

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Ph.D. program: Gyógyszerkémia, gyógyszerkutatás

Programvezető: Prof. Dr. Szatmári István

Intézet: Orvosi Vegytani Intézet

Témavezetők: Prof. Dr. Martinek Tamás
Dr. Hegedüs Zsófia

Petrovicz Vencel László

Ligandumfejlesztés transzkripció faktor interakciók gátlására

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Dombi György

Tagok: Dr. Fülöp Livia
Dr. Borics Attila

Védési Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szatmári István

Bírálok: Dr. Horváti Kata
Dr. Kele Péter

Titkár: Dr. Szakonyi Gerda

Tag: Dr. Borics Attila

A. Bevezetés és célkitűzések

Terápiás szempontból releváns fehérje-fehérje kölcsönhatások gátlása az egyik legnagyobb kihívás a hatóanyag fejlesztésben. Egy fehérje-fehérje kölcsönhatási felszínen a kötődési szabadentalpia nagy, sekély felületen oszlik el ($1200\text{--}3000 \text{ Å}^2$), úgynevezett kötődési „forrópontokat” kialakítva, ami jelentősen megnehezíti ezen interakciók gátlását hagyományos kismolekulás hatóanyagokkal. Ezen felül, a különböző rosszindulatú elváltozások kialakulásában jelentős szerepet játszó transzkripciós fehérjék gátlása további nehézségekbe ütközik, melynek oka, hogy a transzkripciós faktorok transzaktivációs doménjei (TAD) túlnyomó részt rendezetlen régiókban helyezkednek el. Ez a dinamikus viselkedés lehetővé teszi, hogy egy rendezetlen szakasz egy transzkripciós faktoron belül több partnerrel is kölcsönhasson, kialakítva tranziens, de specifikus interakciókat, gyakran molekuláris kapcsolókként reagálva külső ingerekre. A promiskuitás mellett a transzkripciós faktorok nukleáris lokalizációja, valamint a kölcsönhatásokat gyakran kísérő allosztérikus változások tovább nehezítik az inhibitor fejlesztési törekvéseket.

A fehérje-fehérje kölcsönhatást célzó fejlesztési erőfeszítések kiindulópontja változatos szerkezeteken alapul, a peptidektől, a nem-természetes vázakon át a fehérjékig, mint például a napjainkban széles körben alkalmazott monoklonális antitestek. Ezek azonban jelentős korlátokkal néznek szembe sejten belüli célpontok esetén az elégtelen membrán penetráló képességük miatt. Peptidomimetikus hatóanyagok alkalmazása segíthet leküzdeni ezeket a korlátokat, ugyanis a viszonylag kicsi molekulatömegüknek köszönhetően potenciálisan képesek lehetnek sejttagon belüli fehérje célpontok gátlására, ezzel direkt módon gátolva a transzkripciós faktorok aktivitást. A peptidomimetikumok fejlesztési folyamata követhet egy „felülről-lefelé” építkező stratégiát (a kiválasztott célpont natív ligandumának racionális módosításával), vagy egy „alulról-felfelé” megközelítést (peptidomimetikus fragmens könyvtárak szűrése, majd találatok módosítása). Az előbbi módszer feltétele, hogy az adott kölcsönhatásról részletes szerkezeti és mechanisztikai információk álljanak rendelkezésre, ami egy rendezetlen kölcsönható partner esetén akadályokba ütközhet. Alternatívaként a fragmens-alapú, „alulról-felfelé” történő ligandumfejlesztés utat nyithat funkcionális peptidomimetikus inhibitorok felé; ennek megvalósítása azonban nagy áteresztőképességű szűrési módszereket igényel, amely peptidomimetikumok esetén korlátokba ütközik, például könyvtárméret, valamint szintetikus és analitikai nehézségek miatt. Bár in vitro transzlációs technikák révén

nem természetes oldalláncok is beépíthetők, továbbra is akadályt jelent a mesterséges gerincű monomerek hatékony transzlációja.

Célunk olyan módszerek kidolgozása volt, amelyek megoldást jelenthetnek a rendezetlen fehérjék kölcsönhatásainak gátlását övező nehézségekre peptidomimetikumok segítségével. A „felülről-lefelé” építkező fejlesztési stratégia megköveteli az adott célpont minél részletesebb ismeretét, ugyanis módosítások végrehajtása a rendezetlen ligandumon nem csak az affinitást befolyásolhatja, hanem a rendezetlen régió feltekeredését, valamint a mechanisztikus szempontból jelentős ligandumok közötti kooperativitást is. Ezért első lépésként a HIF-1 α és negatív regulátora a CITED2 C-TAD doménjei kompetíciójának a molekuláris hátterét vizsgáltuk, amikor a részben átfedő kötőhelyért versengenek a p300/CBP TAZ1 doménjének felszínén. A HIF-1 α útvonal gyors adaptív választ ad a hypoxiás stresszre, és lehetséges terápiás célpont szolid tumorok kezelésére. A kompetíció molekuláris mechanizmusa a két rendezetlen ligandum közötti negatív kooperáción alapul, amit az interakciós partnerek közötti allosztérikus kommunikáció teremt meg egy turner-rendszeren keresztül. Hipotézisünk szerint a CITED2 szekvenciájában elvégzett $\alpha \rightarrow \beta^3$ aminosav cserék rávilágíthatnak a különböző CITED2 kötőmotívumok szerepére az allosztérikus változásokban, továbbá megnyithatja az utat egy funkcionális, peptidomimetikus HIF-1 α antagonista fejlesztése előtt, ami potenciálisan ráterápiás hatóanyagot eredményezhet.

