

# MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DIAGNOSZTIKAI FELHASZNÁLÁSRA  
ALKALMAS APTAMEREK  
FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATA

Dr. Mészáros Tamás

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Biológiai Tanszék

Budapest  
2021



## Tartalomjegyzék

1. Irodalmi háttér.....	3
2. Célkitűzések.....	7
3. Az alkalmazott módszerek vázlatos ismertetése .....	8
4. Eredmények és értékelésük .....	9
4.1.Fehérjetermelés <i>in vitro</i> transzlációval .....	9
4.1.1. <i>In vitro</i> transzlációs vektorcsalád létrehozása.....	9
4.1.2. A vektorcsalád alkalmazás funkcionális fehérjevizsgálatokra .....	9
4.2.Aptamerszelekcióhoz kapcsolódó módszertani fejlesztések 12	
4.2.1. Fehérje-aptamer kölcsönhatás vizsgálata homogén rendszerben .....	12
4.2.2. Primerblokkolt aszimmetrikus PCR .....	12
4.2.3. Aptamerkönyvtár előállítása módosított nukleotiddal.....	13
4.3.Diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelekciója és alkalmazása .....	14
4.3.1. Kismolekulára szelektív aptamerek.....	14
4.3.2. Vírusselektív aptamerek .....	14
4.3.3. Kardiális troponin I-re szelektív spiegelmeres ..... 16	
5. Összefoglalás.....	19
6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke.. <b>Error!</b>	
<b>Bookmark not defined.</b>	
7. Köszönetnyilvánítás.....	27



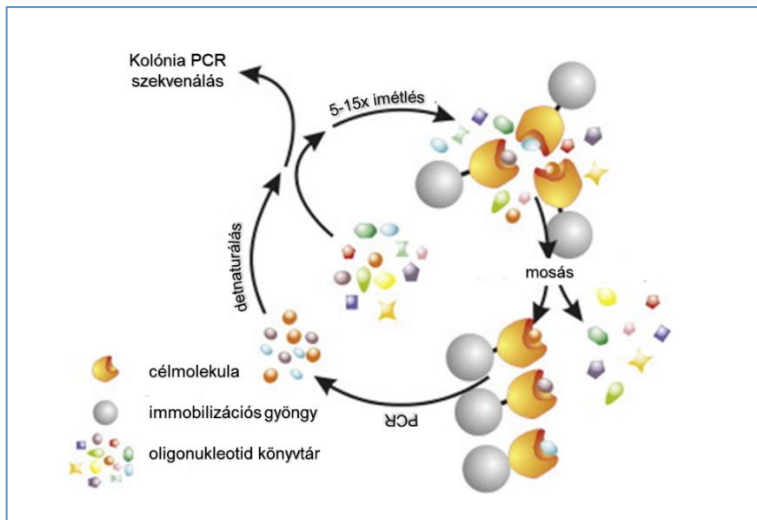
## 1. Irodalmi háttér

A fehérje detektálás orvosi diagnosztikai alkalmazása Richard Wright munkáságával, a vizeletben kimutatható albumin és a vesebetegségek közötti kapcsolatot feltárásával 1827-ben vette kezdetét. Az azóta eltelt idestova kétszáz évben a fehérjék vizsgálatának diagnosztikai jelentősége dinamikusan növekedett, napjainkban több mint kétszáz fehérje mennyiségének változását mérik rutinszerűen.

A diagnosztikai mérések során gyakran nagyon alacsony koncentrációban jelenlévő fehérjéket rendkívüli szelektivitással, általában az egyik legkomplexbb fehérje mátrixban, nevezetesen a vérben kell kimutatni, illetve koncentrációjukat meghatározni. A fehérjék szelektív azonosítására lehetőséget nyújthat az adott fehérjére jellemző enzimaktivitás mérése, azonban a diagnosztikai potenciállal rendelkező fehérjéknek csak elenyésző része rendelkezik ilyen tulajdonsággal. A jól mérhető, karakteres enzimaktivitás hiányának következtében a fehérjék kimutatása döntő részt közvetlen azonosításukkal valósul meg. A fehérjék szelektív felismerésére a jelenleg alkalmazott diagnosztikai eljárások szinte kizárólagosan ellenanyagokat alkalmaznak. Habár a hibridóma sejtekkel termelt monoklonális ellenanyagok szelektivitás és affinitás szempontjából megfelelnek a diagnosztikai receptorokkal szemben támasztott elvárásoknak, nagy méretük, kémia és fizikai behatásokkal szembeni érzékenységük, valamint költséges előállításuk korlátokat szab alkalmazásuknak.

A múlt század 80-as éveinek végén megjelent SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) egy olyan eljárás, amely célmolekulájukhoz az ellenanyagokhoz hasonló specifitással és affinitással kötődő egyszálú oligonukleotidok izolálását teszi lehetővé (1. ábra). A SELEX során iteratív ciklusokkal  $10^{12-14}$  különböző szekvenciával rendelkező egyszálú nukleinsavból, az ún. aptamerkönyvtárból kerülnek izolálásra a célmolekulához szelektíven kötődő oligonukleotidok, az ún. aptamerek. A SELEX vázlatosan a következőképpen összegezhető: A célmolekulát szilárd hordozó felületén

immobilizáljuk, majd egy  $10^{12-14}$  különböző szekvenciával rendelkező oligonukleotidból álló aptamerkönyvtárral inkubáljuk. Ezt követően a hordozóhoz kötődő, nem a célmolekulára szelektív oligonukleotidokat mosással eltávolítjuk. Az oligonukleotidok terminális szekvenciái ismertek, így a mosási lépés után megmaradt, célmolekulát felismerő nukleinsavak PCR-rel amplifikálhatók. Az ily módon felsokszorzott oligonukleotidokat egyszálúsítjuk, és célmolekulára szelektív nukleinsavakra dúsult könyvtárral megismételjük a szelekciót. Általában 5-15, egyre szigorúbb szelekciós és mosási körülményeket magába foglaló ciklussal ismételjük a fenti lépéseket, majd a folyamat utolsó lépéseként meghatározzuk az aptamerek szekvenciáit.



1. ábra A SELEX folyamatábrája.

A SELEX nagyszámú lehetséges aptamert eredményez, melyek szelektivitása és affinitása nagymértékben eltérhet, így az egyes jelöltek egyedi karakterizálása és funkcionális vizsgálata elengedhetetlen a gyakorlati jelentőséggel bíró aptamerek azonosításához. Ezen lépés negligálása, illetve a szelekciós körülmények helytelen megválasztása vezetett számos olyan aptamer publikálásához, melyek csak ideális körülmények között

működnek, így gyakorlati jelentőségük korlátozott. A karakterizáláshoz szükséges oligonukleotidokat általánosságban kémia úton szintetizálják, mely – figyelembe véve a tényt, hogy a karakterizálásra használt módszerek döntő része valamilyen módon jelölt aptamert igényel - nagyszámú aptamer esetén magas költségű megközelítés.

