the heparosan N-deacetylation leads to an improved bioengineered heparin,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 91, no. 1, pp. 91–99, Jul. 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3231-5.
- [34] D. Esposito and D. K. Chatterjee, “Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 353–358, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003.

- [35] S. Raran-Kurussi, K. Keefe, and D. S. Waugh, “Positional effects of fusion partners on the yield and solubility of MBP fusion proteins.,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 110, pp. 159–164, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.pep.2015.03.004.

Függelék

F1 Molekuláris klónozáshoz használt oligonukleotidok

NÉV	5'-3' SZEKVENCIA	FEHÉRJE KONSTRUKCIÓ
P265_ST_D570_NOT1_FOR	gatcGCGGCCGCgaccctctgtggcagaaccctg	MBP-NST3 ₅₇₀
P266_ST_R873_ECORI_REV	gatcGAATTCtcatctcactttctgcagctcctgcctc	MBP-NST3 ₅₇₀
P284_NST3_594R_NOT1_FOR	gtacGCGGCCGCcgtctgccgaaattcctggttattggtc	MBP-NST3 ₅₉₃
P285_ST_R873_ECORI_REV	gatcGAATTCttattaacgcactttctgcagttcctgacg	MBP-NST3 ₅₉₃
GST-NST3WT FOR	cagtGAATTCctgcagaccctgccgc	GST-NST3 ₅₄₉
P274_NST3_873_XHO REV	attgCTCGAGttattaacgcactttctgcagttcctgacgcag	GST-NST3 ₅₄₉

F1 táblázat A molekuláris klónozáshoz használt DNS oligonukleotidok.

F2 Termelt fehérjék aminosav szekvenciái

A fehérjeszekvenciák jelölése során a **vastag betűk** mutatják a célfehérjét, az aláhúzott betűk az ehhez kapcsolódó fúziós fehérjét, a *dőlt betűk* pedig az egyéb fontos molekula részleteket, például His-tag, vagy TEV proteáz hasítóhely.

F2.1. MBP-NST3₅₇₀

MKIHHHHHHEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQ
VAATGDGPDIIFWAHDREFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAY
PIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAAD
GGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNNKHMNADTDYSIAEAAFNK
GETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELA
KEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYYEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNI
PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSNNNNNNNNNNNLGENLYFQ
MLMGGRDPLWQNPCDDKRHRDIWSKEKTCDRLPKFLVIGPQKTGTTALYFLV
MHPSILSNSPKTFEEVQFFNRNNYHRGIDWYMDFFPVPSNVTTDFLFEKSANY
FHSEEAPKRAASLVPAKIITILIDPSDRAYSWYQHQRSHEDPAALKFSFYEVISA

**GPRAPSELRALQKRCLVPGWYASHIERWL VYFPPFQLLIIDGQQLRTDPATVMD
EVQKFLGVLPHYNYSEALTFDSHKGFWCQLLEEGKTKCLGKSKGRKYPPMDS
SRTFLSSYYRDHNVLSKLLHKLGGQPLPSWLRQELQKVR**

F2.2. MBP-NST₃₅₉₃

MKIHHHHHHHEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQ
VAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAY
PIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAAD
GGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAAFNK
GETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELA
KEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYYEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNI
PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNNNLGENLYFQ
MLMGRRLPKFLVIGPQKTGTTALYLFLVMHPSILSNSPSPKTFEEVQFFNRNNY
HRGIDWYMDFFPVPSNVTTDFLFEKSANYFHSEEAPKRAASLVPKAKIITILIDPS
DRAYSWYQHQRSHEDPAALKFSFYEVISAGPRAPSELRALQKRCLVPGWYASHI
ERWL VYFPPFQLLIIDGQQLRTDPATVMD**EVQKFLGVLPHYNYSEALTFDSHKG**
FWCQLLEEGKTKCLGKSKGRKYPPMDS**SRTFLSSYYRDHNVLSKLLHKLGG**
PLPSWLRQELQKVR

