

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

DIAGNOSZTIKAI FELHASZNÁLÁSRA ALKALMAS APTAMEREK FEJLESZTÉSE ÉS VIZSGÁLATA

Dr. Mészáros Tamás

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Biológiai Tanszék

Budapest

2021

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| 1. Rövidítésjegyzék | 3 |
| 2. Bevezetés | 9 |
| 3. Irodalmi áttekintés | 11 |
| 1. A fehérjeszintézis lehetséges módozatai, általános jellegzetességei | 11 |
| 1.1. A fehérjekutatás helye a molekuláris biológiában | 11 |
| 1.2. Fehérjeszintézis kémiai szintézissel és sejtekben történő túltermeltetéssel | 12 |
| 1.3. Rekombináns fehérjék affinitáscímkei | 13 |
| 1.4. Fehérjeszintézis <i>in vitro</i> translációval | 16 |
| 2. A plazmaproteom diagnosztikája | 21 |
| 2.1. A humán plazmaproteom diagnosztikai jelentősége | 21 |
| 2.2. Az akut miokardiális infarktus biomarkerei | 22 |
| 2.3. Ellenanyagok diagnosztikai alkalmazása | 26 |
| 2.4. A cTnI diagnosztikája | 32 |
| 2.5. Vírusdiagnosztika | 35 |
| 3. Az aptamerek | 38 |
| 3.1. Az aptamerek felfedezése | 38 |
| 3.2. Az aptamer-ligand kölcsönhatások molekuláris háttere | 39 |
| 3.3. Az aptamerek szelekciója | 42 |
| 3.4. Aptamerek módosított nukleotidokkal | 47 |
| 3.5. Kardiális troponinokra szelektált aptamerek | 52 |
| 3.6. Vírusokra szelektált aptamerek | 53 |
| 4. Célkitűzések | 56 |
| 5. Anyagok és módszerek | 57 |
| 1. mRNS előállítása <i>in vitro</i> transzkripcióval | 57 |
| 2. Fehérjeszintézis <i>in vitro</i> translációval | 57 |
| 3. ASPV burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója | 58 |
| 6. Eredmények és értékelésük | 60 |
| 1. Fehérjetermelés <i>in vitro</i> translációval | 60 |
| 1.1. A búzacsíra alapú <i>in vitro</i> translációs rendszer alkalmazása és továbbfejlesztése | 60 |
| 1.2. A búzacsíra alapú <i>in vitro</i> translációs vektorcsalád bővítése | 66 |
| 2. Aptamerszelekcióhoz kapcsolódó módszertani fejlesztések | 72 |
| 2.1. Fehérje-aptamer kölcsönhatás vizsgálata homogén rendszerben | 72 |
| 2.2. Primerblokkolt aszimmetrikus PCR | 74 |

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----|
| 2.3. Aptamerkönyvtár előállítása módosított nukleotiddal | 82 |
| 3. Diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelekciója és alkalmazása | 87 |
| 3.1. Kismolekulára szelektív aptamerek | 87 |
| 3.2. Vírusszelektív aptamerek | 93 |
| 3.2.1. Alma törzsgödrösödés vírus | 93 |
| 3.2.2. Légúti óriássejtes vírus | 100 |
| 3.3. Kardiális troponin I-re szelektív spiegelmerek | 107 |
| 3.3.1. Spiegelmerek szelekciója a cTnI N-terminális epitópjára | 107 |
| 3.3.2. Kardiális troponin I mérése spiegelmer-antitest szendvics rendszerrel | 112 |
| 3.3.3. Kardiális troponin I mérése spiegelmer-spiegelmer szendvics rendszerrel | 115 |
| 7. Összefoglalás | 121 |
| 8. Referenciák | 124 |
| 9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke | 140 |
| 1. Az értekezésben ismertetett közlemények | 140 |
| 2. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények | 141 |
| 10. Függelék | 144 |
| 1. A dolgozatban tárgyalt aptamer és spiegelmerek szekvenciái | 144 |
| Köszönetnyilvánítás | 146 |

1. Rövidítésjegyzék

| | |
|----------------|--|
| ACLSV | alma klorotikus levélfoltosság vírus (apple chlorotic leaf spot virus) |
| ALPHA | homogén távolság modulált lumineszcens vizsgálat (amplified luminescent proximity homogenous assay) |
| AMI | akut miokardiális infarktus |
| AMV | alma mozaik vírus |
| aPCR | aszimmetrikus PCR |
| ASAT | aszpartát-aminotranszferáz |
| ASPV | alma törzsgödörösödés vírus (apple stem pitting virus) |
| BirA | <i>E. coli</i> biotin-ligáz |
| BLI | bioréteg interferometria (biolayer interferometry) |
| BVDV | szarvasmarha vírusos hasmenés vírus (bovine viral diarrhea virus) |
| CDK | ciklin-függő kináz (cyclin dependent kinase) |
| CDR | komplementaritás meghatározó régió (complementary determining region) |
| CE | kapilláris elektroforézis (capillary electrophoresis) |
| CECF | folyamatosan cserélődő sejtmentes (continuous-exchange cell-free) |
| CFCF | folyamatos áramlásos sejtmentes (continuous-flow cell-free) |
| CH | nehéz lánc konstans régió (constant heavy chain) |
| CK | kreatin-kináz |
| CL | könnyű lánc konstans régió (constant light chain) |
| CLIA | kemilumineszcencia immunvizsgálat (chemiluminescent immunoassay) |
| cTnl | kardiális troponin I |
| CS-SELEX | sejtfelszín-SELEX (cell-surface-SELEX) |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| dNTP | dezinukleotid-trifoszfát |
| DOS-ELONA | dupla oligonukleotid szendvics ELONA (double oligonucleotide sandwich ELONA) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | erősített kemilumineszcencia (enhanced chemiluminescence) |
| ECLIA | elektro-kemilumineszcencia immunvizsgálat (electro-chemiluminescence immunoassay) |
| ELISA | enzimhez kapcsolt immunsorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| ELONA | enzimkapcsolt oligonukleotid vizsgálat (enzyme linked oligonucleotide assay) |
| ePCR | emulziós PCR |
| ER | endoplazmatikus retikulum |
| Fab | antigénkötő fragment (antigen-binding fragment) |
| Fc | kristályosítható fragment (crystallizable fragment) |
| FP | fluoreszcencia polarizáció |
| GO | grafén-oxid |

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

| | |
|------------|---|
| GST | glutation-S-transzferáz |
| HAT médium | hipoxantin, aminopterin, timidin médium |
| HCV | hepatitis C vírus |
| HIV | humán immundeficiencia-vírus |
| HPV | humán papillomavírus |
| HRV | humán rhinovírus |
| HS-TEG | 11-merkaptoundecil-tetraetilén-glikol |
| HTS | nagy áteresztőképességű szekvenálás (high-throughput sequencing) |
| IgG | immunglobulin gamma |
| IMAC | immobilizált fém affinitáskromatográfia (immobilised metal affinity chromatography) |
| IPTG | izopropil- β -tiogalaktopiranozid |
| I-T-C | kardiális heterotrimer troponin komplex |
| LAMP | hurok mediált izotermális amplifikáció (loop mediated isothermal amplification) |
| LATE-PCR | exponenciálist követő lineáris PCR (Linear-After-The-Exponential) |
| LDH | laktát-dehidrogenáz |
| LFIA | laterális áramlásos immunovizsgálat (lateral flow immunoassay) |
| LFT | laterális áramlásos teszt (lateral flow test) |
| LIC | ligálás-független klónozás (ligation independent cloning) |
| LOCI | lumineszcens oxigén csatornázó immunovizsgálat (luminescent oxygen channeling immunoassay) |
| MBP | maltóz kötő fehérjéje (maltose binding protein) |
| MBP | mielin bázikus fehérje (myelin basic protein) |
| MST | mikroskálás termoforézis |
| NMR | mágneses magrezonancia (nuclear magnetic resonance) |
| ORF | nyílt leolvasási keret (open reading frame) |
| OTA | ochratoxin A |
| PBA-PCR | primer blokkolt aszimmetrikus PCR (primer blocked asymmetric PCR) |
| PCR | polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) |
| POC | ellátási hely (Point-Of-Care) |
| RCA | gördülő gyűrű amplifikáció (rolling circle amplification) |
| RIA | radioimmuno-vizsgálat (radioimmunoassay) |
| RNS | ribonukleinsav |
| RSV | légúti óriássejtes vírus (Respiratory Syncytial Virus) |
| RT-PCR | reverz transzkriptáz PCR |
| scFv | egyláncos variábilis fragment (single-chain variable fragment) |
| SDS-PAGE | SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) |
| SELEX | ligandok exponenciális dúsítása tervezett evolúcióval (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) |
| SG | SYBR Green |

| | |
|------------------|--|
| SOMAmer | slow off-rate modified aptamer |
| SPR | felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance) |
| ssDNS | egyszálú DNS (single-stranded DNA) |
| sTnI | vázizom troponin I |
| TAdUTP | 5-indolil-AA-dUTP |
| TEG | tetraetilén-glikol |
| T _m | olvadási hőmérséklet (melting temperature) |
| TMV | dohány mozaik vírus (tobacco mosaic virus) |
| TnC | troponin C |
| TnI | troponin I |
| TnT | troponin T |
| TPA | tripropil-amin |
| VEGF | vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor) |
| VH | nehéz lánc variábilis régió (variable heavy chain) |
| V _H H | egydoménes antitest, nanotest |
| VL | könnyű lánc variábilis régió (variable light chain) |

Nagyapám emlékének

2. Bevezetés

Az ősi görög orvostudomány minden betegség hátterében a testfolyadékok rendelleneségeit vélte felfedezni, ennek megfelelően a vizeletvizsgálat a kezdetektől fogva az orvoslás részét képezte. A vizelet habzása és a krónikus veseelégtelenség közötti kapcsolatot már Hippokratész felismerte, és propagálta a vizelet kiterjedtebb analizését. Habár az uroszkópia középkorra a diagnosztika egyik fő módszerévé, a vizeletes lombik az orvoslás egyik szimbólumává vált, a vizsgálatok évszázadokon át kizárólag az érzékszervi benyomásokon és néhány egyszerű paraméter mérésén alapultak.

Az első mélyrehatóbb, a testfolyadékok komponenseinek azonosítására irányuló vizsgálatok a XVII. századra datálhatók. Ebben az időszakban kezdték el a vizelet, illetve a vér összetevőit desztillálással meghatározni, melynek eredményeként Robert Boyle összeállította az emberi vér alkotórészeit leíró munkáját, és ezzel kezdetét vette a testfolyadékok kémiai analízise. A következő évszázadokban a kémiai, biokémiai diagnosztika lassan, de folyamatosan fejlődött, és egyre inkább az orvoslás integráns részévé vált. Az 1800-as évek végén megnyitották az első klinikai laboratóriumokat, a következő évszázad elején pedig megjelent az első diagnosztikai gyorseszteszt, amely lehetővé tette a betegség, nevezetesen a tífusz helyben, néhány csepp vérből történő kimutatását.

A biokémiai diagnosztika – elsősorban az ismertté vált biomarkerek folyamatosan bővülő körének, valamint a fizikai, kémiai technológiák fejlődésének köszönhetően – a XX. században indult igazán virágzásnak. Egyre több, vizeletben és vérben megjelenő fehérjéről és egyéb vegyületről igazolták a patológiás elváltozásokhoz kapcsolható koncentrációváltozásukat. Ezen felfedezések eredményeként napjainkban már több mint száz, fehérje biomarker koncentrációját mérik rutinszerűen a klinikai laboratóriumokban, és ez a szám folyamatosan bővül. Mindezek fényében nem meglepő, hogy a diagnosztika egyik legáltalánosabban alkalmazott eljárása az adott patológiás elváltozás nyomán megjelenő fehérje biomarkerek szelektív, érzékeny és gyors kimutatása. Az elvárt szelektivitás a jelenleg használatos módszerekben szinte kizárólag az adott fehérjékre specifikus ellenanyagok alkalmazásával biztosítható, így a környezeti hatásokra érzékeny és magas költségű antitestek napjaink diagnosztikájának megkerülhetetlen molekulái lettek. Habár előállításukat a monoklonális, illetve a rekombináns ellenanyagok megjelenése egyszerűbbé és tervezhetőbbé tette, az antitestek sok tekintetben továbbra is a fehérje biomarker alapú diagnosztika szűk keresztmetszetét képezik.