A transzkripciós faktorok transzaktivációs doménjeinek interakciói túlnyomó többségben rövid peptidmotívumok által mediáltak. Ezek potenciálisan utánozhatók diszkrét és stabil másodlagos szerkezetekbe feltekeredő mesterséges oligomerekkel, például foldamerekkel. Továbbá, az ilyen felismerő motívum-mimetikumok kovalens összekapcsolásával reprodukálhatjuk a kölcsönhatások multivalens jellegét, amit már a szűrési fázisban figyelembe kell venni. Feltételezésünk szerint multivalens peptidomimetikumok szintézisére és szűrésére DNS-kódolt könyvtárak nyújthatnának megoldást. Egy ilyen rendszerben a könyvtártagokat egyedi DNS-vonalkódokkal látjuk el, ami lehetővé teszi akár 10^6 tagú kombinatorikus könyvtárak szelekcióját, ugyanis a találatok azonosítása az új generációs DNS-szekvenálás technológiának köszönhetően gyors és egyszerűen kivitelezhető. A koncepció megvalósíthatóságának igazolására a célunk egy olyan DNS-kódolt multivalens foldamer ligandum szintézise, ami az alapját képezheti egy jövőbeli multivalens peptidomimetikus ligandum fejlesztésnek az „alulról-fölfelé” stratégiát követve.

B. Módszerek

Izotermális Titrálási Kalorimetria

A titrálásokat foszfát-pufferben végeztük el (pH=7,5) egy Microcal VP ITC eszköz segítségével. A direkt titrálások kivitelezése 5 μ M-os TAZ1 oldattal történt 60 μ M-os ligandum koncentrációval a fecskendőben 35 °C-on, 5 μ L-es injektálásokkal 180 s-os szünetekkel az injektálások között. A kompetíciós titrálásokhoz a TAZ1/HIF-1 α komplexet 5 μ M-os TAZ1-hez 60 μ M-os HIF-1 α -t titrálva készítettük elő, megállítva a titrálást a telítéshez közel, majd a különböző 60 μ M-os CITED2 módosulatokkal titráltuk a komplexet 5-10 μ L-es injektálásokkal és 180-240 s-os szünetekkel. A nyers adatsorokat NITPIC segítségével integráltuk. A direkt titrálások termogramjait SEDPHAT-tal illesztettük egy olyan modellre, ami figyelembe veszi az átmeneti turner-rendszer kialakulását.

Fluoreszcencia anizotrópia

A fluoreszcencia anizotrópiát egy Clariostar Plus microplate reader segítségével mértük meg 480 nm-es gerjesztéssel és 535 nm-es emisszióval 35 °C-on. A kísérlethez használt puffer 40 mM nátrium-foszfátot, 100 mM NaCl-t, 1mM DTT-t és 0,01% Triton-X-et tartalmazott 7,4-es pH-n. Három ismétléses titrálásokat végeztünk kontroll kísérletekkel párhuzamosan. A kompetitor peptidek (HIF-1 α ₇₇₆₋₈₂₆, natív CITED2 és variánsai) 40 μ L-ét 20 μ L pufferrel elegyítettük, majd sorozatos 2/3-os hígítást végeztünk 24 ponton keresztül, ami 5 μ M-os koncentrációt eredményezett az első pontban. A TAZ1 koncentrációja 50 nM volt, míg a Flu-HIF-1 α ₇₈₆₋₈₂₆ koncentrációja 25 nM. A lemezeket 10 percig inkubáltuk 35 °C-on mérés előtt. A fluoreszcencia polarizációs jeleket Origin Pro 9.5 szoftverrel analizáltuk.

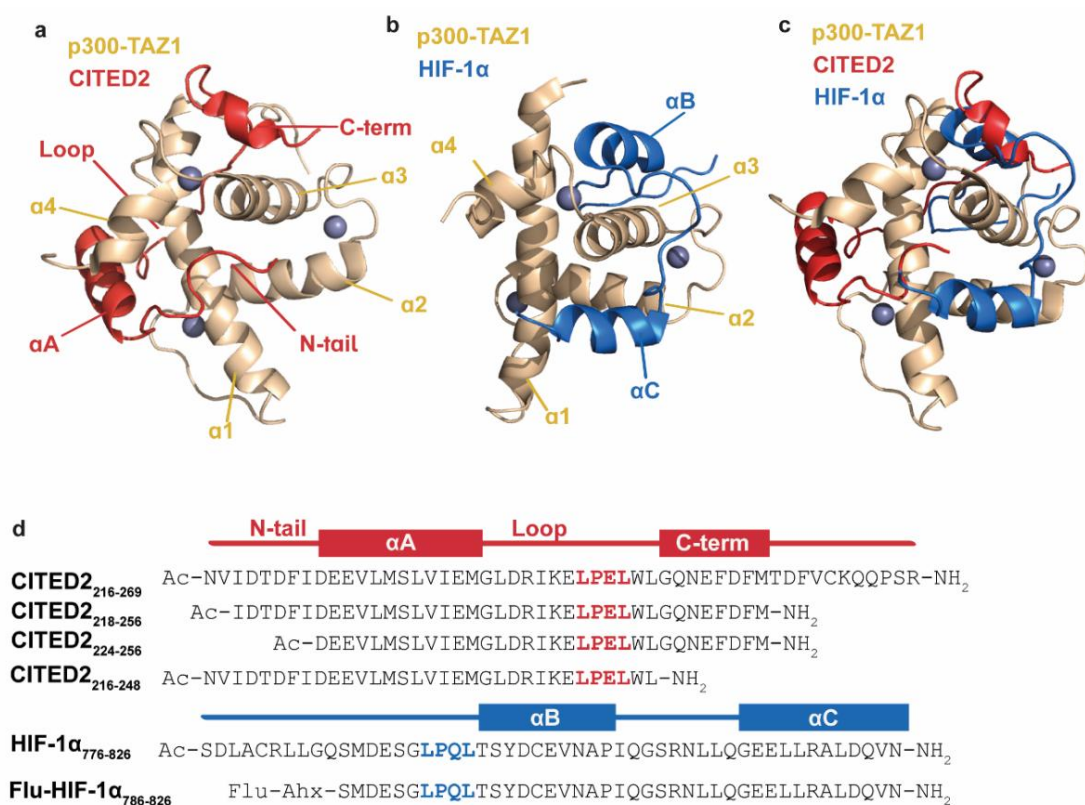
NMR mérések

A mintákat 10 mM Tris pH 6,9, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 10% D₂O, 0,02% NaN₃ pufferben készítettük elő. A különböző CITED2 peptideket vagy ekvimoláris arányú HIF-1 α -t és CITED2 peptideket 1,2-1,5 ekvivalens mennyiségben adtuk hozzá a 90-100 μ M-os ¹⁵N-¹³C-TAZ1₃₃₀₋₄₂₄-hez. Az NMR méréseket egy Bruker Avance III 600 MHz spektrométerrel hajtottuk végre egy 5 mm-es CP-TCI triple-resonance cryoprobe segítségével. A ¹H-¹⁵N-HSQC, ¹H-¹³C-HSQC méréseket 298 K-en végeztük el. Az adatok processzálása Topspin 3.5 szoftverrel történt, majd az analízis NMRFAM-Sparky szoftverrel. A peptid-gerinc és metil rezonancia azonosítása korábban publikált TAZ1/CITED2 (BMRB 5788) és TAZ1/HIF-1 α (BMRB 5306) komplexeken alapult.