F2.3. GST-NST₁₅₅₈-Mut15

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPE
FLQTLPPVQLAQKYFQIFSEEKDPLWQDPCEDKRHKDIWSKEKTCDRFPKLLIIG
PQKTGTTALYLFLSMHPDLSSNYSPPETFEEIQFFNGHNYHKGIDWYMDFFPIPS
NTTSDFYFEKSANYFDSEVAPRRAAALLPKAKILTILINPADRAYSWYQHQR**AHN**
DPVALKYTFHEVITAGDDAPSELRALQNRCLVPGWYATHIERWLSYYHANQILV
LDGQLLRTDPAKVMMDMVQKFLGVTNTIDYHKHLAFDPKKGFWCQLLEGGKTK
CLGKSKGRKYPPMDEDSRAFLKDYYRDHNIELSKLLYKMGQPLPTWLREDLQN
TR

F2.4. GST-NST₃₅₄₉-Mut5

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDP MCL
DAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPE
FLQTLPPVQLAHKYFELFPDQKDPLWQNPCDDKRHRDIWSKEKTCDRLPKFLVI
GPQKTGTTALYLFLSMHPSILSNSPSPKTFEEVQFFNRNNYHRGIDWYMDFFPVP
SNVTTDFLFEKSANYFHSEEAPKRAASLVPKAKIITILIDPSDRAYSWYQHQRSHN
DPAALKFSFYEVISAGDRAPSELRALQKRCLVPGWYASHIERWL VYFPPFQLLII
DGQQLRTDPATVMDEVQKFLGVLPHYNYSEHLTFDSHKGFWCQLLEEGKTKC
LGKSKGRKYPPMEDSDRTFLSSYYRDHNVLSKLLHKL GQPLPSWLRQELQKV
R

F2.5. GST-NST₃₅₄₉

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDP MCL
DAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPE
FLQTLPPVQLAHKYFELFPDQKDPLWQNPCDDKRHRDIWSKEKTCDRLPKFLVI
GPQKTGTTALYLFLVMHPSILSNSPSPKTFEEVQFFNRNNYHRGIDWYMDFFPVP
SNVTTDFLFEKSANYFHSEEAPKRAASLVPKAKIITILIDPSDRAYSWYQHQRSHE
DPAALKFSFYEVISAGPRAPSELRALQKRCLVPGWYASHIERWL VYFPPFQLLIID
GQQLRTDPATVMDEVQKFLGVLPHYNYSEALTFDSHKGFWCQLLEEGKTKCL
GKSKGRKYPPMDSDSRTFLSSYYRDHNVLSKLLHKL GQPLPSWLRQELQKVR

F2.6. SULT1A1 K65E/R68G

MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMEFSRPPLVHVKG IPLIKYFAETIGPLQNFTA
WPDDL LISTYPKSGTTWMSEILDMIYQGGKLEECGGAPIYARVPFLEFKCPGVPS
GLETLEETPAPRL LKTHLPLSLLPQSLLDQKV KVIYIARNAKD VVVSYN FYNMA
KLHPDPGTWDSFLENFMDGEVSYGSWYQH VKEWWELRH THPVL YLFYEDIKE
NPKREIKKILEFLGRSLPEETVDSIVHHTSFKKMKENCMTNYTTIPT EIMDH NVS
PFMRKGTTGDWKNTFTVAQNERFDAHYAKTMTDCDFKFRCEL

F2.7. MBP-ASTIV-Mut35

MKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGD
GPDIIFWAHDREFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEAL
SLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFK
YENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTI
NGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENY
LLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAF
WYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNNNLGIEGRISHMSMGG
RMEFSRPPLVHVKGIPLIK YFAETWGQLQNFQARPDDL IATYPKSGTTWLSEIL
DMIYQGGDLEKCQRAPIYNRVPFLEFKCPGVPSGLEQLEEMPSRLLKTHLPLQ
LLPQSLLDQKCKVIYIARNAKDVVVSYYHFYRMNKLHPDPGTWDEFLEKFMDG
KVAYGSWYDHVKEWWELRHHPILYLFYEDMKENPKREIKKILEFLGKSLPEE
TVDKIVHHTSFDKMKENPMTNYTTIPTEIMDHSVSPFMRKGTVGDWKNHFTVA
QNERFDEHYAKKMADCCLKFRCELEFGGSHHHHHHHH

Utolsó módosítás dátuma: 2024.12.17.