Mintegy három évtizede írták le, hogy az egyszálú oligonukleotidok egyedi és összetett térbeli szerkezetet képesek felvenni, és ily módon egyes fehérjékkel rendkívül szelektíven komplexet alkotni. Ezek az adott fehérjékhez specifikusan kötődő oligonukleotidok aptamer néven váltak ismertté a tudományos irodalomban. Az aptamerek az ellenanyagokkal összevetve számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Ide tartozik a gyors, költséghatékony és teljesen reprodukálható *in vitro* előállíthatóság, a kis méret, az irányított módosíthatóság és a környezeti hatásokkal

szembeni ellenállóság. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az aptamerek kitüntetett diagnosztikai és terápiás potenciállal rendelkeznek, és ilyen értelemben az ellenanyagok alternatíváinak is tekinthetők.

Az aptamerek előállításának bizonyos fázisai a célfehérje megfelelő mennyiségű és tisztaságú elérhetőségét feltételezik, ami humán fehérjék esetében – és általánosságban az eukarióta fehérjék esetében – nem triviálisan teljesíthető elvárás, ugyanis a fehérjetermelésre általánosan alkalmazott prokarióta rendszerekben e fehérjék döntő része nem veszi fel natív térszerkezetét, zárványtestet formál, így előállításuk rendkívül körülményesen, vagy egyáltalán nem kivitelezhető baktérium sejtekben. A humán fehérjék termeltetésére elterjedten alkalmazott eukarióta rendszerek erre a nehézségre megoldást nyújthatnak, azonban ezek sikeres alkalmazása optimalizálást igényel és magas költségekkel jár, így az aptamerszelekcióhoz szükséges fehérjemennyiségek előállítására nem ideális választások. A kisebb mennyiségű eukarióta fehérjék szintézisére jó megoldást jelenthetnek az élő sejteket nem igénylő, ún. *in vitro* translációs rendszerek, melyek segítségével viszonylag gyorsan, magas sikerrátával és költséghatékonyan állíthatók elő a kívánt mennyiségű és tisztaságú fehérjék.

A dolgozat rövid áttekintés kíván nyújtani a heterológ fehérjetermelő rendszerekről, különös hangsúlyt fektetve az *in vitro* translációhoz kapcsolódó szakirodalomra. Emellett vázlatos betekintést óhajt adni a fehérje biomarkereken alapuló laboratóriumi diagnosztika, illetve vírusdiagnosztika szakirodalmába. A kutatócsoportunk munkáihoz kapcsolódó tudományos előzmények közül végül az aptamerkutatásba nyújt bepillantást a dolgozat. A kísérleteinket tartalmazó fejezetek egyrészt az *in vitro* translációra és az aptamerek előállítására irányuló fejlesztéseinket írják le, másrészt bemutatják a kismolekulára, vírus-, illetve kardiovaszkuláris biomarker fehérjékre kivitelezett aptamerszelekciós munkáink eredményeit, és demonstrálják azok diagnosztikai potenciálját.

Reményeim szerint a dolgozat hozzájárul egy hazánkban eddig méltánytalanul elhanyagolt tudományos terület népszerűsítéséhez, továbbá jó kiindulópontot nyújthat a téma iránt érdeklődőknek.

3. Irodalmi áttekintés

1. A fehérjeszintézis lehetséges módozatai, általános jellegzetességei

1.1. A fehérjekutatás helye a molekuláris biológiában

A XX. század közepéig a molekuláris szintű biológiai vizsgálódások döntő részt a fehérjekutatásokkal voltak egyenlők, a fő szerkezeti fehérjék azonosítására és központi metabolikus folyamatokra, valamint az azokban részt vevő enzimek leírására irányultak. Erre az időszakra keltezhető a sejtek anyagcseréjének háttérében álló kémiai reakciók megismerése és számos fehérje funkciójának felderítése. Az ötvenes évek közepére Frederick Sanger kutatótársaival meghatározta az inzulin elsődleges szerkezetét, és ezzel eloszlatta azokat a hipotéziseket, melyek szerint a fehérjék aminosavai random módon, illetve periodikusan kapcsolódnak egymáshoz [1]. Az évtized végére pedig egy másik Nobel-díjas, John Kendrew és társai munkásságának köszönhetően az első fehérje térszerkezeti modell, a miogloblin háromdimenziós szerkezete is nyilvánosságra került [2]. A fehérjekutatások első aranykorának a DNS kettős spirál felfedezése, a nukleinsavak jelentőségének felismerése és a centrális dogma leírása vetett végett. Ezen új ismeretek hatására számos kutató érdeklődése a nukleinsavak felé fordult, és az ezredfordulóig következő évek túlnyomóan a DNS és RNS vizsgálatok jegyében teltek el.

A nukleinsav-kutatások és a molekuláris biológia robbanásszerű fejlődésének oka nemcsak a terület vitathatatlan fontosságában keresendő. A jelenség háttérében egy másik, sokkal prózaiabb tényező is tetten érhető, nevezetesen, hogy a nukleinsavak a fehérjékkel összevetve hálásabb vizsgálati anyagoknak bizonyulnak. A nukleinsavak rendkívül hasonló alapegységekből, nukleotidokból épülnek fel, így kémiai tulajdonságaikra nézve tulajdonképpen homogén mintáknak tekinthetők, minek következtében a nukleinsavak vizsgálatára általánosan alkalmazható metodikák állnak rendelkezésünkre. Ezzel szemben a fehérjéket változatos tulajdonságokkal rendelkező aminosavak alkotják, így csak nagy vonalakban beszélhetünk általános kémia tulajdonságokról, közelebbről nézve minden fehérje sajátos töltéssel, oldhatósággal, reaktivitással és térszerkezettel rendelkezik, lehetővé téve a fehérjék sokrétű funkcióját. Az élet szempontjából elengedhetetlen diverzitás kísérletes szemmel nézve hátrányként jelentkezik, mivel némi túlzással kijelenthetjük, hogy minden egyes fehérjevizsgálatot az adott fehérjére alkalmazható protokollok kidolgozása előzi meg.

A fehérjék kémiai sokfélesége nem az egyetlen korlátozó tényezője a proteomikai kutatásoknak. Míg a nukleinsavak *in vivo* és *in vitro* módszerekkel, valamint kémia szintézissel rutinszerűen alkalmazható eljárásokkal, költséghatékonyan előállíthatók, addig a kísérletekhez szükséges mennyiségű és tisztaságú fehérje előteremtése számos okból kifolyólag nem egyszerű feladat. A tradicionális, a vizsgált élőlényből történő fehérjetisztítási protokollokat egyedileg kell optimalizálni, ráadásul e megközelítés alkalmazhatóságát nagyban korlátozza a tanulmányozandó fehérje gyakran igen kis mennyisége a kiindulási mintában. A napjainkban intenzíven kutatott jelátviteli útvonalakban szerepet játszó fehérjék esetében ez utóbbi probléma különös súllyal jelentkezik, mivel ezen fehérjék a sejtek összfehérje-koncentrációjának csak elenyésző

részét adják, így az esetek túlnyomó részében ez a módszer nem használható, és a tanulmányozandó fehérjét más úton kell biztosítani.

A szükséges fehérjét a tradicionális megközelítés mellett alapvetően három módon: kémiai szintézissel, sejtekben történő túltermeltetéssel, illetve *in vitro* transzlációval állíthatjuk elő.

1.2. Fehérjeszintézis kémiai szintézissel és sejtekben történő túltermeltetéssel

A három eljárás közül a kémia szintézis a legősibb. Emil Fischer a múlt század legelején állította elő a legelső, két aminosavból álló peptidet, majd néhány évvel később egy 15 glicinből és 3 leucinből álló peptidláncot szintetizált, és megjósolta az enzimek ily módon történő előállítását [3]. Fischer jóslata a Merrifield által kifejlesztett szilárd fázisú peptidszintézis megjelenése nyomán, a ribonukleáz A szintézisével vált valósággá [4][5]. Habár az azóta eltelt évtizedekben számos fehérjét állítottak elő kémia szintézissel, a módszer alkalmazása súlyosan korlátozott, mivel a 40 aminosavnál nagyobb peptidok előállítása során a szintézis megbízhatósága és hatékonysága egyaránt szignifikánsan csökken. A nagyobb méretű fehérjék előállítására az ún. szegmentkondenzációs eljárás alkalmazható, melynek során a fehérjét alkotó peptidfragmentek a szintézisüket követően irányított módon kerülnek összekapcsolásra [6]. A módszer segítségével többek között a 238 aminosavból álló zöld fluoreszcens fehérjét is létrehozták, alacsony hatékonysága és komplexitása miatt azonban az eljárás rutinszerű fehérjeelőállításra továbbra sem alkalmas, és ennek megfelelően a nagyobb fehérjék kémiai szintézisére csak speciális esetekben alkalmazzák.

A molekuláris biológia bizonyos tekintetben háttérbe szorította a fehérjekutatásokat, ugyanakkor a DNS-klónozás és rekombináns DNS-sel rendelkező organizmusok 1970-es években történt létrehozása, majd az ennek nyomán megjelenő rekombináns fehérjetermelő rendszerek a proteomika eszköztárát is forradalmian megváltoztatták [7][8]. Ez az új megközelítés két szempontból is óriási előrelépést hozott a fehérjék előállításában. Egyrészt megteremtette a fehérjék korlátlan mennyiségben történő szintézisének elméleti lehetőségét, másrészt a rekombináns fehérjék affinitáscímkevel történő jelölése drasztikusan leegyszerűsítette a fehérjék tisztítását. A fehérjetermelő rendszerek közös sajátossága, hogy valamilyen sejt vagy organizmus genetikai állományát az előállítandó fehérje kódoló szekvenciájának bejuttatásával megváltoztatjuk, majd a transzformált sejtek transzkripciós és transzlációs apparátusát az idegen fehérje szintézisére kényszerítjük. Az ily módon túltermelt fehérjék egyszerű izolálhatóságát általában azáltal biztosítjuk, hogy az eredeti fehérjeszekvenciáját affinitáskromatográfiás elválasztásra alkalmas motívummal egészítjük ki, melynek segítségével a rekombináns fehérje egy lépésben nagymértékben tisztítható. A fehérje túltermelő rendszerek prokarióta és eukarióta sejtekre optimalizált variánsai egyaránt elérhetőek, alap kutatási és ipari mennyiségű fehérjék előállítására egyaránt jól alkalmazhatók.

Nagy mennyiségű célfehérje egyszerű és gazdaságos termelésére általában *Escherichia coli* (*E. coli*) alapú rendszerek az elsődleges választások. A „biotechnológiai

fejőstehének” is nevezett *E. coli* népszerűségét mi sem igazolja jobban a közel száz féle fehérjetermelésre specializált mutáns törzs és több száz vektor elérhetőségénél [9].

A prokarióta fehérjetermelő rendszerek viszonylag egyszerűen kezelhetők és költséghatékonyak, azonban az eukarióta fehérjék előállítása során az esetek túlnyomó részében kiütközik legsúlyosabb korlátozó tényezőjük, nevezetesen a fehérjék helytelen hajtogatása és az ennek következtében megjelenő zárványtestképződés [10]. A helytelen fehérjehajtogatás háttérében többértű okokat találunk, kiemelt szerepet játszik benne a prokarióta és eukarióta organizmusuk transzlációs apparátusának eltérő mivolta, valamint az eukarióta poszttranszlációs módosítások döntő részének hiánya. Sajnálatos módon, minél hatékonyabb a fehérjeexpresszió, minél nagyobb mennyiségben termelődik a heterológ célfehérje, annál nagyobb az esélye a zárványtestek kialakulásának. Ennek a megfigyelésnek megfelelően, a zárványtestképződés megelőzésének általános módja a heterológ fehérje expressziójának csökkentése a baktérium sejtek tenyésztési, illetve indukciós körülményeinek optimalizálásával [11]. Megjegyzendő, hogy a zárványtestek kialakulása bizonyos esetekben kimondottan előnyös, ugyanis a zárványok egyszerű centrifugálási lépéssel elválaszthatók a feltárt sejt kivonatokból, és ilyenkor a csapadék fehérjéinek mintegy 90%-át a túltermelt, heterológ fehérje adja, így a célfehérje egy lépésben nagymértékben tisztítható [12]. A zárványtestekből történő fehérjetisztítás jelentőségét jól példázza a terápiás célokra előállított humán inzulin, amelyet a zárványtest feloldásával és a fehérje újrashajtogatásával gyártanak ipari méretekben [13]. A több száz, zárványtestből kiinduló sikeres fehérjetisztítás ellenére ez a megközelítés továbbra is megmaradt „próba-szerencse” típusú metodikáknak, a fehérje újrashajtogatásához többféle összetételű puffert, változó hőmérsékletet, különböző eljárást, úm. dialízis, hígítás, oszlopon hajtogatás kell tesztelni a legoptimálisabb eljárás azonosításához [14]. A zárványtestekből történő fehérjetisztításnak a nehézségek ellenére is nagy gyakorlati jelentősége van azokban az esetekben, amikor a célfehérjét ipari mennyiségekben kell előállítani, ezért a folyamat próba-szerencse sikerrátáját növelendő létrehozták a REFOLDdb adatbázist, amelyben a sikeres fehérje-újrashajtogatásokat ismertető közlemények adatai kereshetők különböző paraméterek alapján [15]. Mindezen fejlesztések ellenére az eukarióta fehérjék prokarióta rendszerekben történő előállítását leggyakrabban a zárványtestek kialakulása akadályozza.