A fehérjékre szelektív aptamerek izolálása megfelelő mennyiségű és tisztaságú célfehérjét igényel. A fehérjetermelés leggyakoribb módozatai valamilyen élő sejten alapulnak, melyek közül költséghatékonyságuk és viszonylag egyszerű fenntartásuk következtében a bakteriális rendszerek a legelterjedtebbek. A prokarióta sejtekben az eukarióta fehérjék azonban túlnyomórészt nem veszik fel megfelelő térszerkezetüket, nem reprezentálják a natív fehérjék építőpjait, így ellenanyag generálásra és aptamerszelekcióra gyakran alkalmatlanok. A problémára megoldást nyújthatnak a magasabb rendű eukarióta sejteken alapuló megközelítések, ezek felhasználását viszont speciális laboratóriumi infrastruktúra igényük, körülményes és költséges tenyésztésük korlátozza.

A múlt század 50-es évei óta ismert, hogy a fehérjeszintézis nem igényel intakt sejteket, amennyiben a szükséges komponensek rendelkezésre állnak, a transláció *in vitro* is végbemegy. A jelenséget hosszú ideig csak a transláció molekuláris mechanizmusának feltárására használták, lehetséges fehérjetermelő rendszerként történő vizsgálata évtizedekig váratott magára, mára azonban már tucatnyi organizmus sejtjeiből kiindulva állítottak össze *in vitro* translációs elegyeket. Az eukarióta fehérjék előállítására alkalmas sejtmentes rendszerek közül a búzacsíra kivonaton alapuló tűnik a legígéretesebbnek, mivel a csíranövény eredendően alacsony endogén mRNS tartalmú, a búza kodon használata rugalmas, valamint az extraktum egyszerűen és költséghatékonyan előállítható. A búzacsíra sejtmentes rendszer optimalizálása során két irányba történtek fejlesztések. Az egyik irány a szintetizált fehérjemennyiséget hivatott növelni, ugyanis a hagyományos batch típusú reakciók egy órán belül leállnak, így mindössze nanogrammm nagyságrendű

fehérjét képesek termelni. A tovább fejlesztett rendszerek ezt a problémát a reakciótér és a reakciót tápláló komponenseket tartalmazó oldat szeparálásával oldják meg. A fejlesztés másik iránya az eukarióta mRNS módosításaival kapcsolatos nehézségeket kívánta orvosolni. Az eukarióta sejtekben a hatékony transzláció elengedhetetlen követelménye az mRNS 5' 7-metilguanozin- sapkája, illetve 3' poliA farka, ezek a módosítások az *in vitro* transzkripcióval előállított mRNS-en azonban technikailag körülményesen és alacsony hatásfokkal valósíthatók meg. A búzacsíra alapú sejtmentes transzláció vezető kutatócsoportja kombinatorikus megközelítéssel vizsgálta a hatékony transzlációhoz szükséges poszttranszkripció módosítások kiválthatóságát. Kísérleteikkel igazolták, hogy a 7-metilguanozin-sapka helyettesíthető a dohány mozaik vírus transzlációs enhanszer  $\Omega$  szekvenciájával és annak 5' végén elhelyezett GAA nukleotid triplettel. Megfigyeléseik szerint, a poliA fark sem elengedhetetlen követelménye a transzlációnak, amennyiben kb. 1500 bázis hosszúságú 3' UTR régió található a stop kodont követően, a fehérje szintézise hasonló hatékonyságú, mint a poliA farkkal rendelkező mRNS-ek esetében. Mindezen információk ismeretében a munkacsoport létrehozta az ún. pEU vektorokat, melyek *in vitro* transzkripcióban történő alkalmazásával búzacsírákivonatban hatékonyan transzlálódó mRNS-ek állíthatók elő. Habár a pEU vektorok biztosítják a fehérjeszintézishez szükséges mRNS molekulákat, két szempontból nem felelnek meg a jelenleg elvárt fehérjetermelő rendszerek követelményeinek. Egyrészt a kívánt fehérjéket kódoló plazmidkonstrukciók létrehozásáért restriktions endonukleázok és ligáz segítségével történik, így minden újabb vektor létrehozása egyedi tervezést és eljárást igényel. Másrészt az eredeti vektorok semmilyen affinitás kromatográfiára alkalmas peptidmotívumot, illetve fehérjedomént nem kódolnak, így a szintetizálódott fehérje tisztítása rendkívül összetett és időigényes feladat.



## 2. Célkitűzések

Munkánk kezdetekor az aptamerkutató meghonosítása, illetve az aptamerek diagnosztikai alkalmazásának vizsgálata volt az elsődleges célunk, az aptamerszelekciós kísérleteink során azonban megoldásra váró technikai nehézségekkel is szembesültünk, így feladataink metodikai fejlesztésekkel is kiegészültek, eredeti célkitűzéseink ennek megfelelően módosultak. Az ily módon meghatározott céljaink pontokba szedve az alábbiakban összegezhetők:

1. A fehérjékre specifikus aptamerszelekció fehérjeigényének gyors és költséghatékony biztosítása *in vitro* transzlációval.
2. Az aptamer-fehérje kölcsönhatás kimutatására alkalmas homogén mérési rendszer optimalizálása.
3. Nagyszámú aptamerjelölt szűrésére alkalmas egyszálú DNS-t biztosító eljárás kifejlesztése.
4. Módosított nukleotidot tartalmazó aptamerkönyvtár létrehozása.
5. Kismolekulára szelektív aptamerek előállítása és alkalmazása.
6. Nem humán patogén, növényi vírusra-szelektív (ASPV) aptamerek izolálása és alkalmazása.
7. Légúti óriássejtes vírusra-szelektív (RSV) aptamerek izolálása és alkalmazása.
8. cTnl fehérjét szelektíven felismerő spiegelmerek izolálása és alkalmazása szendvics típusú mérési rendszer fejlesztésben.

### 3. Az alkalmazott módszerek vázlatos ismertetése

Az eredeti vektorok *SspI* felismerő helyét *in vitro* mutagenézissel eltávolítottuk, a szükséges *NotI* helyet pedig azonos eljárással létrehoztunk bennük. A megfelelő restrikciós endonukleázokkal kezelt vektorokba a PCR-rel, illetve kémiai szintézissel létrehozott ligálás-független klónozóhelyet (LIC) és GST, Halo, valamint a 6xHis, 12xHis, FLAG jelölést biztosító DNS-fragmenteket inszertáltuk.

A transzlációhoz szükséges mRNS-ek *in vitro* transzkripcióval, a fent említett vektorok alkalmazásával kerültek előállításra. A fehérjék *in vitro* transzlálására búzacásra alapú, kétrétegű rendszert használtunk. A termelt fehérjéket a megfelelő, affinitástisztításra alkalmas, mágneses gyöngyök használatával tisztítottuk. A fehérjék funkcionális tanulmányozása során a „pull-down assay”, immunoblot, *in vitro* enzimaktivitás-mérés, illetve rapid filtráció módszereket alkalmaztunk.

A módosított aszimmetrikus PCR fejlesztése során a keletkezett reakció termékeket PAGE alkalmazásával ellenőriztük. Az oligonukleotid-könyvtár amplifikációjához emulziós PCR-t használtunk, majd az ily módon keletkezett könyvtár szekvenciaösszetételét nagy áteresztőképességű szekvenálással (HTS) határoztattuk meg.

Az aptamerek funkcionális vizsgálatára alkalmas módszer fejlesztése során az AlphaScreen (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen) technológiát használtuk.