C. Eredmények és diszkusszió

1. Kötőhely specifikus allosztéria perturbációs stratégia a CITED2 kötőmotívumok szerepének meghatározására

Az eredmények megmutatták a CITED2 N-terminális régiójának esszenciális szerepét a kompetíciót kísérő konformációs változásokban, valamint sikerült tisztázni a CITED2 kötőmotívumainak szerepét a versengő ligandumok közötti negatív kooperativitás létrejöttében. Ezen eredmények mellett az aminosav cserén alapuló stratégia egy jövőbeli „felülről-lefelé” építkező peptidomimetikum fejlesztés kiindulópontja is lehet, az előnyös módosítások megtartásával, ami egy allosztérikus, peptidomimetikus HIF-1 α inhibitor eredményezhet.

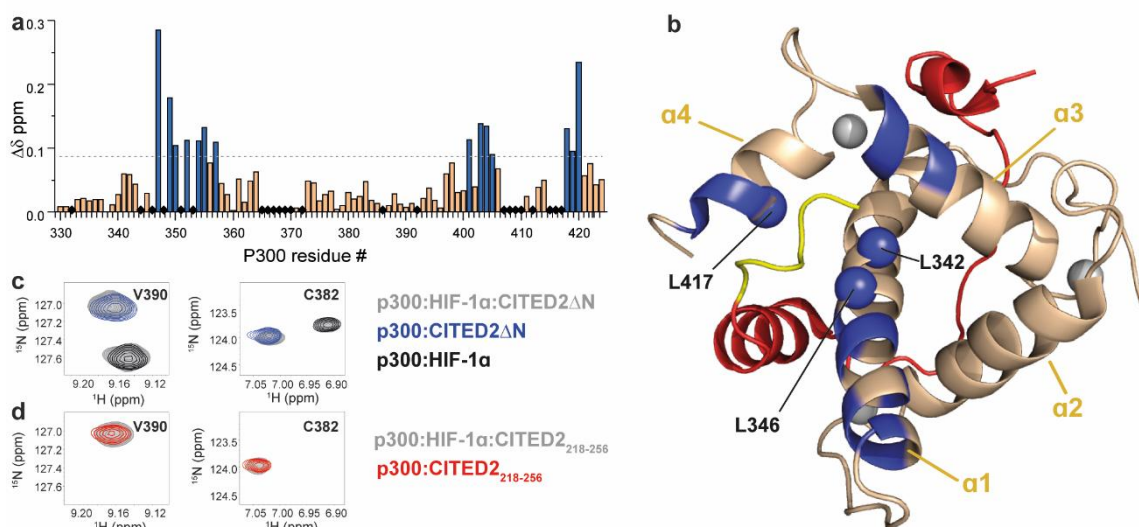


1. ábra P300-TAZ1 kötött HIF-1 α és CITED2 szerkezete (a) CITED2 C-TAD (vörös) TAZ1-el alkotott komplex (búzaszín) (PDB: 1P4Q). A TAZ1 doménhez tartozó α -héliceit ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) N-terminustól C-terminusig számoztuk, a gömbök cink atomokat jelölnek. A CITED2 kötőmotívumokat az N-tail, αA -helix, Loop és C-term jelöli. (b) A HIF-1 α C-TAD (kék) szerkezete a TAZ1 doménnel komplexben (PDB: 1L3E). A HIF-1 α héliceit αB - αC jelöli N-től C-ig; az αA hélix nem megfigyelhető p300 kötött szerkezetben. (c) HIF-1 α és CITED2 szerkezetének átfedése a TAZ1 felszínén (TAZ1 CITED2 kötött konformációban). (d) A munka során vizsgált CITED2 és HIF-1 α peptidek szekvenciája. Flu: 5,6-karboxifluoreszcein, Ahx: aminohexánkarbonsav

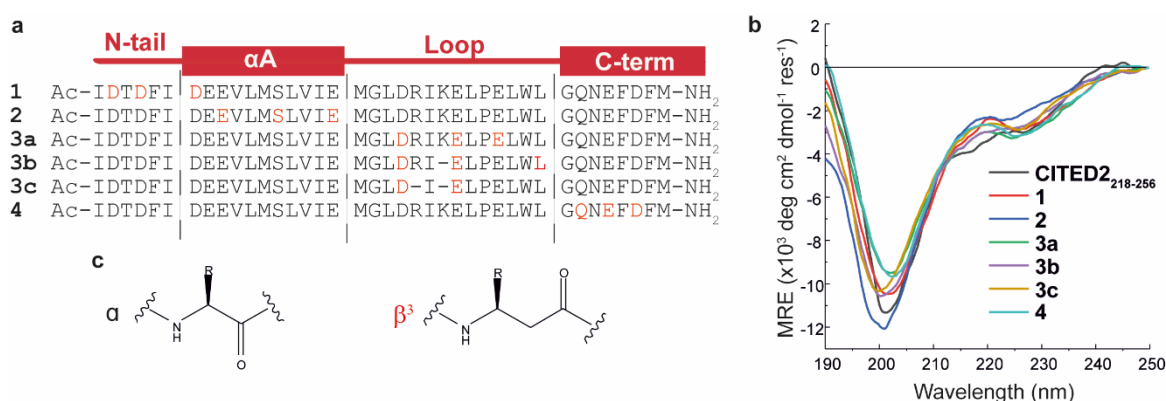
1.1 A CITED2 N- és C-terminálisnak hozzájárulása a kompetíció mechanizmusához