1.3. Rekombináns fehérjék affinitáscímkei

A heterológ fehérjék oldható formában történő szintézisét a fentebb leírt optimális tenyésztési és indukciós körülmények, illetve a megfelelő baktérium törzsek alkalmazása mellett nagymértékben elősegítheti a célfehérjéhez fuzionált megfelelő affinitáscímke is. Az első *E. coli*-ban termelt peptid, a szomatosztatin megjelenése után viszonylag sokáig váratott magára a rekombináns fehérjék tisztítását megkönnyítő affinitáscímkek bevezetése [16]. A korai affinitástisztításra alkalmas címkék kezdetekben olyan nagyméretű fehérjék voltak, mint például a bakteriális eredetű β -galaktozidáz vagy a *Staphylococcus*-ból származó protein A [17]. Ezek a több mint 100, illetve 30 kDa méretű fehérjék amellet, hogy lehetővé teszik a rekombináns fehérje immobilizált szubsztrátjával

(*p*-amino-fenil- β -D-tio-galaktozid), illetve kölcsönható partnerével (IgG) történő affinitástisztítását, a termelt fehérje oldhatóságát is növelik.

Amint azt már a korábbiakban láthattuk, a fehérjék előállítására és tisztítására nincs általánosan alkalmazható protokoll, így nem meglepő, hogy oldhatóságuk növelésénél is hasonló problémával szembesülünk - minden fehérje esetében azonosítani kell a szolubilitásukat leghatékonyabban növelő fúziós fehérjepartner. Ennek az igénynek megfelelően számos oldékonyt növelő affinitáscímkét fejlesztettek ki, és ezek közül néhány elődleges célja már nem is a célfehérje tisztításának elősegítése, azt egy további címke hozzáadásával tehetjük lehetővé. A továbbiakban a teljesség igénye nélkül, csak a legelterjedtebb oldhatóságot fokozó címkék kerülnek bemutatásra.

A tioredoxin egy minden organizmusban megtalálható tiol-diszulfid cserében szerepet játszó fehérje, a biotechnológiában az *E. coli* eredetű, 12 kDa méretű változata terjedt el [18]. Habár a tioredoxin az egyik leghatékonyabb szolubilitást növelő fúzióspartner, az affinitástisztításra hagyományosan alkalmazott fenilarzen-oxid szefaróz szelektivitása alacsony, így általában a költséges, tioredoxin-specifikus ellenanyaggal borított gyantát használják az izolálására, vagy a fehérjét His₆ címkével is jelölik, és azon keresztül valósítják meg a tisztítást (lásd később) [19].

A schistosomiasist, a köznyelv szerint vérmételyt okozó *Schistosoma japonicum* laposféreg 26 kDa-os glutation-S-transzferáza (GST) egyike a legelterjedtebb fehérjecímkéző motívumoknak. Népszerűségének oka könnyen érthető, hiszen kiváló oldhatóságnövelő tulajdonsága mellett az immobilizált szubsztrátjával, azaz glutationnal módosított gyanta segítségével egy lépésben nagymértékben tisztítható is [20].

Az oldékonyt növelni hívatott címkék közül az *E. coli* maltózkötő fehérjéje (MBP) a maga 45 kDa-jával az egyik legnagyobb fehérjecímke. A GST-hez hasonlóan az MBP is kettős funkcióval bír, úm. oldhatóságnövelés és viszonylag egyszerű tisztíthatóság maltózzal vagy amilózzal borított gyantákkal, használata mégsem olyan általános, mint az előbbie, mert a szükséges gyanták költségesek, regenerálhatóságuk limitált, és a fehérje proteázzal nem hasítható közvetlenül a gyantáról (lásd később) [21]. A felsoroltakon kívül közel egy tucatnyi további oldékonyt növelő affinitáscímke is elérhető, így számos dedikált fehérjetermelő laboratóriumban bevett eljárás, hogy a munka kezdetén párhuzamosan számos különböző címkével fuzionáltatott célfehérje változatot hoznak létre, és a legígéretesebb konstrukcióra dolgozzák ki a fehérjetisztítási eljárást [22].

Ellentétben az oldékonyt növelő fúzióspartnerekkel, a kimondottan a fehérjék tisztítását szolgáló affinitáscímkék mérete kicsi, sok esetben kevesebb mint 10 aminosav alkotja őket. A kis méret preferálása mögött az a megfontolás áll, hogy a célfehérje N- vagy C-terminálisához ragasztott rövid peptid várhatóan nem befolyásolja a fehérje funkcionalitását, így az affinitáskromatográfiát követően a tisztított fehérje közvetlenül felhasználható a további kísérletekben. A napjainkban alkalmazott affinitáscímkék közül vitathatatlanul a legegyszerűbb, a 6 hisztidinből álló, sokszor csak His₆ elnevezéssel illetett hexahisztidin a legelterjedtebb. A címke népszerűsége alapvetően két okra vezethető vissza, úm. a rendkívül kis méret és töltés, valamint az egyszerű, költséghatékony tisztíthatóság [23]. A tisztítás alapját az képezi, hogy az egymást követő 6 hisztidin az immobilizált átmeneti fémekkel koordinatív kötést alkot, mely kölcsönhatás imidazol hozzáadásával megbontható, így a His₆-jelölt fehérje könnyen eluálható. Az

eljárás immobilizált fém affinitáskromatográfia, vagy röviden csak IMAC néven vonult be a tudományos szakirodalomba. A His₆ egy további kiemelten fontos tulajdonsága, hogy a fém-címke kelátkomplex kialakulását a fehérje hajtogatottsága nem befolyásolja, így denaturált fehérjék is tisztíthatók a módszerrel. A címke ezen tulajdonsága lehetőséget teremt arra, hogy a zárványtestből kaotróp sókkal beoldott fehérjét affinitástisztításnak vessük alá. A sok előnyös tulajdonsága mellett, az IMAC legnagyobb hátulütője, a viszonylag alacsony szelektivitása, nem meglepő figyelembe véve azt tény, hogy az eljárást eredendően a természetesen hisztidin és triptofán gazdag fehérjék szeparálására használták [24]. A bakteriális rendszerekben a rekombináns fehérjének mintegy 80%-os tisztasága érhető el az IMAC alkalmazásával, ez az arány azonban a magasabb rendű organizmusokban túltermelt fehérjék esetében visszaesik, mivel ezen élőlények endogén fehérjei nagyobb arányban tartalmaznak hisztidin és triptofán aminosavakat, ezért a megfelelő tisztaságú fehérje előállításához általában további kromatográfiai lépések beiktatása szükséges [22].

A kalmomodulinkötő peptid (CBP) fehérjetisztító rendszer a miozin könnyűlánc kináz C-terminálisának kalmomodulinkötő képességét aknázza ki [25]. A 26 aminosavból felépülő CBP már alacsony Ca²⁺-koncentrációnál meglehetősen magas affinitással kötődik a kalmomodulinhoz. A Ca²⁺-mal komplexet képző EGTA hozzáadására a kalmomodulin konformációváltozáson esik át, minek hatására megszűnik CBP-kalmomodulin kölcsönhatás, így a kapcsolt fehérje leválik a kalmomodulinnal borított gyantáról. A CBP affinitáscímke legnagyobb előnye, hogy a célfehérje kapcsolása és elúciója egyaránt megvalósítható fiziológiához közeli körülmények között, így a fehérje jó eséllyel megtarthatja natív térszerkezetét.

A biotin-avidin és -sztreptavidin kölcsönhatás a 10⁻¹⁵ mólis disszociációs állandójával a legerősebb ismert nem kovalens biológia interakció. Hagyományosan a fehérjék biotinilációját kémiai úton végezték, ezzel az eljárással azonban a fehérje lizinjeihez random módon kapcsolódik a biotin, így a módosítás a fehérje funkcionalitásának elvesztését eredményezheti. *In vivo* körülmények között a biotin-ligáz szelektív módon a fehérjék biotin-ligázfelismerő szekvenciájában elhelyezkedő lizinjének ε-aminocsoportjához kapcsolja a biotint, amely így a karboxiláz enzimek proszretikus csoportjaként funkcionál [26]. Későbbiekben a viszonylag nagyméretű a biotin-ligáz felismerő szekvenciáját kombinatorikus peptidkönyvtár segítségével minimalizálták, így egy olyan 15 aminosavból összeálló motívum jött létre (AviTag), melyet az *E. coli* biotin-ligáz (BirA) a természetes szubsztrátjával megegyező hatékonysággal biotinilál [27]. Az AviTag-gel jelölt fehérjék enzimatis biotinilációja *in vitro* körülmények között, a fehérjeszintézist követően, illetve a sejteken belül, a célfehérje transzlációjával szimultán is kivitelezhető [28]. Ez utóbbi esetben olyan sejteket kell alkalmazni, melyek a BirA enzimet kódoló plazmidot is hordozzák, minek következtében a célfehérje szintézisének hatékonysága visszaesik.

A biotin-sztreptavidin kölcsönhatást használja ki az ún. StrepTag rendszer is, melynek alapját egy peptidkönyvből izolált, 38 aminosavból álló, sztreptavidinhez erősen és szelektíven kötődő peptid adja [29]. Azon túl, hogy a StrepTag címkézett fehérjék rendkívül szelektíven kapcsolódnak a sztreptavidinhez, elúciójuk az AviTag-gal jelölt fehérjékkel megegyező módon, gyengéd körülmények között kivitelezhető, ugyanis

rendszerre, a fehérjeszintézis templátjaként a kivonatban jelenlévő, endogén mRNS-ek szolgáltak. Elsőként Nirenberg és mtsai. a genetikai kódot feltáró kísérleteik során adtak szintetikus mRNS-eket az *E. coli* sejtkivonatokhoz, a későbbiekben pedig a búzacsíra és nyúl retikulocita fehérjekivonatról is igazolták, hogy exogén mRNS hozzáadásával alkalmasak lehetnek heterológ fehérjék előállítására [39][40].

Jóllehet az exogén mRNS-sel működő *in vitro* transzláció megjelenése jelezte a rendszer irányított fehérjetermelésre történő alkalmazhatóságát, a gyakorlati megvalósulás még évtizedekig váratott magára. Az ilyen célokra optimalizált kivonatok csak a 80-as években jelentek meg. Habár az azóta eltelt időben mintegy tucatnyi élőlényből állítottak elő rekombináns fehérje termelésére alkalmas teljes fehérjekivonatot, legáltalánosabban továbbra is az *E. coli*, nyúl retikulocita, illetve a búzacsíra alapú rendszerek kerülnek alkalmazásra [41].

Az *in vitro* transzláció alapját a sejtekből izolált, transzlációs faktorokat, aminoacil-tRNS-szintetázokat és riboszómaalegységeket tartalmazó elegy adja, ami tulajdonképpen egy teljes sejtkivonattal egyenlő. A szükséges kivonat elméletileg bármilyen fehérjeszintézisre képes sejtől kinyerhető, a gyakorlatban azonban leginkább a fentebb jelzett három organizmus szolgál a transzlációs apparátus forrásaként.

Az *E. coli* sejtek könnyen tenyészthetők, és endogén mRNS-től mentes fehérjekivonatok is viszonylag egyszerűen elkészíthetők, így az *in vitro* transzlációra alkalmas elegy előállítási költsége elenyésző [42]. A kivonat alkalmazásának további előnye, hogy prokarióta eredetének megfelelően az mRNS szintéziséhez szükséges transzkripció és transzláció egy reakcióterben, kapcsolatosan kivitelezhető. Vonzó tulajdonságai ellenére a rendszer eukarióta fehérjék szintézisére történő alkalmazása megfontolandó. A prokarióta transzlációs mechanizmus, a megfelelő dajkafhérjék és poszttranszlációs módosítások hiányának következtében a magasabb rendű organizmusok fehérjéi gyakran hibás térbeli szerkezetet vesznek fel és kicsapódnak. A három *in vitro* transzlációs rendszert összehasonlító kísérlet igazolta, hogy az eukarióta fehérjék transzlációja gyakran részleges az *E. coli* eredetű transzlációs elegyben, a szintetizálódó fehérje a stop kodon elérését megelőzően elhagyja a riboszómát [43].