Az aptamerek szelekciójához a tervezett felhasználásuknak megfelelően módosított SELEX protokollokat alkalmaztunk. A szelektiót követően az aptamerjelöltek szekvenciáját Sanger szekvenálással határoztattuk meg. A legígéretesebb aptamerjelöltek azonosítására a membránszűrés, AlphaScreen, fluorerszcencia polarizáció módszereket alkalmaztuk. Az aptamerek funkcionális analízise során Enzyme Linked Oligonucleotide Assay (ELONA), AlphaScreen, AlphaLISA és felületi plazmon rezonancia (SPR) került alkalmazásra.

## 4. Eredmények és értékelésük

### 4.1. Fehérjetermelés *in vitro* transzlációval

#### 4.1.1. *In vitro* transzlációs vektorcsalád létrehozása

Korábbi eredményeink igazolták, hogy a búzacsíra sejtmentes rendszer jól használható eukarióta fehérjék termelésére. Ezen eredményektől motiválva olyan búzacsíra *in vitro* transzlációra alkalmas vektorcsaládot hoztunk létre, amelyek megoldás nyújtanak a korábban elérhető plazmidok hiányosságaira. Az optimalizált vektorok szükségtelessé teszik a restriktációs endonukleázokon és ligáláson alapuló időigényes, körülményesen kivitelezhető klónozási módszert. A módosított vektorokba univerzális eljárással, megfelelő primerekkel kivitelezett PCR-rel és LIC alkalmazásával inszertálhatók a kívánt fehérjét kódoló DNS-fragmentek. A vektor felhasználásával szintetizált fehérjék N terminálisan dohány karcolatos vírus (TEV) proteázzal hasítható GST és Halo fehérjedomént, illetve 6xHis, 12xHis, FLAG peptidmotívumot hordoznak, így oldhatóságuk a megfelelő jelölés alkalmazásával szignifikánsan növelhető, valamint affinitáskromatográfiával tisztíthatók.

#### 4.1.2. A vektorcsalád alkalmazás funkcionális fehérjevizsgálatokra

A vektorkonstrukciók kifejlesztését követően több tucat fehérjét állítottunk elő az *in vitro* transzlációs rendszerrel. A termelt fehérjék döntő része növényekből származott, így ezek előállítása a várakozásoknak megfelelően nem ütközött akadályba. Ezen fehérjékkel kivitelezett kísérletes munkákból származó publikációk az 1. táblázatban kerültek összegzésre.

A növényi fehérjék mellett vírus, egér és különböző humán fehérjék előállítására is kísérletet tettünk, és a megfelelő rekombináns fehérjecímke, illetve transzlációs körülmények azonosítását követően gyakorlatilag minden fehérjét sikeresen termeltünk (az 1. táblázatban csak azok a fehérjék kerültek feltüntetésre, melyek felhasználása közleményt eredményezett).

Az ily módon előállított fehérjék elsősorban kutatócsoportunkban folyó aptamerszelekciós munkák fehérjeigényét biztosították, de közülük számos funkcionális vizsgálatokban került alkalmazásra.

A kidolgozott módszerben rejlő lehetőségeket szemléltetendő csak egy, a technikailag legnagyobb kihívást jelentő fehérjével végzett kísérleteinkre szeretném felhívni a figyelmet. A GLUT10 transzportfehérjében bekövetkező mutációk kanyargós artéria szindrómát eredményezhetnek. Az *in vitro* transzlációval a fehérje transzportfunkcióját vizsgáltuk. A GLUT10 membránlokalizált fehérje, így *in vivo* szintézise a transzlációs kivonatból hiányzó durva felszínű endoplazmatikus retikulumhoz (ER) kapcsolt. A transzlációs fehérjekivonat nem tartalmaz ER-t minek következtében a membránfehérjék *in vitro* transzlációval történő előállítása alapállapotban rendkívül alacsony hatásfokú. A problémát orvosolandó az egy fázisú transzlációs elegyet liposzóma hozzáadásával kiegészítettük, majd háromórás inkubációt követően centrifugáltuk az elegyet. A csapadék és felülúszó immunoblot analízise igazolta, hogy a liposzóma hozzáadása drasztikusan növeli az oldatban jelenlévő GLUT10 fehérjét, és az ily módon előállított proteoliposzóma funkcionális vizsgálatokra is alkalmas. Az *in vitro* transzlációból származó proteoliposzómával kivitelezett rapid filtrációs kísérletünkkel elsőként bizonyították, hogy a GLUT10 fehérje a dehidroaszkorbát transzportjáért felelős.

<b>Organizmus</b>	<b>Előállított fehérje</b>	<b>Alkalmazás</b>	<b>Közlemény</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$\gamma$ -Tubulin, E2FA, E2FB, E2FC és mutánsaik	kölcsönhatás vizsgálat	J. OF EXPERIMENTAL BOTANY (2020)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMPK4, AtMPK6, AtMKK1, AtMKK4, PIN6 és mutánsaik	szubsztrát azonosítás és foszforilációs hely meghatározás	NEW PHYTOLOGIST (2018)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMPK4, AtMPK6, AtMKK1, AtMKK4, PIN1	foszforilációs hely meghatározás	FEBS LETTERS (2018)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtBRCA1 és AtRBR	kölcsönhatás vizsgálat	EMBO JOURNAL (2017)
<i>Homo sapiens</i>	cTnl	spiegelmer vizsgálata	ANALYTICAL METHODS (2017)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMPK3, AtMKK4, WUS	foszforilációs hely meghatározás	BMC PLANT BIOLOGY (2016)
<i>Homo sapiens</i>	GLUT10	membrántranszport-aktivitás mérés	FEBS LETTERS (2016)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMPK6, AtMKK4, $\gamma$ -tubulin, EB1c, EB1a és GCP4	szubsztrát azonosítás	NEW PHYTOLOGIST (2015)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMPK9 és annak mutánsai	kinázaktivitás szabályozásának vizsgálata	BIOCHEMICAL JOURNAL (2015)
<i>Homo sapiens</i>	RANK	tioptamerszelekció	WIENER KLINISCHE WOCHENSCHRIFT: MIDDLE EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINE (2014)

1. táblázat

## **4.2. Aptamerszelekcióhoz kapcsolódó módszertani fejlesztések**

### **4.2.1. Fehérje-aptamer kölcsönhatás vizsgálata homogén rendszerben**

A valós körülmények között is alkalmazható aptamerek előállításának a SELEX csak az első lépése, azt minden esetben az izolált oligonukleotidok egyedi vizsgálatának kell követnie. Az aptamerek tulajdonságai közül az egyik legfontosabb a célmolekulájukkal alkotott komplexük disszociációs állandója ( $K_D$ ), melynek meghatározására változatos metodikák állnak rendelkezésre. Nagyszámú aptamer vizsgálatánál a  $K_D$  meghatározására alkalmas módszerekkel szemben támasztott elvárások között ott találjuk az egyszerű és gyors kivitelezhetőséget is. Általánosságban kijelenthető, hogy a bioanalitikában ezeknek a feltételnek legjobban az elválasztási és mosási lépéseket nem igénylő ún. „mix and measure” módszerek felelnek meg.