Első lépésként a CITED2 azon minimumszekvenciája került meghatározásra, ami megtartja a natív teljes hosszúságú domén kötődési paramétereit és funkcióját (CITED2₂₁₈₋₂₅₆) (1. ábra). Ebből a szekvenciából kiindulva az N-terminális elhagyása (CITED2₂₁₈₋₂₂₃) az affinitást kis mértékben csökkentette, azonban a kompetíció kooperatív jellege teljesen elveszett, rámutatva

az allosztérikus kommunikáció és egyirányúság hiányára. A C-terminális elhagyása (CITED2₂₄₉₋₂₅₆) ugyan jelentős affinitás csökkenést eredményezett, azonban a turner-rendszer kialakulása kedvező maradt, megtartva az allosztérikus kommunikációt a ligandumok között. NMR mérések megmutatták, hogy az N-terminális konformációs változásokat indukál a TAZ1 mechanisztikus szempontból igen jelentős $\alpha 1$ és $\alpha 4$ hélixekben, rámutatva, hogy ez a régió felelős a konformációs zár kialakításában, ami a folyamat egyirányúságát eredményezi (2. ábra).



2. ábra Szerkezeti különbségek CITED2₂₁₈₋₂₅₆ és CITED2ΔN között TAZ1-el komplexben. (a) Súlyozott, átlagos kémiai eltolódás különbségek a TAZ1/CITED2ΔN és TAZ1/ CITED2₂₁₈₋₂₅₆ között. $\Delta\delta = [(\Delta\delta H)^2 + (\Delta\delta N/5)^2]^{1/2}$ a szignifikánsan tolodott aminosavak kékkel jelzettek ($\Delta\delta > 0.9 \Delta\delta_{\text{átlag}} \pm \sigma$). A fekete négyzetek a nem beazonosított vagy prolin aminosavakat jelölik. (b) Szignifikáns különbségek a szerkezetek között (kék) ábrázolva a TAZ1/CITED2 szerkezeten. A kék gömbök a szignifikáns CH₃ eltolódás különbségeket jelölik (PDB: 1P4Q, TAZ1 búzaszínű, CITED2₂₂₄₋₂₅₆ vörös, míg CITED2₂₁₈₋₂₂₃ sárga). (c) Reprezentatív ¹H-¹⁵N aminosav kémiai eltolódások c) TAZ1/HIF-1 α /CITED2ΔN (szürke), TAZ1/CITED2ΔN (kék) és TAZ1/HIF-1 α (fekete) komplexeknek, valamint (d) a TAZ1/HIF-1 α /CITED2₂₁₈₋₂₅₆ (szürke) és TAZ1/CITED2₂₁₈₋₂₅₆ (vörös) komplexeknek.



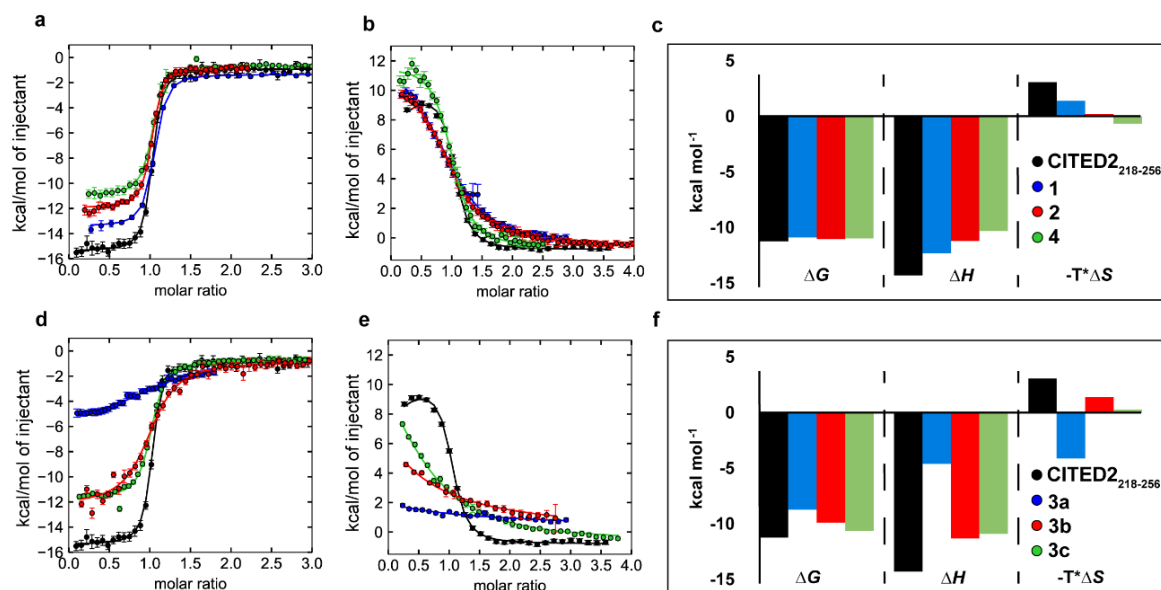
3. ábra A β^3 -aminosavakkal módosított CITED2 variánsok szekvenciái és szerkezetük. (a) A módosított CITED2 peptidek szekvenciái a kötőmotívumokkal. $\alpha \rightarrow \beta^3$ szubsztitúciókat vörössel jeleztük, míg a deléciókat kötőjellel. (b) A CITED2 variánsok CD spektrumai 20 mM-os Na-foszfát, 1 mM DTT, pH 7,4 pufferben, szobahőmérsékleten 20 μ M-os koncentrációban.