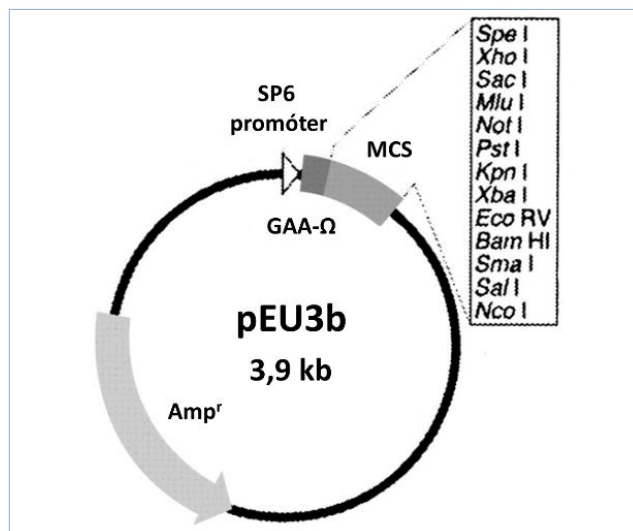
A nyúl retikulocita kivonat alkalmazása során nem szembesülünk a helytelen fehérjehajtogatás kérdésével, a rendszer legnagyobb hátulütője annak magas költsége. A retikulocita tisztításhoz ugyanis nagy mennyiség acetilfenil-hidrazin-kezeléssel anaemiássá tett nyúl vére szükséges, és az endogén mRNS eltávolításához mikrokokkális nukleázzal kell kezelni a kivonatot [40]. A retikulocitán alapuló *in vitro* transzláció használata során további nehézséget jelent, hogy a retikulocita globinra optimalizált kodonhasználata következtében más fehérjék szintézise kevésbé hatékony, illetve a magas endogén hemoglobintartalom megnehezítheti a termék tisztítását.

A búzacsíra embrióban a transzlációs rendszer komponensei dehidratált, inaktív állapotban várakoznak a csírázaskor beinduló nagyléptékű fehérjeszintézisre. A búzacsíra könnyen elérhető, endogén mRNS-tartalma alacsony, rugalmas kodonhasználatának köszönhetően pedig a különböző organizmusokból származó, eltérő kodonpreferenciával rendelkező kódoló régiókról közel azonos hatékonysággal szintetizálja a fehérjéket [44]. A rendszer optimalizálása során kulcsfontosságú volt a kivonatban a preparáció nyomán megjelenő fehérjeszintézist gátló inhibitorok

azonosítása. A tritin N-glikozidáz aktivitása révén a 28S riboszomális RNS egy meghatározott nukleotidjáról távolít el egy adenint, míg a tionin a 43S translációs iniciációs komplex kialakulását gátolja [45] [46]. Ezen endospermiumban lokalizálódó inhibitorok intenzív vizes mosással történő eltávolítása szignifikánsan növeli a búzacsíra-kivonat translációs aktivitását [47].

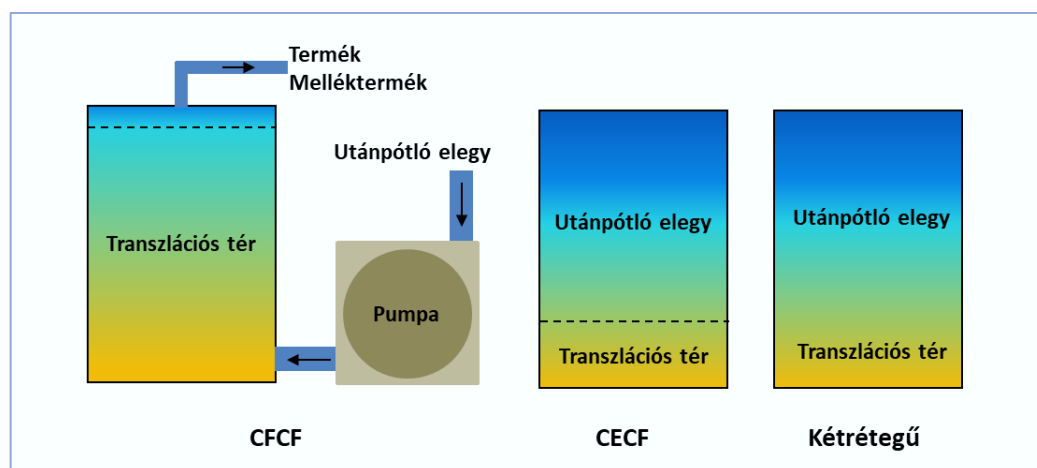
Az általános eukarióta transláció-iniciáció alapvető összetevői az mRNS érése során kialakuló 5' metilguanozin sapka és 3' poliA farok, ezek hiányában a fehérjeszintézis hatékonysága meg sem közelíti az elérhető maximumot [48]. Az *in vitro* translációban használatos mRNS maga is *in vitro* kerül előállításra, és a szükséges 5' sapka a transzkripciót követően csak egy alacsony hatékonyságú reakcióban illeszthető az mRNS-re. Ráadásul a reakciót követően oldatban maradt, felesleges 7-metilguanozin dinukleotid kompetitíven kötődik a sapkakötő eIF4E fehérjéhez, tovább rontva a transláció hatékonyságát [47]. Az mRNS másik végén elhelyezkedő poliA farok biztosítása szintén nehézséget jelent, mert a hosszú polidT/dA szekvenciákkal rendelkező plazmidok stabilitása alacsony, ilyen szekvenciákat nem tanácsos a transzkripció templátként használt plazmidokba építeni. Az mRNS 5' vég poszttranszkripció módosításával összefüggő nehézséget a dohány mozaik vírusra (TMV) irányuló kutatások eredményeinek felhasználásával sikerült kiküszöbölni. A TMV sok más vírushoz hasonlóan, az eukarióta sejtek alapvető translációs mechanizmusának megkerülésével biztosítja saját fehérjéinek szintézisét. A vírus evolúciója során olyan 5'-és 3'-végi, translációt fokozó szekvenciák jelentek meg, melyek sem sapka motívumot, sem poliA farkat nem tartalmaznak. E megfigyelésekből kiindulva olyan, mRNS-t hoztak létre, mely az 5' végén a TMV 71 bázisnyi, translációt fokozó szekvenciárészletét (ún. Ω szekvencia) és egy azt megelőző GAA nukleotidtripletet hordozott. A mérési eredmények alapján az így módon létrehozott mRNS translációs hatékonysága mintegy 75%-a a természetes, metil-guanozin sapkát hordozó mRNS-ének [49]. A kutatócsoport azt is igazolta, hogy a több száz adeninből álló 3' farok megléte nem fontos a transláció szempontjából, az kiváltható egy néhány tíz adeninos motívummal és egy azt megelőző, tetszőleges nukleotidokból álló, nem translálódó régióval [49]. Az így módon létrehozott pEU3b vektorral SP6 RNS polimerázzal átírt mRNS-ben a metilguanozin sapkát a GAA triplet és a TMV Ω szekvencia helyettesíti, míg a poliA farok helyén egy 1500 nukleotid hosszúságú 3' nem translálódó régió található (1. ábra).

A korai heterológ fehérjék termelésére kifejlesztett *in vitro* translációs rendszerek reakcióelegye egy fázisban tartalmazta a sejt kivonatból származó translációs apparátust és a hozzá adott exogén mRNS-t, az aminosavakat, az ATP-t, a GTP-t, valamint olyan energiaregeneráló rendszereket, mint a kreatinfoszfát-kreatin-kináz vagy a foszfoenol-piruvát-kináz. Habár ez a fajta elrendezés a fehérjék rendkívül gyors és egyszerű előállítását teszi lehetővé, kapacitása korlátozott, csak μg alatti fehérjemennyiségek szintézisére alkalmas. A reakció a Mg^{2+} -nal komplexet képző anorganikus foszfát felhalmozódása, az energiaforrások kimerülése miatt, illetve a szintetizált fehérje esetleges translációt gátló hatása következtében néhány óra alatt leáll [50]. Sok esetben már az ilyen nagyságrendű fehérje előállítása is elegendő kísérleti anyagot biztosíthat fehérjekölcsönhatás vizsgálatokhoz, illetve enzimaktivitás mérésekhez, de legtöbbször ennél nagyobb mennyiségű fehérje kinyerése kívánatos.



1. ábra A pEU3b vektor vázlatos szerkezete.

Az *in vitro* transzláció hatékonyságának növelésére először a folyamatos áramlásos sejtmentes (continuous-flow cell-free, CFCF) elrendezés jelent meg [51]. A CFCF rendszerben a transzlációs apparátust és mRNS-t tartalmazó elegyen keresztül folyamatosan áramoltatjuk az energiát és aminosavakat egyaránt tartalmazó puffert (2. ábra). Habár a módosítás a fehérjeszintézis hatékonyságának több százszoros emelkedését eredményezte, összeállítása körülményes és költséges, így további fejlesztésre szorult. A CFCF alternatívájaként szolgálhatnak az ahhoz hasonló hatékonyságú, de jóval egyszerűbben kivitelezhető, folyamatosan cserélődő (continuous-exchange cell-free CECF) és kétrétegű (bilayer) rendszerek (2. ábra) [52][49]. Az előbbi változatban az energia és szubsztrát utánpótlását biztosító puffer dialízis membránnal kerül elválasztásra a transzlációs apparátust és mRNS-t tartalmazó reakciótértől, míg a kétrétegű elrendezésben a nagyobb sűrűségű transzlációs elegyet egyszerűen az utánpótló puffer alá rétegezzük. Mindkét elrendezés alkalmas milligrammos nagyságrendű fehérjetermelésre - a CECF némileg hatékonyabb, a kétrétegű azonban jobban megfelel a nagy áteresztőképességű rendszerek elvárásainak.



2. ábra Az *in vitro* transzláció hatékonyságát fokozó CFCF, CECF, valamint kétrétegű rendszerek elrendezése [53].

A búzacsíra *in vitro* transzlációról igazolták, hogy a felhasználásával termelt eukarióta fehérjék nagyrésze natív szerkezetét vesz fel és enzimaktivitással is rendelkezik. Az *in vitro* kináz aktivitás-mérések alapján a vizsgált mintegy 500 *Arabidopsis* fehérjekináz közel fele rendelkezett aktivitással a búzacsíra kivonatban történő transzlációt követően [54]. Későbbiekben azt is bizonyították, hogy a búzacsíra alapú transzláció alkalmazhatósága nem korlátozódik növényi fehérjék előállítására. A mintegy 13 000 különböző humán fehérjét tanulmányozó, átfogó kísérlet során a fehérjék döntő része megfelelő térszerkezettel és hatékonysággal termelődött [55]. A két közleményt összevetve látható, hogy a humán fehérjék előállítása sikeresebb volt, mint a növényi protein kinázoké. Az első ránézésre meglepő eredményre magyarázatot adnak az alkalmazott affinitáscímkék. Az *Arabidopsis* kinázainak termelése során fehérjék egyöntetűen N-terminálisan lokalizált His₆ címkével rendelkeztek, míg a humán fehérjéket többféle jelöléssel szimultán transzlálták (úgy mint a kisméretű His₆, FLAG, Strep-II, és oldhatóság növelő GST és MBP), minek következtében a megfelelő affinitáscímke alkalmazása a fehérje oldható formában történő szintézisét eredményezhette. A búzacsíra alapú *in vitro* transzlációban rejlő lehetőségeket jól illusztrálja, hogy a fenti, „humán fehérjegyárnak” keresztelt rendszer segítségével egy több mint 13 000 fehérje pontot hordozó chipet tudtak létrehozni [55].

2. A plazmaproteom diagnosztikája

2.1. A humán plazmaproteom diagnosztikai jelentősége

Habár minden testfolyadék analízise diagnosztikai jelentőséggel bír, kétségkívül mind közül a vérplazmát vizsgálják leggyakrabban. A szérum összetétele nagyrészt megegyezik a plazmáéval, a legfőbb eltérés a véralvadással együtt járó proteolitikus folyamatok nyomán kialakuló fehérjefragmentek megjelenésében, illetve a fibrinogén hiányában mutatkozik meg. A vérvételt követő *in vitro* proteolízis megjósolhatatlanul hasíthatja az adott vizsgálat tárgyát képző analitot is, ezért a diagnosztika preferált mintája legtöbb esetben a vérplazma [56].

A vérplazma népszerűségének hátterében a phlebotomia rutinszerű kivitelezhetősége és a helyesen tárolt minta viszonylagos stabilitása mellett, legfőbb okként elemzésének rendkívül nagy információtartalmát találhatjuk. A vérplazmában némi túlzással bármelyik szövetben expresszált fehérje megjelenhet, ennek megfelelően a szervezet legkomplexebb proteomjával rendelkezik. A plazmában előforduló fehérjéket az alábbi főbb kategóriákba oszthatjuk [57]:

Klasszikus vérplazmafehérjék: A plazmában funkcionáló, döntő részt a máj és belek által termelt fehérjék (pl. albumin). Molekulatömegük általában a vese filtrációs határa felett van, és hetekig vannak jelen a keringésben.