Az AlphaScreen egy olyan a fenti elvárásoknak megfelelő, gyorsan, egyszerűen kivitelezhető nagy jelerősítésű homogén távolság modulált lumineszcens módszer, melyet kölcsönhatásvizsgálatokra fejlesztettek ki. Az aptamerek karakterizálását lehetővé tevő, AlphaScreen metodikán alapuló módszert a későbbiekben ismertetendő növényi vírusfehérjére szelektált aptamerekkel dolgoztuk ki. Munkánkkal igazoltuk, hogy ez a megközelítés jól használható aptamer-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, és megfelelően megválasztott körülmények között a kölcsönhatás disszociációs konstansának meghatározására is alkalmas.

### **4.2.2. Primerblokkolt aszimmetrikus PCR**

Az aptamerszelekciót követően az egyes jelöltek egyedi karakterizálásához szükséges egyszálú oligonukleotidok előállítására módosított aszimmetrikus PCR módszert, az ún. primer blokkolt aszimmetrikus PCR-t (PBA-PCR) fejlesztettük ki.

Az eljárás lényege, hogy a két primer koncentrációja azonos, azonban a reverz primer 90% 3' foszforilált, így a polimeráz általi extenzió ezen a szálon jórészt gátolt. A PBA-PCR-al amplifikált oligonukleotid-könyvtár HTS analízise alapján kijelenthető, hogy a módszer alkalmazása nem torzítja a kiindulási könyvtár szekvencia összetételét, nem csökkenti annak komplexitását. Az eljárás gyakorlati használatát az AlphaScreen alkalmazásával demonstráltuk, melynek során a proNT-BNP-re történő aptamerszelekció egyes lépéseinek során megfigyelhető célfehérjére szelektív oligonukleotidok dúsulását tudtuk igazolni az előállított igazsátlú DNS-ekkel.

#### **4.2.3. Aptamerkönyvtár előállítása módosított nukleotiddal**

A módosított nukleotidokat tartalmazó aptamerek két szempontból is előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek a kizárólag természetes nukleotidokból felépülőkkel szemben. Egyrészt nukleázrezisztensebbek, másrészt a mesterséges nukleotidokat is magukba foglaló könyvtárakból kiinduló SELEX szignifikánsan megnöveli a sikeres szelekció esélyét. Ezen kedvező tulajdonságok tudatában a módosított nukleotidokkal kivitelezett SELEX laboratóriumunkban történő meghonosítása mellett döntöttünk.

Kutatásainkkal igazoltuk, hogy a triptofán szerű oldallánccal rendelkező 5-Indolil-AA-dUTP-t (TAdUTP) legnagyobb hatékonysággal a KOD-XL polimeráz építi be a DNS-szintézis során és a módosított nukleotid alkalmazása nem vezet a kiindulási oligonukleotid-könyvtár szekvencia-összetételének degenerációjához. A KOD-XL-t emulziós PCR-ben alkalmazva, olyan TAdUTP tartalmú aptamerkönyvtárat hoztunk létre, amely alkalmasnak bizonyult RSV szelektív aptamerek izolálására.

## 4.3. Diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelekciója és alkalmazása

### 4.3.1. Kismolekulára szelektív aptamerek

Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség több faja által termelt ochratoxin A (OTA) egy teratogén, immunszuppresszív, neurotoxikus és karcinogén hatással rendelkező, 403,81 Da tömegű molekula. Munkánkkal az OTA mérésére alkalmas aptamereket kívántunk izolálni.

A hagyományos SELEX eljárás során agarózgyöngyön immobilizált OTA-t alkalmaztunk szelekciós célpontként, és olyan aptamereket izoláltunk, amelyek a célmolekulától mindössze egy fenilalaninban, illetve egyetlen atomban különböző warfarint és ochratoxin B-t is meg tudják különböztetni az OTA-tól. A szelektált aptamerekkel kidolgozott fluoreszcencia-intenzitásváltozáson alapuló mérési eljárásunk gyakorlatilag releváns, alacsony nM-os koncentrációknál is alkalmas az OTA mennyiségi meghatározására. Az ismertetett aptamereink gyakorlati jelentőségét az is igazolja, hogy más kutatócsoportok az OTA mérésére alkalmas lateral-flow, mikrofluidikai és grafén alapú szteganografikus rendszereket fejlesztettek.

### 4.3.2. Vírus szelektív aptamerek

A vírusok aptamerekkel történő azonosítására irányuló kutatásaink kezdetén egy humán patogenitással nem rendelkező, könnyen hozzáférhető növényi vírust, nevezetesen az alma törzsgödrösödés vírust (Apple stem pitting virus, ASPV) választottuk kísérleteink alanyául.

Az aptamerek szelekciójához a bakteriális fehérjetermelő rendszerben előállított vírusburokfehérjéket használtunk, majd a SELEX-szel kapott aptamereink felhasználhatóságát több megközelítéssel vizsgáltuk. Az ily módon kapott eredményeink igazolták, hogy az aptamerek megfelelő optimalizálást követően western és dot blot-on is szelektíven detektálják célfehérjéiket. Emellett az aptamerek alkalmasak voltak növényi kivontokból



történő vírus kimutatásra is. Ez utóbbi feladatra az együttműködő partnerünk által optimalizált SPR és a két aptamer alkalmazásával kialakított, szendvics elrendezésű ELONA (Enzyme Linked Oligonucleotide Assay) bizonyultak a legalkalmasabbnak. Az általunk kifejlesztett ELONA eljárás víruskimutatási határa hozzávetőlegesen egy nagyságrenddel alacsonyabbnak adódott, mint a kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA készlet megfelelő értéke. Együttműködő laboratóriumuk további méréseivel bizonyította, hogy DOS-ELONA az ASPV rutinszerű kimutatására is alkalmas, illetve egy további kutatócsoport víruskimutatásra alkalmas hidrogélt dolgozott ki. Mindezek az eredmények illusztrálják, hogy az aptamerek sok esetben nem csak helyettesíthetik, de akár felül is múlhatják az ellenanyagokat mint vírusdiagnosztikai receptorokat.

Ezen előzmények után érdeklődésünk egy általánosan előforduló, a pediátriai osztályokon leggyakoribb nozokomiális fertőzést okozó vírus, úm. a légúti óriássejtes vírus (Respiratory Syncytial Virus, RSV) felé fordult. A jelenleg alkalmazott RSV-diagnosztikai tesztek tulajdonképp a vírusgenom RT-PCR-alapú, illetve a vírus-burokfehérjék immunokémiai alapú kimutatását jelentik. Kutatásainkkal ezen diagnosztikai eljárásokra kívántunk lehetséges alternatívát nyújtani szelektív aptamerek előállításával, illetve azok vizsgálatával.

A megelőző vírusszelektív aptamerek izolációjánál látottakkal eltérően, a SELEX során inaktivált teljes vírust alkalmaztunk szelekciós célpontként. A SELEX nyomán kapott aptamereinkről igazoltuk, hogy a vírus G fehérjéjéhez nM nagyságrendű  $K_D$  értékkel kötődik. A legkedvezőbb paraméterekkel rendelkező aptamerek diagnosztikai alkalmazhatóságát AlphaScreen-nel tanulmányoztuk, és ezek a munkák igazolták, hogy a szelektált oligonukleotidok jól használhatók a klinikailag releváns RSV koncentrációk garatkenetből történő kimutatására. Ezek a megfigyelések megerősítik a korábbi mérési eredményeinket, miszerint a vírusok tisztán aptamereken alapú megközelítésekkel magas szelektivitással és érzékenységgel mutathatók ki.