1.2 Peptidgerinc módosítási stratégia a CITED2 kötőmotívumainak kooperációhoz való hozzájárulása és az intramolekuláris kapcsolatok meghatározására

A szekvencia csonkításon alapuló stratégia vagy az alanin-szkennelés félrevezetően túlhangsúlyozhatja egy adott motívum szerepét az allosztérikus szabályozásban, az affinitás jelentős csökkenése miatt. Ezért egy új stratégiát fejlesztettünk, ami kötőhelyspecifikusan kismértékben zavarja meg az adott CITED2-TAZ1 interfészt, megőrizve a natív szekvencia affinitását. Ez a megközelítés moduláris $\alpha \rightarrow \beta^3$ aminosav cseréket alkalmaz oldószernek kitett aminosavakat megcélózva NMR szerkezetek és számítógépes alanin-szkennelés (BAlaS) alapján. Így, ha egy adott CITED2 kötőmotívum módosításával a kompetíció hatékonysága csökken, vagyis a turner-rendszer kialakulásának szabadentalpia gátja, a Δg nő, akkor tudjuk, hogy az adott motívum jelentősen hozzájárul a ligandumok közötti negatív kooperációhoz, vagyis az allosztérikus változásokhoz. Ezen felül az ITC méréseket NMR mérésekkel kiegészítve információt kaphatunk a módosítások okozta konformációs változásokról a TAZ1 szerkezetében. Ezen megfontolások alapján hat CITED2 variánst szintetizáltunk: egy N-terminálisban (**1**), egy αA hélixben (**2**), három loop régióban (**3a-c**), és egy C-terminálisban (**4**) módosított CITED2-t. CD mérések megmutatták, hogy az összes módosulat megtartotta a dinamikus rendezetlen jelleget, enyhe helikális tartalommal (3. ábra).

1.3 A módosítások hatása a termodinamikai paraméterekre

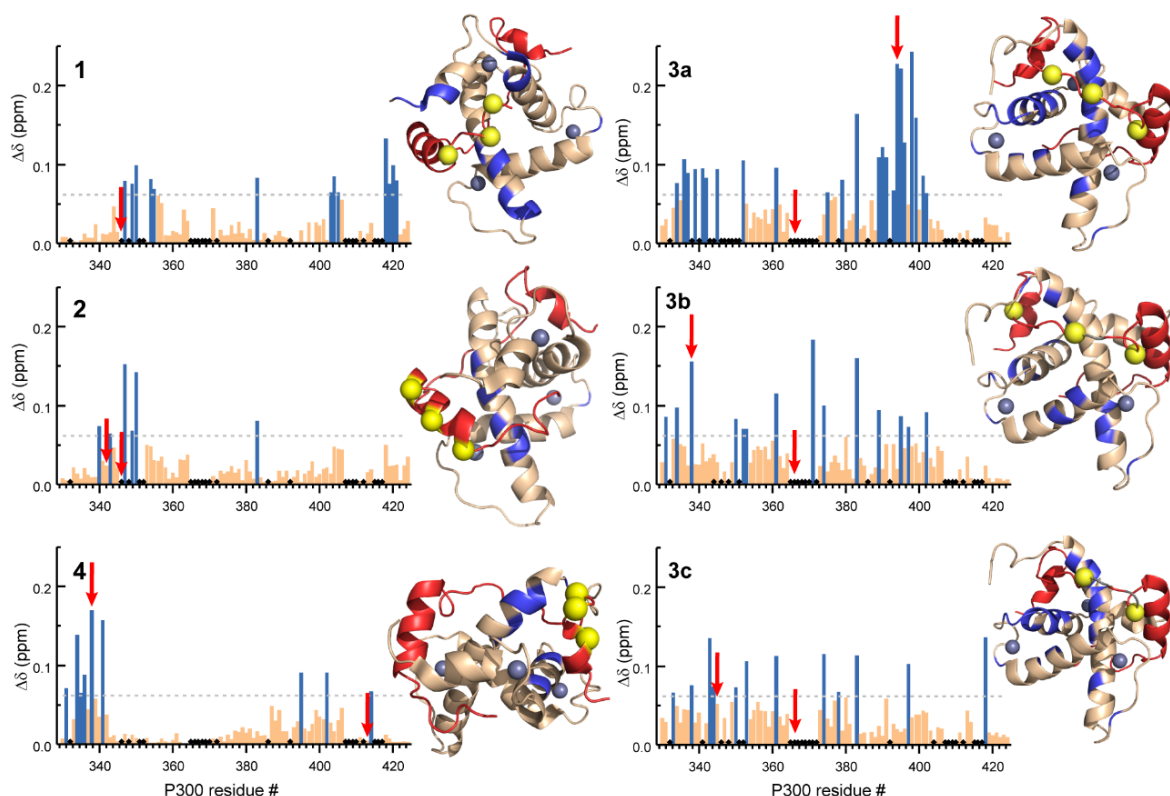
ITC mérések megerősítették a natívhoz hasonló affinitást **1,2** és **4** esetében ($K_D=10-19$ nM), enyhén csökkent entalpia és entrópia hozzájárulással. A loop régió módosításai sokkal drasztikusabb hatásokkal jártak: a LPEL motívum módosítása (**3a**) közel 50-szeres K_D növekedést eredményezett jelentősen különböző termodinamikai profillal, azonban a konzervált motívum változatlanul hagyása, valamint aminosav deléciókkal kompenzálva a hossznövekedést (**3b-c**) jelentősen növelte az affinitást ($K_D(\mathbf{3b}) = 98$ nM és $K_D(\mathbf{3b}) = 29$ nM). A kooperatív paraméterek **2** és **4** esetében hasonlóak maradtak a natív szekvenciához ($\Delta g=1,1-1,4$ kcal mol⁻¹), ezzel indikálva, hogy a turner-rendszer, valamint allosztérikus aktivitás intakt maradt. Az N-terminális esetében (**1**) a kompetíció hatékonysága jelentősen csökkent, ugyan nem olyan jelentős mértékben, mint az N-terminális elhagyásával. A legnagyobb változást a loop módosításainál láttuk, ahol $\Delta g > 4$ kcal mol⁻¹ and $\Delta h = 0$ kcal mol⁻¹, sugallva ezzel a turner-rendszer és az allosztérikus kommunikációnak teljes hiányát. Ezeket az eredményeket fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel is validáltuk (4. ábra).