Immunglobulinok: A plazmában funkcionálnak, de jellegzetes szerkezetük és rendkívüli sokszínűségük – becslések szerint 10 millió különféle Ig kering a plazmában – miatt külön csoportba kerültek. Molekulatömegük alapján a plazma legnagyobb méretű fehérjéit adják.

Endokrin receptor ligandok: Méretüknek megfelelően gyorsabban, illetve lassabban ürülnek a keringésből (pl. inzulin, illetve eritropoetin).

Parakrin receptor ligandok: Alacsony molekulatömegű lokálisan ható peptidek. (pl. citokininek)

Vezikuláris transzportban szerepet játszó fehérjék: Változatos fehérjecsalád (pl. klatrin)

Sejtroncsolódás következtében megjelenő fehérjék: Különböző szövetekből származó rendkívül változatos fehérjék (pl. troponinok)

Aberráns fehérjeszekréció következtében megjelenő fehérjék: Fiziológias körülmények között nem szekretált fehérjék. Általában tumoros sejtekhez köthető az aberrált fehérjeszekréció (pl. PSA).

Idegen fehérjék: Fertőzés nyomán megjelenő mikroorganizmusok, paraziták fehérjéi.

A plazma fehérjéinek tanulmányozása a XIX. században vette kezdetét, és a kor technikai lehetőségének megfelelően sokkal inkább egyes fehérjecsoportok (pl. a vízben oldhatatlan globulinok), mint egyedi fehérjék vizsgálatát jelentette, de a marhaszérumban legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjét, az albumint már ekkor sikerült izolálni és kristályosítani [58].

A plazmaproteom részletes feltárását a szeparációs, és még inkább a tömegspektrometriás metodikákban bekövetkező fejlődés tette lehetővé. A múlt század 80-as éveiben a 2D-gélelektroforézissel kombinált fehérje-mikroszekvenálás volt az általánosan alkalmazott plazmafehérje-vizsgálati eljárás, és ezzel a megközelítéssel néhány tucat fehérje került azonosításra [59]. A proteomika fejlődési léptéke néhány

évtizede korábban elképzelhetetlen mértéket öltött, és ennek következtében a fehérje-tömegspektrometria felbontása és érzékenysége drámain megnövekedett. A napjainkban elérhető műszerezettség és fehérje-adatbázisok segítségével egyetlen mintából akár ezres nagyságrendben azonosíthatók a fehérjék, minek nyomán a tömegspektrometria a biomarker-kutatás egyik legfontosabb eszközévé vált [60]. A proteomanalízis nagy költség- és műszerigényét figyelembe véve 35 laboratórium együttműködésével indultak a plazma teljes fehérjekészletének feltárására irányuló kutatások a kétezres évek elején. A kezdeményezés nyomán létrejött Human Plasma Proteome Project adatbázisában jelenleg 3509 fehérje található, de ez a szám minden bizonnyal növekedni fog. A várakozások szerint a vérplazma fehérjei tízezres nagyságrendben lehetnek [61].

A plazmaproteomikának csak egyik nehézségét jelenti a rendkívüli komplexitás, az analízis során egy további különleges kihívást jelent az egyes fehérjék koncentrációi közötti hatalmas különbség. A plazma 60-80 mg/ml teljes fehérjekoncentrációjának túlnyomó részét a klasszikus plazmafehérjék és az immunglobulinok adják. A plazma legabundánsabb fehérjeje az albumin önmagában felelős a teljes fehérjekoncentrációnak több mint feléért, míg az immunglobulinok az összfehérje-mennyiségnek mintegy 40%-át adják [62]. Ezekkel a mennyiségekkel áll szemben pl. a gyulladásos és fertőzőes folyamatok indikátoraként mért IL-6 5 pg/ml alatti koncentrációja, így kijelenthető, hogy a klinikumban detektált fehérjék koncentrációja között akár tíz nagyságrendnyi különbség is lehet [63]. Az abundáns fehérjék nagy mennyisége a tömegspektrometria során gátolhatja az alacsony koncentrációjú proteinek azonosítását, ezért a mérések előtt a vérplazmát a klasszikus plazmafehérjékre és immunglobulinokra általában depletálják [64].

Habár a plazma teljes fehérjekoncentrációjának, illetve egyes fehérjecsaládok (pl. különböző Ig-k) mennyiségének meghatározása is diagnosztikai jelentőséggel rendelkezik. A vérplazma fehérjeinek klinikai vizsgálata leggyakrabban egy adott fehérjére szelektív módon történő mennyiségi meghatározását jelent [65]. A klinikailag fontos biomarkerek döntő többsége a koncentráció tekintetében alulreprezentált fehérjék köréből kerül ki, ami megnehezíti kvantitatív meghatározásukat. A klinikai biomarker-analízist tovább nehezíti, hogy a tömegspektrometriás kutatásokban bevett, abundáns fehérjék depletálására használt eljárások összetettek, költség- és időigényesek, így a rutin diagnosztikában nem alkalmazhatók. Ezen tényezők nyilvánvalóvá teszik, hogy a diagnosztikai mérésekkel szemben támasztott két fő követelménynek - úm. a magas szelektivitás és nagy érzékenység - komoly kihívás eleget tenni.

2.2. Az akut miokardiális infarktus biomarkerei

Az akut miokardiális infarktus (AMI) egyike a legelterjedtebb és legnagyobb mortalitási aránnyal rendelkező civilizációs betegségeknek, prognózisát pedig elsődlegesen meghatározza a lehető legkorábbi adekvát beavatkozás. A megfelelő terápiás protokoll pontos és gyors diagnosztikát feltételez, ami az AMI esetében nem triviális feladat, ugyanis klinikai megjelenési formája rendkívül változatos, függ a

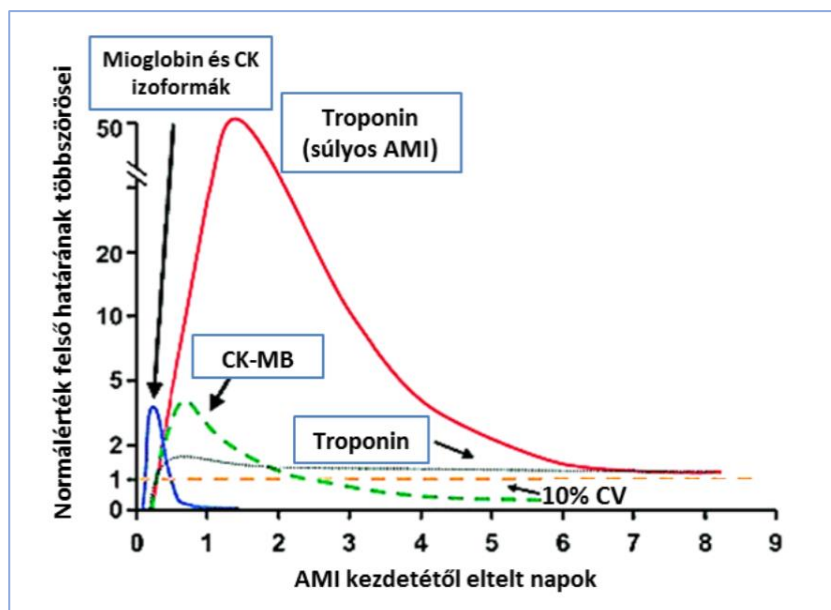
nekrotizált szívizomterület kiterjedésétől és lokalizációjától, a beteg korától és nemétől, valamint a komorbiditásoktól [66].

Az AMI egyértelmű diagnosztizálására több definíció is született, a legkorábbi a WHO által került jóváhagyásra 1979-ben. A meghatározás szerint a következő három feltétel közül - úm. i.) súlyos és tartós mellkasi fájdalom, ii.) jellegzetes EKG-elváltozások, iii.) vérben mérhető emelkedett enzimaktivitások - közül kettő teljesülése esetén AMI-ról beszélhetünk [67]. A protokoll több enzimaktivitás együttes meghatározását javasolta, így a mért enzimek között szerepeltek a kreatin-kinázok (CK), az enzim MB izoformákból álló komplexe, a laktát-dehidrogenáz (LDH), valamint az aszpartát-aminotranszferáz (ASAT). Az enzimaktivitások nyomon követése sok esetben döntő jelentőségű a diagnózis felállításához, ugyanis az AMI nem mindig jár együtt EKG-változásokkal, és ezekben a esetekben az enzimaktivitások méréséből származó eredmények elengedhetetlenek a diagnózis felállításához [68].

A WHO által javasolt enzimek döntő része napjainkra teljes mértékben kiszorult az AMI diagnosztikából. Az 50-es években szívizomnekrózis detektálására elsőként alkalmazott fehérje, az ASAT vérben történő megjelenése nem korlátozódik a kardiomiocita károsodásra, mivel az enzim a májban, a vesében, az agyban és a vázizomban is kifejeződik, így nem teljesíti a szövetspecifikus biomarkerekkel szemben támasztott kritériumokat [69]. Az AMI diagnosztikában későbbiekben alkalmazásra kerülő totál CK és LDH aktivitás mérések alkalmazhatóságát szintén az ASAT-nál látott széleskörű szöveti fehérjeexpresszió következtében fellépő alacsony specificitás korlátozza [70].

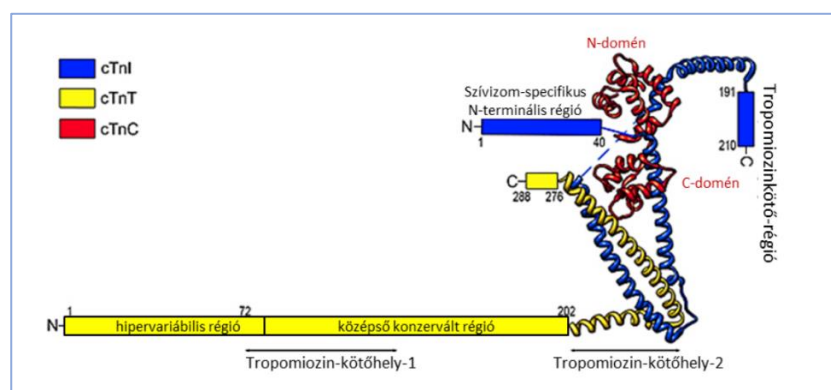
A CK fehérje alegységeinek izom (M) és agy (B) izoformája kódolt a humán genomban, és az enzim dimer formában nyeri el aktivitását. A két alegységvariánsból kialakuló dimerek közül a szívizomban legmagasabb arányban előforduló MB forma szelektív kimutatására alkalmas protokoll kidolgozása lehetővé tette a szívizomkárosodás enzimaktivitás-mérésen keresztül történő detektálását [71]. A CK-MB mennyiségi meghatározásához szükséges időt jelentősen lerövidítették, az eljárást pedig automatizálhatóvá tették a korábbi elektroforézisen alapuló módszert leváltó immunokémiai technikák, minek következtében a CK-MB kvantitatív meghatározása a múlt század 80-as éveiben az AMI diagnosztika sztenderd részévé vált [68]. Napjainkban azonban CK-MB meghatározása egyre kisebb jelentőséggel bír, ugyanis az AMI mellett számos más patológiás elváltozás és trauma is az enzimaktivitás plazmai emelkedésében nyilvánulhat meg, így mérése gyakran fals pozitív eredményekhez vezet [72]. A CK-MB mérése melletti érvként egyedül az szólhat, hogy az enzim a mioglobinhoz hasonlóan az AMI ún. korai markerei közé tartozik, ugyanis szintje az infarktus bekövetkezte után már 1-2 órán belül emelkedik a keringésben (3. ábra) [73].

Az AMI diagnosztikájában Hugo Katus felfedezése hozott forradalmi változásokat. Katus és kollégái a múlt század 80-as éveiben a szívizom miozin könnyű láncára generált poliklonális ellenanyagokkal a kardiomiocita specifikus troponin T izoformát (cTnT) is izolálták, majd a fehérjére ELISA-t (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) fejlesztettek [75]. Ezek az eredmények hosszabb távon az AMI-diagnózis újra definiálásához vezettek, amennyiben mind az Amerikai (ACC), mind az Európai (ESC) Kardiológiai Társaság a kardiális troponinokat jelölte meg a betegség meghatározandó biomarkereiként [76].



3. ábra Az AMI-biomarkerek mennyiségi változása az AMI kezdetétől számított idő függvényében [74].

A harántcsíkolt izom kontrakciójának szabályozásában szerepet játszó heterotrimer troponin komplex TnI, TnT és TnC alegységből épül fel. A komplex fehérjéi jól elhatárolható funkciókkal bírnak, miszerint a TnT a tropomiozinra horgonyozza a heterotrimert, a C alegység Ca^{2+} -kötő képességgel rendelkezik, míg az inhibitor alegység, a TnI Ca^{2+} hiányában az aktinhoz kapcsolódva gátolja az aktomiozin ATP-áz funkcióját. A szarkoplazmából kiszabaduló Ca^{2+} a TnC-hez kötődik, melynek C-terminális doménje így a TnI-hez kapcsolódik, és ez az átrendeződés végső soron izomösszehúzódáshoz vezet (4. ábra) [77].