### 4.3.3. Kardiális troponin I-re szelektív spiegelmerek

Az L-cukrot tartalmazó nukleotidokból felépülő spiegelmerek képezik jelenleg az egyetlen teljes nukleázrezisztenciával rendelkező oligonukleotid-típust, és ezen tulajdonságuknak gyakorlati szempontból kiemelt jelentősége van, különösen a terápiás célokra tervezett – a testfolyadékokban napokig vagy akár hetekig jelenlévő – spiegelmerek esetében. A spiegelmerek ezen rendkívül kedvező sajátságuk ellenére sem terjedtek el, mert izolálásuk az aptamerekéhez képest körülményes, ugyanis szelekciójuk a célfehérje D-aminosavakból álló enantiomerjét igényli.

A cTnI-specifikus spiegelmerek szelekciójához, a teljes fehérje enantiomer szintézisét kiiktatandó, az ún. doménmegközelítést alkalmaztuk, azaz a röntgenkristallográfiás szerkezet alapján a fehérje felszínén elhelyezkedő peptidmotívumok D-enantiomerjét alkalmaztuk szelekciós célmolekulaként. A cTnI spiegelmerszelekciónk célja szendvics elrendezésben is működő spiegelmerpár létrehozása volt, így a fehérjén két, térben távoli, cTnI-re specifikus eptitópot kerestünk csökkentendő annak a valószínűségét, hogy a két spiegelmer együttes bekötődése sztérikusan gátolt legyen. A fehérje N-, illetve C-terminálisának közelében található peptidmotívumok enantiomerjeire kivitelezett a szelekciót követően az izolált oligonukleotidokat egyedileg vizsgálatuk, hogy a legkedvezőbb kötési paraméterekkel rendelkezőket azonosítsuk. Ezen utóbbi lépés kivitelezéséhez két, korábban ismertlen megközelítést fejlesztettünk ki, melyek közös jellegzetessége, hogy a szűrés során a D-peptidek és laboratóriumunkban előállított biotin, illetve fluoreszcein jelölt oligonukleotidok közötti kölcsönhatást vizsgáljuk. Ezek az eljárások jelentősen felgyorsítják és költséghatékonyabbá teszik spiegelmerjelöltek szűrését, így növelik a legjobb jelöltek azonosításának esélyét. Ezt a kijelentést alátámasztja, hogy mind az N-, mind a C-terminálisra néhány nM-os  $K_D$  értékkel rendelkező spiegelmereket sikerült szelektálnunk. Megjegyzendő, ezek a disszociációs állandók jelentősen

alacsonyabbak a cTnI diagnosztikában alkalmazott ellenanyagok megfelelő értékeinél. Az izolált spiegelmerok a cTnI-re mutatott magas affinitásuk mellett a diagnosztikai receptorokkal szemben támasztott másik fontos paraméternek, a szelektivitásnak is eleget tesznek, ugyanis az SPR mérések szerint a célmolekulájuk és az azzal rendkívül magas homológiát mutató vázizom TnI (sTnI) között is képesek differenciálni.

A fenti eredmények alapján a cTnI szelektív azonosítása akár egyetlen spiegelmerrel kivitelezhető, azonban napjaink diagnosztikai rendszereitől a szelektivitás mellett az érzékenység is elvárt követelmény. Ezen második feltételnek a szendvics elrendezésű rendszerek alkalmazásával lehet eleget tenni, ahol is az első biomarkerre szelektív receptor befogóként működik, míg a második, a detektorként funkcionáló antitest több nagyságrendnyi jelerősítést tehet lehetővé. Szendvics rendszerek előnyeit szem előtt tartva megvizsgáltuk, hogy az N-terminális epitópra szelektált spiegelmer mennyiben alkalmazható, a spiegelmer-ellenanyag szendvics mérési elrendezésben. Kísérleteinkhez az ALPHA kimondottan vérplazmában, illetve szérumban történő mérésekre kifejlesztett változatát, az ún. AlphaLISA-t alkalmaztuk. A cTnI C-terminális epitópjára szelektív és vészérum endogén antitestjei közötti kompetíciót kizárandó a monoklonális ellenanyagot kovalensen kapcsoltuk az AlphaLISA Protein A donor gyöngyökhöz a mérési elegyhez adását megelőzően. Az antitesttel módosított gyöngyöket és a biotinjelölt spiegelmert ismert mennyiségű I-T-C heterotrimert, illetve cTnI fehérjét tartalmazó hígított vészérumhoz adtuk, majd egy órás inkubáció után az elegyet kiegészítettük sztreptavidin donor gyöngyökkel. A nyert adatok alapján a rendszer mind a cTnI komplex, mind pedig a monomer analit pM-os tartományban történő mérésére alkalmas.

Mivel a spiegelmerszelekcióval kapcsolatos kísérleteink célkitűzése az ellenanyagok alkalmazásából fakadó hátrányok kiküszöbölése volt, a cTnI N-terminálisára specifikus spiegelmer izolálását és alkalmazását követően a fehérje C-terminálisát felismerő spiegelmereket szelektáltunk, majd hozzáláttunk egy teljesen spiegelmer alapú mérési rendszer kifejlesztéséhez. Ennek

során megvizsgáltuk, hogy mennyiben alkalmas a spiegelmer szendvics a cTnI koncentrációjának meghatározására. AlphaLISA kísérleteinkben sztreptavidinnel burkolt donor, akceptor gyöngyöket és biotin jelölt spiegelmereket, valamint *in vitro* transzlációval termelt, rekombináns cTnI-t használtunk, és a méréseket szelekciós pufferben és hígított szérumban egyaránt kivitelezтік. A kapott lumineszcenciaintenzitás adatok a pM-os tartományban mind a szelekciós pufferben, mind a szérumban lineárisan változtak a cTnI-koncentrációval, míg a 10 nM-os sTnI-elegyekben a mért érték megegyezett a háttérnél látottakkal.

Mindezen eredmények igazolják, hogy a spiegelmerekre tekinthetünk úgy, mint potenciális diagnosztikai receptorokra, ugyanis célmolekulájuk iránt nagyobb affinitást mutatnak, mint a rutinszerűen alkalmazott antitestek, és a diagnosztika egyik legkomplexebb mátrixában, a vérszérumban is alkalmazhatók a cTnI koncentrációjának meghatározására. Megjegyzendő, hogy a kifejlesztett rendszereink érzékenységében nagyságrendekkel elmaradnak a napjaink cTnI diagnosztikájában elfogadhatótól. A jelenség háttérében minden bizonnyal nem a spiegelmerek korlátai állnak. Az irodalomból jól ismert jelenség, hogy a homogén rendszerek rendkívül érzékenyek a puffer összetételére, a receptorok és gyöngyök koncentrációjára, sőt mi több az egyes komponensek hozzáadásának sorrendjére is. Ezen megfontolások alapján feltételezhető, hogy további, kiterjedtebb optimalizációs kísérletekkel a spiegelmer szendvics alkalmazásával is az ellenanyagoknál látottakhoz hasonló kimutatási határ érhető el, az ilyen irányú fejlesztések azonban túlmutatnak egy alapkutatóval foglalkozó laboratórium keretein.