4. ábra Különböző CITED2 variánsok kötődése TAZ1-hez és kompetíciója HIF-1 α -val. (a) CITED2₂₁₈₋₂₅₆, **1**, **2** és **4** TAZ1 kölcsönhatásainak ITC termogramjai (b) CITED2₂₁₈₋₂₅₆, **1**, **2** és **4** termogramjai titrálva előre elkészített TAZ1/HIF-1 α komplexhez. (c) CITED2₂₁₈₋₂₅₆, **1**, **2** és **4** TAZ1 kötődésének termodinamikai ujjlenyomatai. (d) CITED2₂₁₈₋₂₅₆, **3a**, **3b** és **3c** TAZ1 interakcióinak ITC termogramjai (e) CITED2₂₁₈₋₂₅₆, **3a**, **3b** és **3c** termogramjai titrálva előre elkészített TAZ1/HIF-1 α komplexhez. (f) CITED2₂₁₈₋₂₅₆, **3a**, **3b** és **3c** TAZ1 kötődésének termodinamikai ujjlenyomatai.

1.4 Módosítások hatása a TAZ1 szerkezetére a CITED2 variánsokkal komplexben

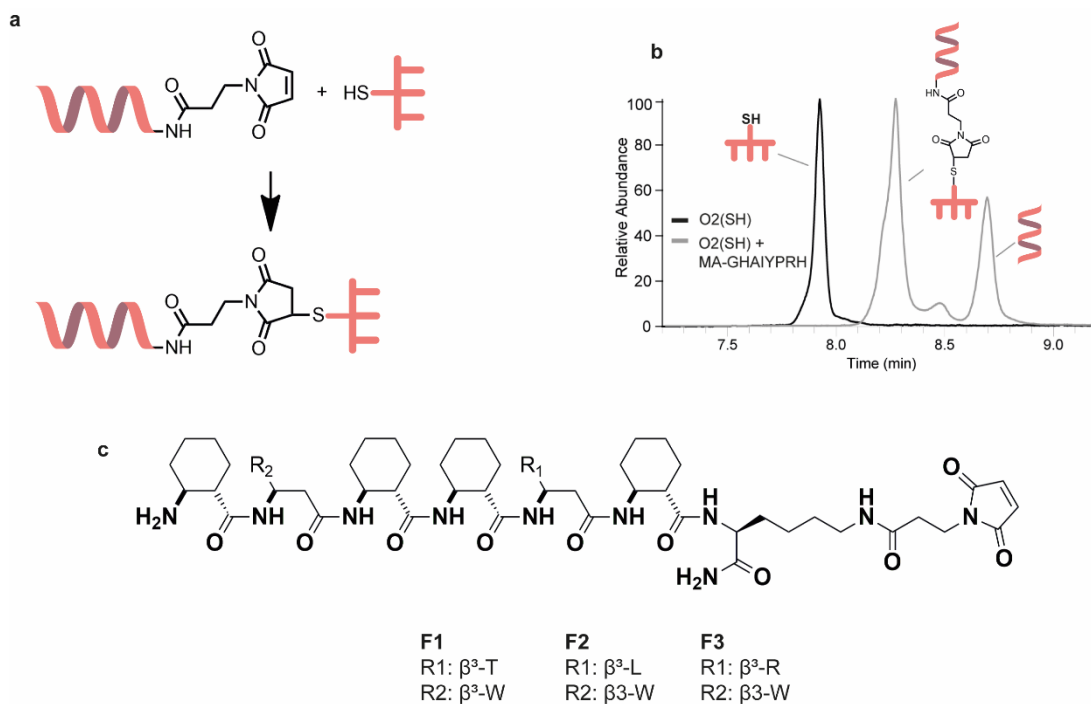
A CITED2 variánsok ¹³C/¹⁵N-jelzett TAZ1 komplexeinek NMR spektrumai felfedték a módosítások okozta kötőhelyspecifikus szerkezeti változásokat. Az N-terminális módosítás (1) konformációs változásokat okozott a TAZ1 α 1, α 3 és α 4 hélixek C-terminálisán, ami egybevág a fentebb látható eredményekkel, hangsúlyozva az N-terminális szerepét a kompetícióban. Az α A és C-terminális (2 és 4) módosítása csak lokális hatással voltak a TAZ1 szerkezetére, azonban a loop módosítások minden esetben a TAZ1 egész szerkezetére kiterjedő konformációs változást okoztak. Az ITC és NMR mérések adatait összevetve azt látjuk, hogy az α A és C-terminális módosításai jól toleráltak a kooperatív paraméterek és a TAZ1 konformációs változásai szempontjából azt bizonyítva, hogy ezen motívumoknak a nagy affinitás kialakításában van szerepe TAZ1-gyel. Az N-terminális módosítása megmutatta, hogy ez a régió felelős a kompetíciót kísérő konformációs zár kialakításáért, ezzel a folyamat egyirányúságáért. A loop régió módosításának drasztikus hatása a kompetícióra, valamint a diffúz konformációs hatások azt mutatják, hogy ez a szerkezeti elem a CITED2 kötőmotívumainak intramolekuláris kooperációjáért felel a feltekeredési és kötődési folyamat során (5. ábra).



5. ábra A TAZ1 súlyozott, ^1H - ^{15}N kémiai eltolódás különbségei különböző CITED2 variánsok kötődésének hatására a TAZ1/CITED2₂₁₈₋₂₅₆ komplexhez képest. $\Delta\delta = [(\Delta\delta \text{ H})^2 + (\Delta\delta \text{ N}/5)^2]^{1/2}$ A szignifikancia szintet a különböző CITED2 variánsok $\Delta\delta$ átlagából és standard devianciájából határoztuk meg ($\Delta\delta > 0.9 \Delta\delta_{\text{átlag}} \pm \sigma$). Aminosavak a szignifikancia szint felett kékkel jelzettek az oszlopdiagrammon, valamint a TAZ1/CITED2 szerkezeten. A CITED2 vörössel, míg a β^3 -szubsztitúciók sárga gömbökkel, az eltávolított aminosavak pedig szürkével jelzettek. A fekete négyzetek az oszlopdiagrammon a beazonosíthatatlan és prolin aminosavakat jelölik. A vörös nyilak a szignifikáns CH_3 kémiai eltolódás különbségeket jelölik.