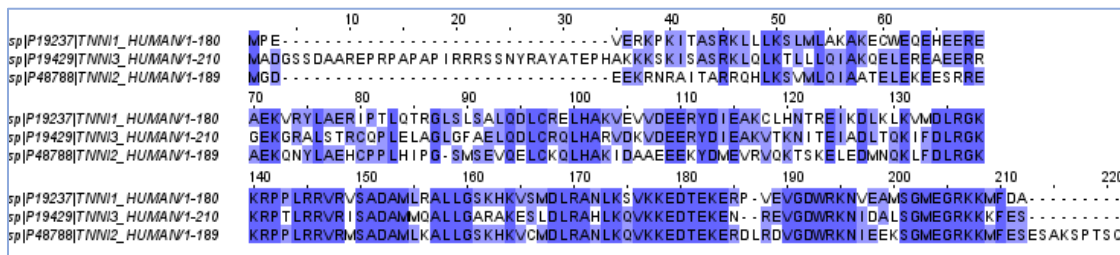


4. ábra A TnC, TnI és TnT fehérjékből felépülő kardiális troponin komplex szerkezete [74].

A heterotrimer mindhárom alegysége izomtípusra jellemző izoformákkal rendelkezik. A TnI és TnT 3-3 izoformáját a lassú és gyors vázizomra, illetve a szívizomra specifikus gének kódolják. Ezzel szemben TnC-nek csak két izoformája ismert, ugyanis a felnőtt szívizomban és lassú vázizomban azonos izoformák találhatók [78]. Mindezek figyelembevételével a szívizomnekrózis detektálására a troponin komplex TnT és TnI alegységei alkalmasak.

Napjaink általánosan elfogadott szívmarkerekeinek, a troponin I és T fehérjéknek a meghatározása egyformán elterjedt, diagnosztikai és prognosztikus értéküket tekintve nincs szignifikáns különbség közöttük. A cTnI és cTnT AMI diagnosztikában való alkalmazhatóságára irányuló vizsgálatok eltérő érzékenységet és specificitását mutattak, de igazolódott, hogy ezen eredmények hátterében az alkalmazott analitikai módszerek és mintakezelési eljárások különbségei álltak [79]. Mindkét troponin plazmai koncentrációja az AMI bekövetkezése után 3-6 órával indul jelentős növekedésnek, és több napig emelt szinten marad. Mivel vérben mérhető koncentrációjuk jól korrelál a szívizomnekrózis kiterjedtségével, mennyiségi meghatározásuk lehetővé teszi a károsodás mértékének megítélését, a betegség lefolyásának monitorozását, az esetleges újbóli infarktusz detektálását, valamint a terápia eredményességének követését is [80]. Egy, az utóbbi időkben megjelent vizsgálat szerint a cTnI az AMI diagnosztikában a cTnT-nél specifikusabb markernek tekinthető, ugyanis ez utóbbi fehérje a szívizom kívül a regenerálódó vázizmokban is kifejeződik, így a neuromuszkuláris betegekben a normál cTnI érték emelkedett cTnT szinttel párosulhat [81]. Megjegyzendő, hogy nagyfokú specificitásuk ellenére, a kardiális troponinok az AMI mellett egyéb kórképekben (pl. szívelégtelenség, veseelégtelenség, gyulladás, tüdőembólia stb.) is emelt szinten lehetnek jelen a keringésben, így egyedüli paraméterként nem alkalmasak az AMI azonosítására [82].

A troponin I izoformái a 21-24 kDa mérettartományba eső, erősen bázikus fehérjék ($pI > 9,5$), és habár magas aminosavszekvencia-homológiát mutatnak egymással, a cTnI N-terminálisán egy specifikus, 30 aminosavból álló peptidmotívum helyezkedik el (5. ábra). A cTnI szelektív kimutatását a vázizomra jellemző troponin I-kel való nagyfokú hasonlóság mellett további tényezők is nehezítik. A mérések alapján 4-12 mg/g cTnI található a szívizomban, és a fehérjének több mint 90%-a az aktin-miozin komplexhez kötött, így az AMI korai fázisában, amikor csak a szabad forma kerül keringésbe alacsony, ng/ml-nél kisebb fehérjekoncentrációkat detektálni képes módszerek szükségeltetnek a kardiomiocita nekrosis kimutatásához [83]. A plazmában a cTnI monomer mellett cTnI-cTnT és TnT-cTnI-cTnT komplexek formájában is megjelenik, így az ideális diagnosztikai rendszertől mindhárom forma felismerése elvárható [84]. A cTnI alacsony vérplazmai koncentrációjából fakadó problémát tovább súlyosbítja a rendkívül gyors proteolitikus degradáció, melynek során a fehérje N- és C-terminális vége egyaránt lehasad [85]. Mindezek mellett a cTnI-en bekövetkező poszttranszlációs módosulások is hozzájárulnak a szelektív kimutatást akadályozó tényezőkhöz. A polipeptid láncban 12 szerin, 8 treonin és 3 tirozin található, és a prediktált 18 foszforilációs hely többsége a kísérleti eredmények alapján valóban foszforilálódik is. Többek között igazolták, hogy az N-terminálison elhelyezkedő protein kináz A (PKA) szubsztrátfelismerő helyén (RRRSS) a Ser23 és Ser24 aminosavak egyaránt foszforilálódnak, és a módosítás a szívizom diasztolés funkciójának fokozásához vezet. Ugyanezen aminosavakat az *in vitro* kísérletek eredményei alapján a protein kináz C és D család tagjai (PKC- β , PKC- ϵ , PKD) is foszforilálhatják [86]. A diagnosztika során azt is szem előtt kell tartani, hogy cTnI magas pI értékének következtében a heparinnal kölcsönhat, így a heparinos plazmában mért értékek a valósnál alacsonyabbnak adódhatnak [87].



5. ábra A troponin I izoformák aminosav-szekvencia homológiája.

Lassú vázizom (TNNI), szívizom (TNNI3) és gyors vázizom (TNNI2) troponin I izoforma.

2.3. Ellenanyagok diagnosztikai alkalmazása

Amint ezt korábban jeleztem, az ideális fehérje biomarkereken alapuló diagnosztika két fő kritériuma a magas fokú szenzitivitás és specificitás. Ezen elvárásoknak az enzimaktivitással rendelkező biomarkerek esetén legegyszerűbben az egyes aktivitások mérésével lehet megfelelni, és ez a megközelítés már évtizedekkel az aktivitásokért felelős fehérjék azonosítása előtt a diagnosztika részét képezte. A múlt század első felében a vérszérum savas, illetve alkalikus foszfatáz aktivitásának mérése a prosztatatumor, illetve különböző csontbetegségek diagnózisának felállításában kapott szerepet [88]. Az aminosztransferázok mérésének jelentőségét elsőként egy 1954-ben megjelent közlemény igazolta, amelyben a szerzők bemutatták az akut miokardiális infarktusz és az emelkedett aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) aktivitás közti kapcsolatot [89]. Az enzimaktivitáson alapuló mérések nagy előnye, hogy nem szükséges a vérplazma frakcionálása és az azonosítandó fehérje izolálása, mert a megfelelő szubsztrátok és reakciókörülmények megválasztásával közvetlenül a mintából meghatározható az analit mennyisége. Az enzimaktivitás-mérésen alapuló fehérjemeghatározások viszonylag egyszerű és olcsó kivitelezhetősége eredményezte az első számítógép-vezérelt, nagy áteresztőképességű diagnosztikai berendezést [90]. Habár a májfunkció vizsgálatára továbbra is az aminosztransferáz aktivitás mérése a legáltalánosabban alkalmazott módszer, az enzimaktivitás-mérésen alapuló diagnosztika jelentősége hanyatlóban van. A népszerűség vesztesége oka alapvetően két tényezőre vezethető vissza: egyrészt a vizsgált enzimek nem szövetspecifikusak, illetve az egyes szövetekre jellemző izoformák a mérés előtt elválasztandók, másrészt a módszer alkalmazhatóságát erősen korlátozza, hogy legtöbb biomarker egész egyszerűen nem rendelkezik enzimaktivitással.

Az enzimaktivitással nem rendelkező biomarkerek kimutatása a mérendő molekulát nagy szelektivitással és affinitással kötő receptorok segítségével valósítható meg. A diabéteszkutatások során az ellenanyagokban ismerték fel azokat a „receptorokat”, amelyek a vázolt elvárásoknak megfelelhetnek. Solomon A. Berson és Rosalyn Yallow megfigyelték, hogy a hónapok óta inzulinkezelés alatt álló betegek véréből lassabban ürül ki az inzulin, így hosszabb ideig van emelt szinten, mint azoknak a pácienseknek a vérében, akik első alkalommal kapják meg a hormonkezelést. Elméletüket – mely szerint a sertésből származó inzulin hatására megjelenő szelektív ellenanyagok retardálják a hormon ürülését – a kezelt betegek vérében kimutatott

inzulinszelektív antitestekkel igazolták [91]. A kutatópáros felismerve az azonosított ellenanyagokban rejlő lehetőséget kifejlesztette a diagnosztikai immunkémiát megalapozó eljárást, a RIA-t (Radioimmunoassay) [92]. A módszerfejlesztés során a vérben található inzulin méréséhez tengerimalacokban állítottak elő inzulinszelektív ellenanyagot, melyet a páciensből származó vérmintával és radioaktív jóddal jelölt inzulinnal keverték össze, majd az ellenanyagkötött és szabad inzulint papírkromatográfiával elválasztották. A kötött, illetve szabad formában lévő radioaktív inzulin arányának szcintillográfiás meghatározásával mérhetővé tették az endogén inzulin koncentrációját. A közlemény megjelenését követően az immunkémián alapuló diagnosztika robbanásszerű fejlődésnek indult, melyhez a két kutató forradalmi felfedezése mellett az is hozzájárult, hogy eljárásukat a betegek szolgálatába kívánták állítani, ezért nem szabadalmaztatták.

A magzat fejlődési rendellenességeinek azonosítására, illetve újabban a hepatocelluláris karcinóma diagnosztikára alkalmazott α -fetoprotein mérésére kidolgozott eljárás több szempontból is meghatározta a fehérjediagnosztika további fejlődését [93] [94]. Egyrészt az α -fetoprotein detektálása során két analitra szelektív ellenanyag került alkalmazásra, az egyik a polisztirol felületen rögzítve a fehérjemintából történő befogását szolgálta, míg a másik funkciója a befogott α -fetoprotein detektálása volt [95]. Ez az elrendezés szendvics elnevezéssel vált ismertté a szakirodalomban. A kutatók emellett egy a megelőző évben leírt újítást, az ELISA-t alkalmazták az analit koncentrációjának meghatározására, miszerint a detektálásra használt antitestet alkalikus foszfatázzal konjugálták, így módon enzimaktivitás mérésén keresztül határozhatták meg a mintában jelenlévő α -fetoprotein mennyiségét [96]. Ezek a fejlesztések tulajdonképpen megalapozták az immunkémiai diagnosztika azóta is legáltalánosabban használt módszerét, az ún. szendvics ELISA-t. A szendvics ELISA legfontosabb előnyei, hogy nincs szükség a radioaktívan jelölt analitra mivel a kérdéses fehérje koncentrációjának meghatározása nem kompetitív módon történik, illetve a módszer általánoságban sem igényel radioaktivitást, ezzel a mérések kivitelezése nagymértékben egyszerűsödik. Mindemellett a két analitra szelektív antitest együttes alkalmazása szignifikánsan növeli az eljárás specificitását.