Mindazonáltal, egyetemi és ipari partnereinkkel folyamatban van olyan mikrofluidikai csatornában immobilizált, illetve fluoreszcens gyöngyökhöz kapcsolt aptamereken és spiegelmereken alapuló diagnosztikai rendszer fejlesztése, melyek érzékenysége várakozásaink szerint elérheti a napjaink diagnosztikájában elvárt tartományt, lehetővé téve ezáltal az ellenanyagoknál több szempontból is kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező aptamerek további gyakorlati alkalmazását.

## 5. Összefoglalás

Kutatócsoportunk munkájával elsősorban az aptamerek szelekciója és karakterizálása során felmerülő nehézségekre kívánt megoldásokat nyújtani, míg az aptamerek gyakorlati alkalmazásához szükséges módszertani fejlesztések főként egyetemi és ipari együttműködő partnereink laboratóriumaiban kerülnek kivitelezésre. A klasszikus SELEX eljárás megfelelő mennyiségben és tisztaságban rendelkezésre álló célmolekulát feltételez, mely elvárásnak fehérje biomarkerekre kivitelezett aptamerszelekció esetében nem kézenfekvő feladat eleget tenni. Az eukarióta fehérjék előállítására az általánosságban használt prokarióta rendszerekben gyakran rendkívül körülményesen, vagy egyáltalán nem megvalósítható. Erre a problémára kínál megoldást a búzacsíra fehérjekivonaton nyugvó *in vitro* transzlációs rendszer, ugyanis alkalmazásával az aptamerek szelekciójához szükséges  $\mu\text{g}$ -os nagyságrendű fehérjemennyiségek gyorsan, egyszerűen és költséghatékonyan állíthatók elő. Az első *in vitro* transzlációs kísérleteink sikerei a rendszer továbbfejlesztésére inspiráltak minket. Fejlesztéseink nyomán olyan vektorok jöttek létre, melyek lehetővé teszik a kívánt fehérjéket kódoló konstrukciók gyors létrehozását, a vektorcsalád tagjaival pedig nyolc különböző jelölő címke alkalmazása válik elérhetővé. A kialakított vektorok létjogosultságát jól igazolja, hogy alkalmazásukkal – azon túl, hogy aptamerszelekciós kísérleteink fehérjeigényét biztosítottuk – számos fehérje funkciójának felderítéséhez tudunk hozzájárulni.

Az aptamerek szelekcióját és karakterizálását közvetlenül segítő fejlesztéseink a DNS egyszerűsítésére, az aptamerjelöltek egyszerű karakterizálására és a szelekció sikerrátájának növelésére kívántak megoldást nyújtani. A hagyományos aszimmetrikus PCR módszer újragondolásával kidolgoztunk egy olyan eljárást, amely jelentős fals termék keletkezése nélkül képes nagy mennyiségű egyszerű DNS szintézisére, és mindemellett a komplex mintákat templátként használó reakciókban sem

módosítja érdemben a kiindulási könyvtár szekvenciaösszetételét. A PBA-PCR kombinálva a laboratóriumunkban optimalizált, aptamer-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára kifejlesztett ALPHA módszerrel alkalmasnak bizonyult nagyszámú aptamerjelölt szűrésére, így nagymértékben segítheti a legígéretesebb paraméterekkel rendelkező aptamerek azonosítását. Az irodalmi adatok alapján az aptamerszelekció sikerét szignifikánsan növeli az aminosavszerű oldalláncokkal rendelkező, módosított nukleotidok alkalmazása, mely megfigyelés fényében laboratóriumunkban egy indolcsoporttal rendelkező uracil felhasználásának bevezetése mellett döntöttünk. A dolgozatban ismertetett eredményeink bemutatják, hogy a megfelelően megválasztott hőstabil DNS polimeráz alkalmazásával a módosított nukleotid hatékonyan beépíthető az oligonukleotidokba. Jelenleg az ily módon létrehozott aptamerkönyvtárral RSV-re kivitelezett szelekció nyomán kapott aptamerek vírusfertőzőképességre kifejtett hatást vizsgáljuk együttműködő partnereinkkel.

A metodikai fejlesztésekkel párhuzamosan változatos célmolekulákra szelektáltunk aptamereket, és bizonyítottuk, hogy a megfelelő körülményekkel kivitelezett SELEX gyakorlati jelentőséggel bíró aptamereket eredményezhet. Az ochratoxin A-ra specifikus aptamereinkkel olyan mikrofluidikai, illetve LFT rendszereket fejlesztettek, amelyek valós mintákban, az elvárt kimutatási határ alatti koncentrációknál is képesek voltak a mikotoxin kimutatására. A vírusokat felismerő aptamereink hasonlóképpen igazolták széleskörű alkalmazhatóságukat. Az ASPV-szelektív aptamereinkről igazoltuk, hogy western és dot blotban, valamint az ELISA-ban érzékenység tekintetében nem csak helyettesíthetik, de felül is múlják a vizsgált ellenanyagot. A felsőlégúti vírusfertőzések egyik gyakori ágensének az RSV-nek a kimutatására sikeresen alkalmaztuk a teljes vírusra szelektált aptamereinket. Az ALPHA rendszerben receptorként használt aptamerek lehetővé tették az RSV klinikailag releváns koncentrációban, garatkenetet tartalmazó mintákban történő szelektív kimutatását.

A cTnI fehérje két jól elhatárolt epitópjához kötődő spiegelmerek is alkalmasak voltak a célfehérjéjük vérplazmatartalmú oldatban történő kimutatására. Megjegyzendő, hogy a spiegelmereken alapuló mérési elrendezéseink kimutatási határai nagyságrendekkel elmaradtak a klinikai gyakorlatban alkalmazott tesztekénél láthatóknál. A viszonylag alacsony érzékenység azonban valószínűsíthetően nem a spiegelmerek inherens tulajdonságaiból fakad, mivel az izolált spiegelmerek szelektivitása kiemelkedő, a közeli homológ sTnI-vel sem mutatnak keresztreaktivitást, disszociációs konstansunk pedig szignifikáns alacsonyabb a diagnosztikai tesztekben alkalmazott ellenanyagokénál. Ezek az eredmények jól illusztrálják a diagnosztikai tesztek fejlesztésével kapcsolatos metodológiai nehézségeket. Az aptamereken alapuló mérési rendszerek – csakúgy, mint az antitesteken alapulók - hosszas, egyedi optimalizálást igényelnek, és ennek idő- és költségigénye alapkutatással foglalkozó laboratóriumokban nem biztosított.

Az aptamerek hosszú éveken keresztül szinte kizárólag egy szűk kutatói kör érdeklődését keltették fel, gyakorlati jelentőséget nem tulajdonítottak nekik, és sok esetben kétkedéssel fogadták, hogy bármilyen tekintetben alternatívái lehetnek az ellenanyagoknak. Ez a szemlélet, ha lassan is, de változásnak indult az utóbbi évtizedben, és a piaci várakozások is az aptamerek teranosztikai térhódítását prognosztizálják. Kutatócsoportunk több mint másfél évtizedes munkájával ehhez a térhódításhoz és az aptamerek hazánkban történő meghonosításához kívánt hozzájárulni, reményeink szerint némi sikerrel.