2. Módszer kidolgozása egy multivalens foldamer ligandum DNS-templátolt szintézisére

Ezen munkánk során egy olyan DNS-kódolt trimer foldamer konstrukciót hoztunk létre, ami a jövőben képes lehet utánozni a rendezetlen transzkripció faktorok szerkezeti elemeit egy PCR által amplifikálható DNS-kódolt könyvtár felhasználásával. Ez a DNS-templátolt szintézis a következő lépéseket tartalmazza: (i) maleimid-módosított foldamerek konjugációja 5'-foszforilált tiol-csoportot tartalmazó kodonokra (ii) foldamer-kodon konjugátumok és primerek hibridizációja egy komplementer templátra (iii) kodonok és primerek ligálása T4 DNS-ligáz segítségével (iv) DNS-kettős hélix szeparációja denaturáló gél elektroforézissel (v) a ligált foldamereket kódoló DNS-szál amplifikációja PCR-al.



6. ábra Oldatfázisú tiol-maleimid konjugáció. (a) A reakció sematikus ábrázolása: 100 μ M oligonukleotid, 200 μ M TCEP, 500 μ M peptid, 10% DMSO, 24 h, szobahőmérséklet. (b) Az oldatfázisú konjugálás HPLC-MS spektruma a reakció előtt és után. (c) A konjugációhoz használt H14-foldamerek elsődleges szerkezete

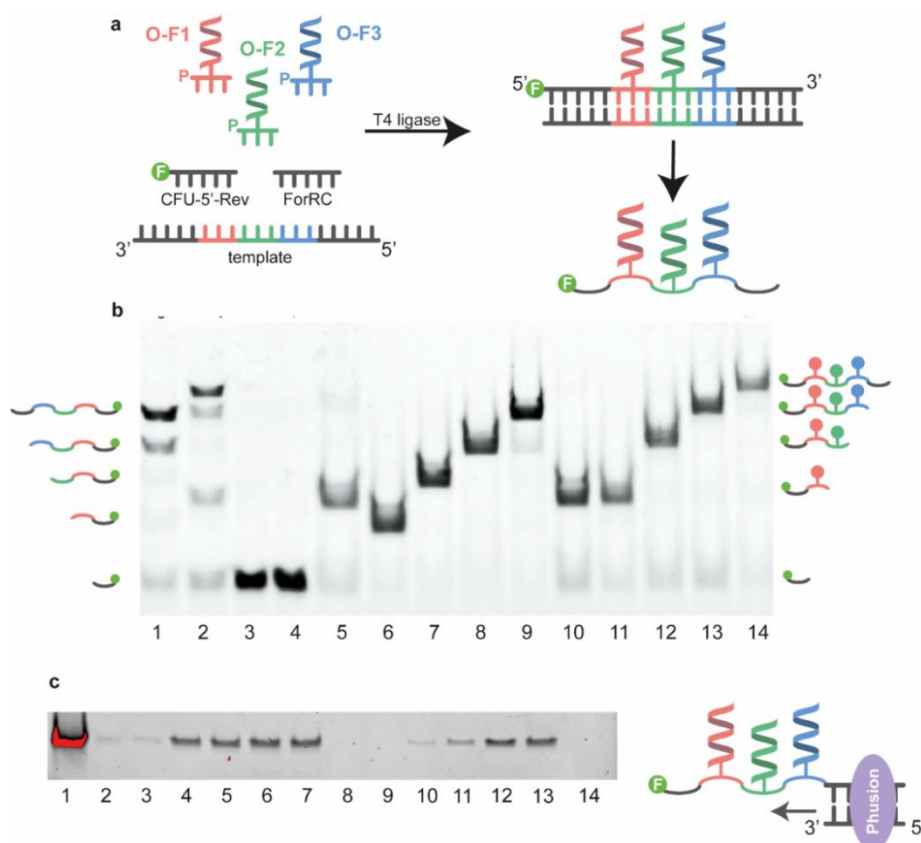
2.1 Kódoló oligonukleotidok és H14-foldamerek tiol-maleimid konjugációja

Annak az érdekében, hogy ligálható oligonukleotidokat kapjunk, a tiol-csoportot az oligonukleotid szekvenciák középre építettük be egy újonnan fejlesztett S-S-tBu védett tiol-tartalmú timidin-foszforamidit segítségével, ezzel az 5'-foszfátcsoportokat szabadon hagyva ligáláshoz. A konjugációt egy transferrin-receptor kötő peptid (HAIYPRH) segítségével optimalizáltuk, kiegészítve egy glicinnel és maleimido-propionsavval az N-terminálison. A konjugáció első lépése a terc-butil védett oligonukleotid deprotektálása TCEP segítségével. A deprotektált oligonukleotid tisztítását követően a konjugációt szobahőmérsékleten, 24 óra alatt végeztük, jó hozammal (6. ábra). A terc-butil védőcsoport lehetővé teszi ligandumok szilárd-fázisú konjugációját, ugyanis az a gyantához kötött oligonukleotidról szelektíven eltávolítható és a ligandum konjugálható hasítás előtt, csökkentve ezzel a tisztítási lépések számát. A konjugációt sikeresen hajtottuk végre maleimido-propionsavval, azonban kisebb hozamot értünk el, mint az oldat-fázisban ezért a munkát oldat-fázisú konjugációval folytattuk.

2.2 A foldamer-oligonukleotid konjugátumok ligálása, valamint a termék amplifikációja

Az egyszálú három foldamert prezentáló DNS-terméket templátolt ligálással szintetizáltuk T4 DNS-ligáz segítségével, egy 60 nukleotid hosszú templátra hibridizálva, amin a túlnyúló végek a primerek hibridizációjáért felelnek. A ligáció három ekvivalens foldamer-oligonukleotid hozzáadásával történt a templáthoz képest, valamint felfűtési lépésekkel

sikeresen viaszorítottuk a csonkolt ligációs melléktermékek keletkezését. Denaturáló elektroforézis bebizonyította, hogy a korrekt 60 bázis hosszúságú termékek keletkeztek (**LO1-3** és **LOSF1-3**) konjugált foldamerekkel és azok nélkül is, bebizonyítva, hogy a foldamerek jelenléte nem befolyásolja a ligáció hatékonyságát. A PCR amplifikációhoz High-fidelity Phusion polimerázt használtunk, ugyanis ez képes kezelni olyan szekvenciákat, ami C5-módosított pirimidin bázisokat tartalmaz. Ugyan a kezdeti körülményekkel az **LOSF1-3** amplifikációja nem volt észlelhető, a polimeráz koncentrációját 0,15 U/μL-re emelve a foldamerrel módosított, ligált oligonukleotid amplifikációja sikeres volt (7. ábra).