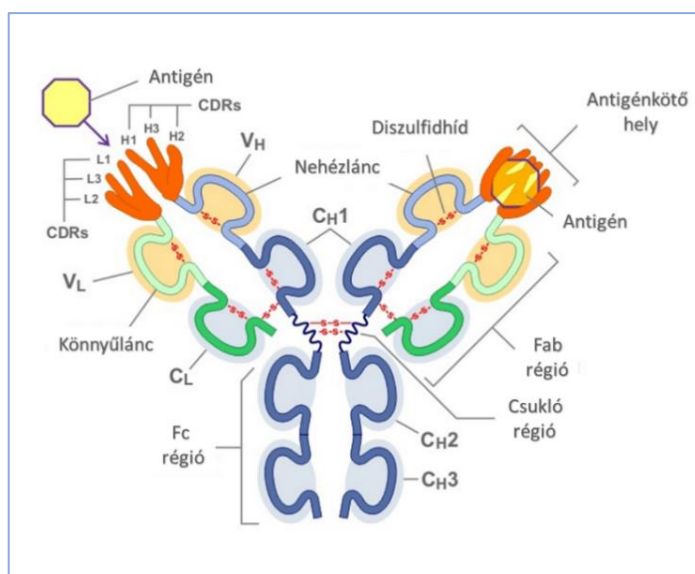
A RIA-val és a szendvics ELISA-val kapcsolatos fejlesztések – habár számos közülük rutinszerűen alkalmazott az immunkémián alapuló diagnosztikában – részletes leírása messze túlnyúlna a dolgozat keretein, ezért itt csak a nagy áteresztőképességű biomarker diagnosztikában egyik legelterjedtebb ELISA változat, az ún. elektrokemilumineszcencia immunvizsgálat (ECLIA) kerül rövid ismertetésre. Az eljárás során a két ellenanyag közül az analit befogásáért felelőset az elektród felületére vagy mágneses gyöngyre kapcsolják, a másik pedig a befogott molekula detektálását szolgálja. Az ECLIA esetében a kimutatás az enzimaktivitás mérése helyett elektrokemilumineszcencia segítségével történik. Ennek megfelelően a második ellenanyagot egy gerjeszthető molekulával, általában trisz-(bipiridin)-ruténium kelát komplexszel konjugálják. A mérő elegy tripropil-amint (TPA) is tartalmaz, és az elektród feszültség alá helyezésével ruténium komplex és a TPA között beinduló redox ciklus a ruténium fényemissziójával jár együtt, és ez a jel fotoelektron-sokszorozóval mérhetővé válik [97]. A klinikailag validált, kereskedelmi forgalomban elérhető ECLIA tesztek kimutatási határa

a pg/ml tartományt is elérheti, mintegy öt nagyságrendnyi analit-koncentráció tartományban adhatnak lineáris jelet, a mérések kivitelezése pedig 10-20 percet vesz igénybe [98].

A korai immunkémia eljárások kizárólag poliklonális antitesteket használtak, és habár ezek bizonyos kutatási technikáknál (immunprecipitáció, kromatin-immunprecipitáció, western blot) továbbra is megkerülhetetlenek maradtak, a diagnosztikai és terápiás eljárások során szigorúan megkövetelt folyamatos és azonos minőségű elérhetőségük megvalósíthatatlansága miatt ezekről az alkalmazási területekről gyakorlatilag teljesen kiszorultak, és helyüket a monoklonális ellenanyagok vették át [99].

A monoklonális ellenanyagok termelése a Georges J.F. Köhler és César Milstein által kidolgozott hibridóma technikával vált lehetségessé [100]. Kutatásaik során birka vörösvértesttel immunizált egerek lépéből izolált B-sejteket fuzionáltattak mielómasejtekkel, majd a sejteket hipoxantin, aminopterin, timidin (HAT) tartalmú táptoldatban növesztették. Az immortális mielóma sejtekben hibásan működik a timidinkináz és a purinnukleotid-szintézis mentőútvonala, a B sejtek 1-2 hét alatt elpusztulnak, így a tetrahidrofolát-reduktáz inhibitorot tartalmazó HAT médiumban csak a két sejtípus fúziójából létrejött ún. hibridóma sejtek élnek túl. A folyamat utolsó lépéseként a hibridóma sejtekből egyedi klónokat létrehozva azonosíthatók az antigént legnagyobb affinitással kötő IgG-t termelő sejtvonalak. A módszer elméleti lehetőséget teremtett az állandó minőségű ellenanyagok korlátlan idejű és mennyiségű előállítására, így óriási lökést adott az antitestek diagnosztikai és terápiás célú alkalmazásának, minek eredményeként a klinikumban alkalmazott monoklonális ellenanyagok száma már jelenleg is több százra tehető [101] [102]. Figyelembe véve a ténytet, hogy az antitesteken alapuló módszerek fejlesztése a diagnosztika, míg az ellenanyagokat használó célzott tumorterápia a gyógyszerkutatások legintenzívebben tanulmányozott területei közé tartoznak, a gyógyászatban alkalmazott ellenanyagok számának további növekedése prognosztizálható.

Habár az orvostudományokban betöltött szerepüket és jelentőségüket nem lehet túlbecsülni, az ellenanyagok alkalmazásának van néhány korlátozó tényezője. Ezek a hátulütők részben az IgG felépítésére, részben pedig az előállításuk módjára vezethetők vissza. Az IgG általános szerkezetéről elmondható, hogy két-két nehéz és könnyű láncból épül fel, melyeket diszulfidhid kötések tartanak össze. A négy alegységből összeálló 150 kDa-os molekula szintézisét követően glikozilációs érési folyamaton megy keresztül. A tetramert alkotó fehérjeláncokat további doménekre osztva beszélhetünk a nehéz lánc 3 konstans (CH) és 1 variábilis régiójáról (VH), míg a könnyű lánc esetében 1-1 konstans (CL) és variábilis (VL) domén azonosítható. Az antigén kötésében a variábilis domének N-terminális végén található komplementaritás meghatározó régiók (CDR) ún. paratóp része játszik közvetlen szerepet (6. ábra).



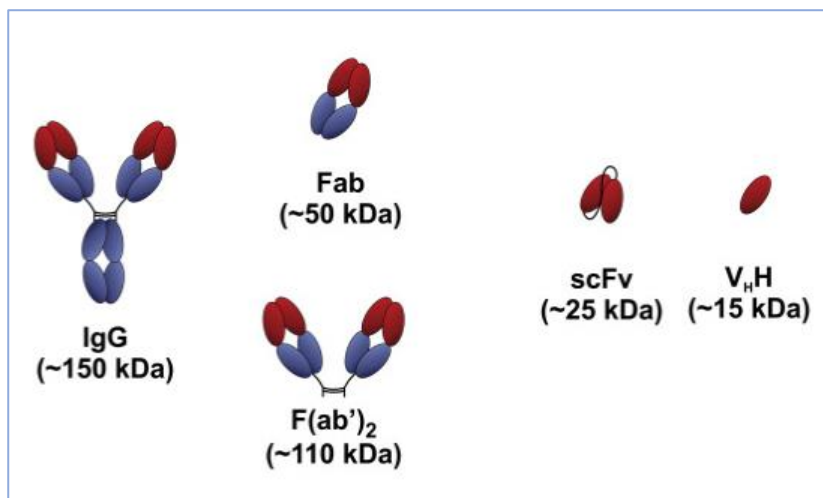
6. ábra Az IgG molekula vázlatos szerkezete.

Az IgG nagy mérete és komplex szerkezete más-más tekintetben, de egyaránt limitálja alkalmazhatóságát. A diagnosztikában az egyre nagyobb tért nyerő, képalkotó eljárások során, illetve mikrofluidikával és nanorészecskékkel operáló rendszerekben az IgG 14.5 nm × 8.5 nm × 4.0 nm-es mérete akadályozza a szöveti penetrációt, illetve a megfelelő felületi borítottság elérését [103]. Az antitest funkcionalitásához elengedhetetlen a fehérje szerkezeti integritásának megőrzése, mely követelménynek az IgG emelt hőmérsékleten, fiziológiástól eltérő pH értékeken, sókoncentrációknál és redox körülmények között, valamint szerves oldószerekben nem tud eleget tenni [104]. Az IgG instabilitása különösen hangsúlyos problémaként jelentkezik a szerves oldószerekben kivitelezendő kismolekula-mérések, illetve az egyre inkább elterjedő, helyben, betegágy melletti (bedsite, Poin-Of-Care, PCC) kémiai diagnosztikai vizsgálatok során. Ezek a tényezők drasztikusan megnövelik az ellenanyagokon alapuló tesztek, előállítási, tárolási és szállítási költségeit, illetve csökkentik szavatossági idejüket. Terápiás szempontból az ellenanyagok nagy mérete a már említett alacsony szöveti penetrációs hatékonyság miatt nehezíti alkalmazásukat, illetve további fontos nehézség a kezelés során használt ellenanyag hatására kialakuló immunválasz kiküszöbölése [105].

Jóllehet a hibridóma technológia megteremtette a korlátlan mennyiségű és azonos minőségű monoklonális antitest előállításának elvi alapjait, és az eljárás az elmúlt évtizedek alatt hatalmas fejlődésen ment keresztül, az ellenanyag termelése továbbra is rendkívül összetett és magas költségekkel járó feladat. Az emlőssejtekben történő ellenanyagtermelés egyszerűsítésére, és így érdemi költségcsökkentésre jelenleg nincs további lehetőség, minek következtében a diagnosztikai, és még inkább a célzott terápiás eljárások kiterjedt alkalmazásának egyik korlátozó tényezője a szükséges antitestek elérhetősége [106]. A teljesség kedvéért megjegyzendő, hogy habár az ellenanyagokon alapuló tumorterápiák átlagos évi költségének (150 000 USD) tetemes része a fejlesztési és engedélyeztetési eljárásokat fedezi, a teljes bekerülési összeg mintegy 1%-át kitevő antitest-előállítási költség önmagában is sokszorosa a kémiai szintézissel előállítható, kismolekulákat tartalmazó gyógyszerek árának [107].

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A terápiás szempontból fontos, immunválaszt nem indukáló immunglobulin-variánsok, ún. kiméra, humanizált, illetve humán antitestek részletei a jelzett közleményben található, a továbbiakban csak a diagnosztikai vonatkozású ellenanyagmódosítások kerülnek bemutatásra [108]. Az ellenanyagok méretéből és komplex szerkezetéből fakadó problémák kiküszöbölésére változatos megoldások állnak rendelkezésre, melyek közös pontja azon az elgondoláson alapul, hogy az antigén-antitest kapcsolat kialakításáért az antigénkötő hely az ún. paratóp felelős, így az ellenanyag célmolekula kötéséhez e régió integritását megőrizni. Az ellenanyag-fragmentumok előállítása hagyományos módon pepszin, illetve papain kezeléssel történik, melyek következtében a nehéz láncból származó Fc (fragment crystallizable) régió mellett egy $F(ab')_2$, illetve a pFc' mellett két Fab keletkezik (7. ábra) [109].



7. ábra A proteáz kezeléssel létrehozott, illetve rekombináns antitest-fragmentumok vázlatos szerkezete.

A kék szín az ellenanyagok konstans, míg a piros a variábilis régióját jelöli.

Az első Fab-on alapuló gyógyszert digoxin mérgezés kezelésére alkalmazták 1976-ban, és a különböző papain kezeléssel gyártott Fab készítmények jelenleg is alkalmazott antidótumok opioid származék, paracetamol és szívglikozid intoxikáció esetén [110]. A Fab fragmentek korai diagnosztikai alkalmazását a tumorok képalkotó eljárásokkal történő azonosításánál láthatjuk, így például a metasztatizáló melanoma tumorsejteket radioaktív jóddal jelölt antigén p97 nevű melanoma-biomarker-szelektív antitestből származó Fab segítségével detektálták [111].

Az ellenanyagkutatásban újabb áttörést hozó rekombináns ellenanyagok irányított evolúcióját lehetővé tevő metodikák fontosságát jól jelzi, hogy a Nobel-díj bizottság a 2018-as kémiai díj felét megosztva a peptid és ellenanyag phage-display kidolgozásáért felelős George P. Smith és Gregory P. Winter kutatópárosnak ítélte [112]. A rekombináns ellenanyagok megjelenésének jelentősége több tényezőre vezethető vissza: i.) szelekciójuk általában nem igényel immunizálást, minek következtében a hagyományos megközelítésnél gyorsabban izolálhatók, ii.) az ellenanyagok kódoló szekvenciái teljes mélységükben ismertek, így reprodukálhatóan előállíthatók, valamint aminosav-szekvenciájuk tervezhetően módosítható iii.) az ellenanyag-fragmentek enzimkezelés

nélkül közvetlenül előállíthatók, és iv.) előállításuk nem igényel hibridóma sejteket, bizonyos esetekben akár prokarióta sejtekkel is termeltethetők.

A rekombináns ellenanyagok szerkezete nem egyezik meg a fiziológiás, tetramer IgG-nél megfigyelhetővel, annak csak bizonyos részleteit tartalmazzák. A leggyakrabban előállított rekombináns antitestek a fentebb ismerttet Fab mellett, a nehéz és könnyű lánc peptid szakasszal összekapcsolt variábilis régióit (single-chain variable fragments, scFv), illetve az egyetlen nehéz lánc láncból származó variábilis domént tartalmazó ún. nanotestek (V_HH) (7. ábra) [113]. Az ellenanyag méretének csökkentése a fentebb taglalt terápiás és diagnosztika előnyök mellett, egy további pozitív hozadékkal is jár. Nevezetesen a nanotestek olyan konkáv epitópokat is képesek felismerni, amelyek az intakt IgG molekulák számára elérhetetlenek [113]. A nanotestek kiterjedt használata kedvező tulajdonságaik ellenére is váratott magára, ugyanis affinitásuk és vízdékonyságuk gyakran alacsony. Az egyetlen doménből álló antitestek alkalmazásának a tevéfélék családjában és a porcos halak osztályában felfedezett csupán nehéz láncból álló ellenanyagok adtak újabb lendületet. Az ezekből az ellenanyagokból származó nanotestek az egyéb élőlények antitestjeivel összevetve nagyobb CDR hurokkal rendelkeznek, így jól kötődnek a mélyen ülő epitópokhoz, emellett affinitásuk és vízdékonyságuk az IgG molekuláéval összevethető, valamint hőstabilak és detergensnek is ellenállnak [114]. A rekombináns ellenanyagok egyértelmű térhódítását jelzi, hogy mára több mint 80 került klinikai fázisba, és 10 már a kereskedelmi forgalomban is megjelent [115]. A nanotestek elterjedését mintegy 30 évig nagymértékben az azóta rendeződött szabadalmi jogok körüli nehézségek akadályozták, így joggal feltételezhető, hogy a 2019-ben a von Willebrand faktorra szelektív, trombotikus trombocitopéniás purpura kezelésre jóváhagyott nanotestet hamarosan továbbiak követik a klinikumban [116].