## **6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke**

### **6.1. Az értekezésben ismertetett közlemények**

1. Percze, Krisztina ; Mészáros, Tamás (2020)  
Analysis of Modified Nucleotide Aptamer Library Generated by Thermophilic DNA Polymerases  
CHEMBIOCHEM 21 : 20 pp. 2939-2944. , 6 p.
2. Nagy, Szilvia Krisztina ; Kallai, Brigitta Margit\* ; Andras, Judit ; Meszaros, Tamas (2020)  
A novel family of expression vectors with multiple affinity tags for wheat germ cell-free protein expression  
BMC BIOTECHNOLOGY 20 : 1 Paper: 17 , 9 p.
3. Tolnai, Z.J. ; András, J. ; Szeitner, Z. ; Percze, K. ; Simon, L.F. ; Gyurcsányi, R.E. ; Mészáros, T. (2020)  
Spiegelmer-based sandwich assay for cardiac troponin i detection  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 21 : 14 Paper: 4963 , 11 p.
4. Tolnai, Z. ; Harkai, Á. ; Szeitner, Z. ; Scholz, É.N. ; Percze, K. ; Gyurkovics, A. ; Mészáros, T. (2019)  
A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR  
ANALYTICA CHIMICA ACTA 1047 pp. 225-230. , 6 p.
5. Percze K, Szakacs Z, Scholz E, Andras J, Szeitner Z, Kieboom CH, Ferwerda G, Jonge MI, Gyurcsanyi RE, Meszaros T (2017)  
Aptamers for respiratory syncytial virus detection.  
SCIENTIFIC REPORTS 7: Paper 42794. 11 p.
6. Szeitner Zsuzsanna, Doleschall Anna, Varga Marina, Keltai Katalin, Revesz Katalin, Gyurcsanyi Robert E, Meszaros Tamas (2017)  
Spiegelmers as potential receptors for cTnI diagnostics.  
ANALYTICAL METHODS: ADVANCING METHODS AND APPLICATIONS 9:(35) pp. 5091-5093.



7. Nemeth CE, Marcolongo P, Gamberucci A, Fulceri R, Benedetti A, Zoppi N, Ritelli M, Chiarelli N, Colombi M, Willaert A, Callewaert BL, Coucke PJ, Grof P, Nagy SK, Meszaros T, Banhegyi G, Margittai E (2016)  
Glucose transporter type 10 - lacking in arterial tortuosity syndrome - facilitates dehydroascorbic acid transport.  
FEBS LETTERS 590:(11) pp. 1630-1640.
8. Corné H. van den Kieboom, Samantha L. van der Beek, Tamás Mészáros, Róbert E. Gyurcsányi, Gerben Ferwerda, Marien I. de Jonge (2015)  
Aptasensors for viral diagnostics.  
TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY 74: pp. 58-67.
9. Maureen McKeague, Ranganathan Velu, Kayla Hill, Viola Bardóczy, Tamás Mészáros, Maria C DeRosa (2014)  
Selection and Characterization of a Novel DNA Aptamer for Label-Free Fluorescence Biosensing of Ochratoxin A.  
TOXINS 6:(8) pp. 2435-2452.
10. Szeitner Z, András J, Gyurcsányi RE, Mészáros T (2014)  
Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. Journal of PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 101: pp. 58-65.
11. Szeitner Zs, Lautner G, Nagy SzK, Gyurcsányi RE, Mészáros T (2014)  
A rational approach for generating cardiac troponin I selective Spiegelmers. CHEMICAL COMMUNICATIONS 50:(51) pp. 6801-6804.
12. Lautner G, Balogh Z, Gyurkovics A, Gyurcsányi RE, Mészáros T (2012)  
Homogeneous assay for evaluation of aptamer-protein interaction.  
ANALYST 137:(17) pp. 3929-3931.
13. Zsófia Balogh, Viola Bardóczy, Gergely Lautner, Beata Komorowska, Róbert E. Gyurcsányi, Tamás Mészáros (2010)  
Selection and versatile application of virus specific aptamers.  
THE FASEB JOURNAL, 24 (11): 4187-95

14. Lautner, G., Balogh, Zs., Bardóczy, V., Mészáros T., Gyurcsányi, R., E. (2010)  
Aptamer based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging.  
ANALYST, 135 (5): 918-26
15. Viola Bardóczy, Viktória Géczi, Tatsuya Sawasaki, Yaeta Endo, Tamás Mészáros (2008)  
A set of ligation-independent in vitro translation vectors for eukaryotic protein production.  
BMC BIOTECHNOLOGY, 8:32
16. Magdalena Weingartner, Marie-Claire Criqui, Tamás Mészáros, Pavla Binarova, Anne-Catherine Schmit, Anne Helfer, Aude Derevier, Mathieu Erhardt, Laszlo Bögre and Pascal Genschik (2004)  
Expression of a non-degradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast.  
PLANT CELL 16 (3): 643-457

## **6.2. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények**

1. Kállai, B M ; Kourová, H\* ; Chumová, J ; Papdi, C ; Trögelová, L ; Kofroňová, O ; Hozák, P ; Filimonenko, V ; Mészáros, T ; Magyar, Z Bögre, L and Binarová, P ( 2020)  
γ-Tubulin interacts with E2F transcription factors, regulate proliferation and endocycle in Arabidopsis  
JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 71 : 4 pp. 1265-1277.  
, 13 p.
2. Ditengou FA, Gomes D, Nziengui H, Kochersperger P, Lasok H, Medeiros V, Paponov IA, Nagy SK, Nádai , Mészáros T, Barnabás B, Ditengou BI, Rapp K, Qi, Li X, Becker C, Li C, Dóczy R, Palme K (2018)  
Characterization of auxin transporter PIN6 plasma membrane targeting reveals a function for PIN6 in plant bolting  
NEW PHYTOLOGIST 217:(4) pp. 1610-1624.

3. Magdalena Dory, Elizabeth Hatzimasoura, Brigitta M Kállai, Szilvia K Nagy, Katalin Jäger, Zsuzsanna Darula, Tímea V Nádai, Tamás Mészáros, Enrique Lopez Juez, Beáta Barnabás, Klaus Palme, László Bögre, Franck A Ditengou, Róbert Dóczi (2018)  
Coevolving MAPK and PID phosphosites indicate an ancient environmental control of PIN auxin transporters in land plants  
FEBS LETTERS 592:(1) pp. 89-102.
4. Zoltán Szakács, Tamás Mészáros, Marien I De Jonge, Róbert E Gyurcsányi (2018)  
Selective counting and sizing of single virus particles using fluorescent aptamer-based nanoparticle tracking analysis  
NANOSCALE (2018)
5. Horvath BM, Kourova H, Nagy S, Nemeth E, Magyar Z, Papdi C, Ahmad Z, Sanchez-Perez GF, Perilli S, Blilou I, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Meszaros T, Binarova P, Bogre L, Scheres B (2017)  
Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control  
EMBO JOURNAL 36:(9) pp. 1261-1278.
6. Dory M, Doleschall Z, Nagy SK, Ambrus H, Meszaros T, Barnabas B, Doczi R (2016)  
Kinase-Associated Phosphoisofom Assay: a novel candidate-based method to detect specific kinase-substrate phosphorylation interactions in vivo.  
BMC PLANT BIOLOGY 16:(1)Paper2041,3 p.
7. Kohoutova L, Kourova H, Nagy SK, Volc J, Halada P, Meszaros T, Meskiene I, Bogre L, Binarova P (2015)  
The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with gamma-tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress.  
NEW PHYTOLOGIST 207:(4) pp. 1061-1074.