7. ábra Templátolt ligáció és amplifikáció. (a) A ligáció folyamatábrája: A ligációt 1 μM-os templát koncentrációval, valamint 3 ekvivalens oligonukleotid vagy oligonukleotid-foldamer konjugátummal és primerekkel hajtottuk végre T4-ligázzal. Az elegyet 15 perc után 90 °C-ra fűtöttük, majd szobahőmérsékletre hűtöttük és adtunk hozzá T4 ligázt. A fűtési-hűtési ciklust háromszor ismételtük. (b) Denaturáló gélelektroforézis a ligációs elegyekről, kontrollokkal. A fűtési-hűtési ciklusok nélkül végzett ligálás nem funkcionális oligonukleotidokat (1. sáv) vagy foldamer-oligonukleotid konjugátumokat (2–4. sáv) tartalmazó elegyekkel történtek. Kontrollként a **templátot** (3. sáv) vagy a T4 ligázt (4. sáv) hagytuk ki a reakcióelegyből. Az 5–9. sávban a ligálást fűtési-hűtési ciklusokkal végeztük el, a keverékek tartalmazták a **templátot**, T4 ligázt, az **O1–3** oligonukleotidokat és a **F-5'-Rev**-et. Az alábbi reagenset hagytuk ki az egyes keverékekből: 5. sáv: **O1**; 6. sáv: **O2**; 7. sáv: **O3**; 8. sáv: **ForRC**; 9. sáv: minden reagens jelen volt. A 10–14. sávban a ligálást szintén fűtési-hűtési ciklusokkal végeztük, a keverék tartalmazta a templátot, T4 ligázt, az oligonukleotid konjugátumokat (**OSF1**, **OSF2** és **OSF3**), a **ForRC**-t és a **F-5'-Rev**-et. Az alábbi reagenset hagytuk ki az egyes keverékekből: 10. sáv: **OSF1**; 11. sáv: **OSF2**; 12. sáv: **OSF3**; 13. sáv: **ForRC**; 14. sáv: minden reagens jelen volt. A teljes hosszúságú és a csonka termékeket a gél oldalán jelöltük. (c) A PCR termékek gél elektroforézise: 1. sáv: ligált **LO1-3** templáthoz hibridizálva, 0,03 U/μL Phusiont használva. Sávok 2-7-ig a **templát** törzsolatának amplifikációját mutatják 0,03 U/μL (2-3), 0,06 U/μL (4-5) és 0,15 U/μL (6-7) Phusion felhasználásával. Sávok 8-13-ig a ligált, denaturáló gélelektroforézissel tisztított és gélből kivágott **LOSF1-3** amplifikációját mutatják 0,03 U/μL (8-9), 0,06 U/μL (10-11) és 0,15 U/μL (12-13) Phusion felhasználásával. 14. sor: negatív kontrol, ami nem tartalmaz semmilyen amplifikálható oligonukleotidot.

A tézisben megtalálható publikációk:

- I.** F. Hobor, Zs. Heged  s, A. A. Ibarra, V. L. Petrovicz, G. Bartlett, R. B. Sessions, A. Wilson, T. A. Edwards (2022). Understanding p300-transcription factor interactions using sequence variation and hybridization. *RSC Chem. Biol.* **3**, 592-603
- II.** Z. Kupih  r, Gy. Ferenc, V. L. Petrovicz, V. R. F  y, L. Kovács, T. A. Martinek, Zs. Hegedüs (2023). Improved Metal-Free Approach for the Synthesis of Protected Thiol Containing Thymidine Nucleoside Phosphoramidite and Its Application for the Synthesis of Ligatable Oligonucleotide Conjugates. *Pharmaceutics* **15(1)**, 248
- III.** V. L. Petrovicz, I. Pasztuhov, T. A. Martinek, Zs. Hegedüs (2024). Site-directed allostery perturbation to probe the negative regulation of hypoxia inducible factor-1  . *RSC Chem. Biol.* **5**, 711-720

A tézishez kapcsolódó tudományos előadások

1. V. L. Petrovicz, Zs. Hegedüs, I. Pasztuhov, T. Martinek. A P300/HIF-1 α kölcsönhatás allosztérikus szabályzásának feltérképezése a negatív regulátor módosításain keresztül.
Zechmeister Előadói Nap 2022. Budapest – 2022.11.18.
2. V. L. Petrovicz, Zs. Hegedüs, I. Pasztuhov, T. Martinek. A P300/HIF-1 α kölcsönhatás allosztérikus szabályzásának feltérképezése a negatív regulátor módosításain keresztül.
26. Tavaszi Szél Konferencia. Miskolc – 2023.05.06., 3. helyezett
3. V. L. Petrovicz, Zs. Hegedüs, I. Pasztuhov, T. Martinek. Selective allostery perturbation reveals the structural mechanism of the negative regulation for hypoxia inducible factor-1 α .
Zechmeister Előadói Nap 2023. Pécs – 2023.10.17.
4. V. L. Petrovicz, Zs. Hegedüs, I. Pasztuhov, T. Martinek. Kötőhely-specifikus allosztéria perturbáció a HIF-1 α aktivitás szabályozásának feltérképezésére
Zechmeister Előadói Nap. Budapest - 2024.10.15.
5. V. L. Petrovicz, Zs. Hegedüs, I. Pasztuhov, T. Martinek. Kötőhely-specifikus allosztéria perturbáció a HIF-1 α aktivitás szabályozásának feltérképezésére
Peptide Chemistry Symposium 2025. Balatonszárszó – 2025.05.20.