8. Nagy SK, Darula Z, Kallai BM, Bogre L, Banhegyi G, Medzihradzsky KF, Horvath GV, Meszaros T (2015)  
Activation of AtMPK9 through autophosphorylation that makes it independent of the canonical MAPK cascades.  
BIOCHEMICAL JOURNAL 467:(1) pp. 167-175.
9. Nagy SK, Mészáros T (2014)  
In vitro translation-based protein kinase substrate identification.  
In: Kirill Alexandrov, Wayne A. Johnston, Cell-Free Protein Synthesis.  
METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. pp. 231-243.
10. Boglárka Sonkoly, Viola Bardóczy and Tamás Mészáros (2012)  
Expression and Purification of Active Protein Kinases from Wheat Germ Extracts Plant Kinase Protocols (779)  
METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 2011. 55-63 p.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Napjaink tudománya egyre kevésbé szól az egyszemélyes felfedezésekről, szinte minden eredmény mögött kutatók sokaságának szoros együttműködése és munkája áll. A dolgozatban bemutatott munkákra is messzemenően igaz ez a kijelentés, az együtt gondolkozásban, a kísérletek kivitelezésében és a közlemények írásában mintegy száz kutató és hallgató vett részt. Mindannyijukat megilletné a névszerinti felsorolás, de jelen keretek között csak azokat a munkatársaimat, hallgatóimat tudom megemlíteni, akikkel hosszabb kapcsolatom volt és személyes fejlődésemre is nagy hatással voltak.

Hoffmann Gyulának és Sivók Bélának köszönhettem, hogy a tudományos pályát választottam. Gyula vezetett be a *Drosophila* genetikába és a kísérletes munkák tervezésébe, kivitelezésébe, Bélának pedig első kutatói állásomat köszönhetem.

Dudits Dénes csoportjában töltött éveim rendkívül meghatározók voltak, az ott látott elmélyült tudás, széles metodikai repertoár lelkesedéssel és segítőkészséggel egészült ki. Ez az időszak életre szóló motivációval és barátságokkal ajándékozott meg. Az ottani munkatársaim közül Magyar Zoltánt szeretném kiemelni, aki amellett, hogy tapasztalt kutatóként megismertetett a molekuláris biológiai módszerekkel, közeli barátta vált, munkakapcsolatunk és barátságunk azóta is töretlen.

Bögre László frissen alakuló kutatócsoportjában tölthettem angliai posztdoktori éveimet. Laci azonnal valódi posztdoktorként kezelt, bevont a laboratóriumalapítás körüli és oktatási teendőkbé, így amellett, hogy tovább bővíthettem metodikai tudásomat, a labormenedzsmentbe és a molekuláris biológiai oktatásba is betekinthettem. A szakmai fejlődésem támogatásán túl, Laci segítségére minden tekintetben számíthattam és számíthatok.

Hazaköltözésemmel Salgó András alkalmazással nem csak nekem, de velem együtt az aptamereknek is bizalmat szavazott. Az általam javasolt projekt a tanszék kutatási területétől távol állt, ennek ellenére tanszékvezetőként laboratóriumot biztosított a munka beindításához, és segített a hallgatók

toborzásában.

Yaeta Endo nagy szeretettel fogadott intézetében, és nyíltan megosztotta velem az *in vitro* transzlációval kapcsolatos apró trükköket. A nála tett látogatásom adott lendületet az *in vitro* transzlációval kapcsolatos kutatásainknak.

A BME-én töltött éveim alatt alakult ki Gyurcsányi E. Róberttel rendkívül szoros, termékeny és azóta is tartó munkakapcsolatom. Robival számtalan inspiráló megbeszélést folytattunk, és a laboratóriumában született eredmények elengedhetetlen részét képzik az aptamerekkel kapcsolatos publikációink döntő részének.

Mandl József csoportjához való csatlakozásommal egy pezsgő kutatói közösségbe kerültem, és minden segítséget megkaptam aptamerekkel kapcsolatos munkáim folytatásához. Az ő támogatásának eredményeként váltott fokozatot aptamer kutatásunk, és fordult egyértelműen a klinikai alkalmazások irányába. Tanár Úr is azon munkatársaim közé tartozik, akinek tanácsára és segítségére nem csak szakmai, de emberi kérdésekben is mindig számíthatok.

Bánhegyi Gábor és Keszler Gergely intézetvezetősége alatt is maradt a kutatási témáim és személyem töretlen támogatása, ezen időszakban váltak jobban láthatóvá az aptamerekkel kapcsolatos eredményeink.

Jelenlegi intézetvezetőmmel, Csala Miklóssal - neki köszönhetően - a Semmelweis Egyetemhez való csatlakozásom első pillanatától kezdve közeli viszony alakult ki. Miklós – habár én vagyok az idősebb – egyfajta mentorommá vált, tanácsokkal látott el és bátorított. Jelen dolgozat megszületésében is elévülhetetlen érdemei vannak. Kapcsolatunk messze túlmutat egy szakmai viszonyon, Miklós életem talán legnehezebb helyzetében is folyamatosan mellettem állt.

A dolgozatban ismertetett kísérleti adatok legnagyobb részt lelkes és alapos PhD hallgatóim kezeit dicsérik, az ő áldozatos munkájuk nélkül ezek az eredmények nem jöhettek volna létre. Szerencsés vagyok, hogy velük dolgozhattam, illetve néhányukkal továbbra is dolgozhatok együtt. Mindenképp

szeretném név szerint is felsorolni őket: Bardóczy Viola, Balogh Zsófia, Harkai Ákos, Kállai Brigitta, Nagy Szilvia, Szeitner Zsuzsanna, Percze Krisztina és Tolnai Zoltán. Szilvinek külön köszönet a dolgozat esztétikus szerkesztéséért.

A laboratóriummal kapcsolatos technikai, adminisztrációs és pénzügyi problémák egész biztosan a mélybe rántottak volna, amennyiben nem segít Bombicz Józsefné, Gránicz Mária, Gyurkovics Anna és Szénási Béláné. Hatalmas terhet vettek le a vállamról, amiért hálás vagyok.

Talán nem egy tudományos dolgozatban kell a családnak iránt érzett hálát kimutatni, ezt a legbölcsebb a mindennapi tetteinkkel megtenni, de mégis szeretném ebben a formában is elmondani, mennyire köszönöm. Szüleimnek, testvéremnek, hogy mindig segítettek törekvéseimben, különösen anyunak, aki akkor is hit bennem, kiállt értem, amikor arra nem voltam érdemes. Csodálatos gyerekeimnek, Lilinek és Balázsnak, akik nálam felnőttebben viselkedtek és támogattak a családi krízis során, és nagyszerű emberekké váltak. Eni nagyinak, akire második anyámként tekinthetek. Végére hagytam azt, aki leginkább mindennapjaim része, életem párját, Beát, mert nem is tudom, hogy lehetne megköszönni, amit értem tett és tesz. Ígérem, igyekezni fogok.