A rekombináns ellenanyagok terápiás szempontból kedvező tulajdonságai, úm. a konkáv epitópok felismerése, a kis méret és a viszonylag nagy stabilitás mellett egy további, a diagnosztikai alkalmazás tekintetében fontos sajátságuk az orientálható immobilizálhatóságuk. A rejtett epitópokat detektálni képes, egyetlen doménből álló rekombináns ellenanyagok a patogének azonosítása során jelentenek különösen nagy segítséget, ugyanis a vírusok az immunrendszer általi felismerést gyakran úgy kerülik ki, hogy a felületükön olyan, a sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódni képes árkokat hoznak létre (ún. kriptikus epitóp), amelyek az intakt antitestek számára elérhetetlenek. A megfigyeléssel összhangban több tucat vírus szelektív scFv-n, illetve nanotesten alapuló vírustetektálást leíró közlemény található a tudományos szakirodalomban [117].

Diagnosztikai alkalmazásukat megelőzően az antitesteknek valamilyen módosításon vagy immobilizáción kell átesniük. Az egyszerűbben kivitelezhető immobilizációs eljárások csak nagy vonalakban irányíthatók, ezért az ellenanyag epitópkötő képességének csökkenését, vagy akár teljes elvesztését is eredményezhetik. A jobb orientáltságot biztosító metodikák alkalmazása hosszas optimalizálást igényel, és általában még így is az ellenanyagok részleges funkcióvesztéséhez vezet [118]. A hagyományosakkal szemben, a rekombináns ellenanyagok aminosavszekvenciája tetszés szerint módosítható, így a tervezett kötési reakció szem előtt tartásával a fehérje N- vagy C-terminálisára olyan peptidmotívumok illeszthetők, amelyek lehetővé teszik az

antitest kontrollálható kikapcsolását [119]. Az scFv-ek és a nanotestek robusztussága és irányítható kapcsolása alapvető jelentőséggel bír a fehérjék multiplex vizsgálatának szempontjából. Az eddig ismert legtöbb fehérje szimultán mérésére alkalmas antitest microarray-t His₆ jelölt scFv ellenanyagok felhasználásával hozták létre [120].

2.4. A cTnI diagnosztikája

A kardiomiocita eredetű troponinok szelektív kimutatására alkalmas eljárások közül elsőként a cTnI-re kifejlesztett került nyilvánosságra. A közlemény az AMI diagnosztikában azonban nem hozott paradigmaváltást, ugyanis a kidolgozott RIA átfutási ideje két napnak, míg a mérés kimutatási határa 10 ng/ml-nek adódott, mely paraméterek az ideális diagnosztikai protokollal szemben támasztott követelményektől meglehetősen távol állnak [121]. Az áttörést a korábban már említett, Katus és munkatársai által leírt, cTnT kimutatására alkalmas szendvics ELISA megjelenése eredményezte [75]. Ez az újabb módszer minden szempontból felülmúlta a cTnI meghatározására kifejlesztettet, a kimutatási határa egy nagyságrenddel alacsonyabb, és a protokoll automatizálásával a mérés átfordulási ideje másfél órára redukálódott. Az eljárás a kardiális troponinok mennyiségi meghatározásának tulajdonképpen prototípusa lett, és a diagnosztikai laboratóriumokban túlnyomórészt jelenleg is szendvics ELISA eljárással mérik troponinokat. A kardiális troponinokon alapuló diagnosztika egyik további fontos előrelépése volt, hogy a hagyományos, két antitestes szendvics ELISA-k mellett megjelentek a három vagy akár négy különböző monoklonális antitesttel működő immunkémiai eljárások is [122]. Több, a fehérje különböző epitópjait felismerő antitest alkalmazásával csökkenthetők a fehérje degradációjából, illetve poszttranszlációs módosításaiból származó, fentebb taglalt mérési pontatlanságok, és egyúttal a kimutatás érzékenysége is növelhető.

A cTnI koncentrációját meghatározó eljárások legtöbbször – csakúgy, mint a fehérje biomarkert detektáló diagnosztikai módszerek döntő részénél – a befogó antitestet egy adott szilárd felülethez rögzítik, míg a második, detektálásra használt ellenanyagot a korábban ismertetett ECLIA vagy kemilumineszcencia (chemiluminescent immunoassay, CLIA) alapú mérésekre alkalmas enzimekkel, festékekkel, illetve ruténiummal vagy európiummal módosítják (1. táblázat) [123]. Jóllehet a heterogén ECLIA és CLIA alapú eljárások a legelterjedtebbek a diagnosztikában, a cTnI kimutatására kereskedelmi forgalomban elérhető homogén rendszert is kifejlesztettek. A Siemens Diagnostics készülékei között található Dimension az eredmények fejezetben részletesebb leírásra kerülő luminescent oxygen channeling immunoassay (LOCI) vagy más néven amplified luminescent proximity homogenous assay (ALPHA) technika elvén működik. A LOCI létjogosultságát az igazolja, hogy a heterogén rendszerekkel szemben, nem igényel mosási lépéseket, a mérés egy lépésben kivitelezhető, így a minta feldolgozás és értékelés néhány perc alatt elkészülhet [124].

| Kereskedelmi forgalomban elérhető rendszerek | LOD (ng/l) | 99. percentilis (ng/l) | % CV a 99. %-nél | Antitestek által felismert epitópok | Jelölés a detektáló antitesten |
|--|------------|------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Abott Architect | - | 28 | 14 | C: 87-91, 24-40 D: 41-49 | akridinium |
| Abott Architect STAT hs-cTnI | 1,1-1,9 | 26,2 | 4,0 | C: 24-40 D: 41-49 | akridinium |
| Abott i-STAT | 20 | 80 | 16,5 | C: 41-49, 88-91 D: 28-39, 62-78 | ALP |
| Alere Triage Cardio 3 | 10 | 22 | 17,0 | C: 27-39 D: 83-93, 190-196 | fluoroför |
| Beckman Coulter Access Accu | - | 40 | 14 | C: 41-49 D: 24-40 | ALP |
| bioMerieux Vidas Ultra | <10 | 10 | 27,7 | C: 41-49, 22-29, D: 81-89, | ALP |
| Mitsubishi PATHFAST cTnI | 1 | 20 | 5,2 | C: 41-49, D: 71-116, 163-209 | ALP |
| Mitsubishi PATHFAST cTnI-II | 8 | 29 | 5,0 | C: 41-49, D: 71-116, 163-209 | ALP |
| Ortho VITROS Troponin I ES | 12 | 34 | 10,0 | C: 24-40, 41-49 D: 87-91 | HRP |
| Radiometer AQT90 FLEX TnI | 9,5 | 23 | 12,3 | C: 41-49, 190-196 D: 137-149 | eurórium |
| Roche cTnI | 160 | 160 | - | C: 87-91, 190-196 D: 23-29, 27-43 | ruténium |
| Siemens ADVIA Centaur TnI-Ultra | - | 40 | 8,8 | C: 41-49, 87-91 D: 27-40 | akridinium |
| Siemens Dimension VISTA | - | 45 | 10,0 | C: 27-32 D: 41-56 | kemilumineszcens |
| Siemens Stratus CCS cTnI | - | 70 | 10,0 | C: 27-32 D: 41-56 | ALP |

1. táblázat A cTnI automatizált meghatározására használt rendszerek analitikai jellemzői [74]. (C a befogó, D a detektáló antitest.)

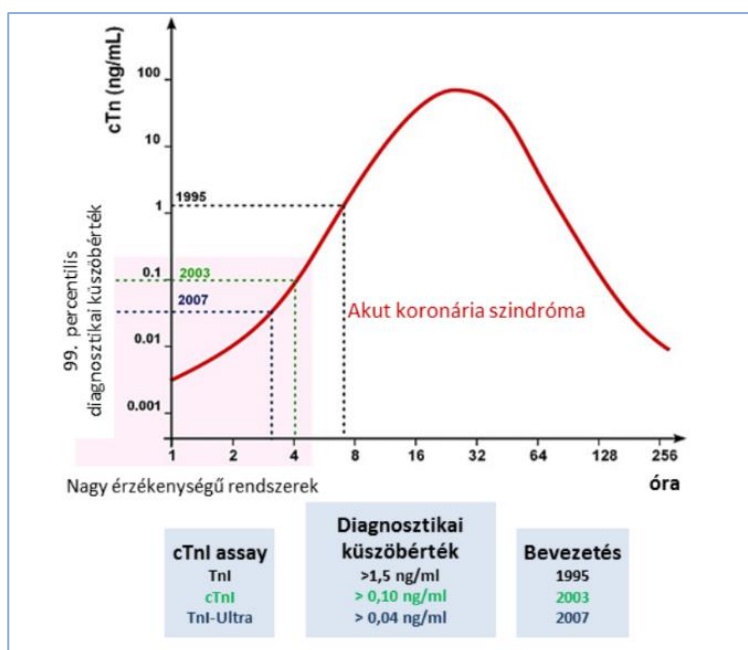
A cTnT meghatározása szabadalmi okokból kifolyólag kizárólag egyetlen gyártó, a Roche készülékeivel kivitelezhető. A termékek monopolizációja általánosságban nem kedvez a fejlesztéseknek, és aránytalan piaci pozíciót biztosít a gyártónak, azonban ebben az esetben azzal a kétségtelen előnnyel is együtt jár, hogy az eljárás jól standardizált, így a különböző mérési helyeken kapott eredmények teljes mértékben kompatibilisek egymással. Szemben a cTnT-ével a cTnI diagnosztikájára számos gyártó, különböző ellenanyagok felhasználásával, eltérő immunkémiai megközelítéssel fejlesztett műszert, melynek eredményeként az egyes laboratóriumi mérések gyakran nem összevethetők (1. táblázat) [74]. Mindezek következtében a troponin I diagnosztika területén jelenleg az egyik legnagyobb kihívást az eltérő tesztekkel kapott eredmények összehangolása/összehasonlíthatósága jelenti. A kérdés súlyosságát jól jelzi, hogy a közlemények szerint az egyes gyártók által forgalmazott cTnI tesztek mérési eredményei között akár hússzoros eltérések is lehetnek [125]. A jelenség hátterében az eltérő mintaelőkészítési eljárások és mérési metodikák mellett legfőbb tényezőként a különböző epitópokra szelektív antitestek alkalmazása áll. A fentiekben láthattuk, hogy a cTnI

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

terminális végei rendkívül gyorsan lehasadtnak, a fehérje számos poszttranszlációs módosításnak van kitéve, és többféle komplex formájában is jelen van a keringésben. Mivel az egyes epitópokat eltérő módon érintik mindezen módosulások, a különböző antitesteket alkalmazó tesztekkel végzett mérések esetében elméletileg sem várhatók azonos cTnI értékek.

Az első cTnI mérésre alkalmas közlemény megjelenését követő húsz évben a fehérjediagnosztika szinte hihetetlen fejlődésen ment keresztül minden tekintetben. A radioaktív jelölés szükségtelenné válásával és a protokollok egyszerűsödésével párhuzamosan a mérések érzékenysége több mint három nagyságrenddel növekedett [126]. A legelső cTnI tesztek kimutatási határa a ng/ml-es tartományba esett, így a troponinszint emelkedésének detektálását legkorábban a mellkasi fájdalom megjelenése után általában 3-6 órával tették lehetővé. Ezzel szemben az új generációs, ún. nagy érzékenységű (high-sensitivity, hs) cTnI tesztek ng/l-es fehérje koncentrációk mérésére is alkalmasak, vagyis az egészséges referenciapopuláció 99 percentilisében is használhatók (8. ábra), ami a troponinszint-emelkedés kimutatását már akár a mellkasi tünetek kezdetét követő 1-3 órán belül lehetővé teszi [123]. Megjegyzendő, hogy ezeknél a koncentrációtartományoknál számos gyártó terméke nem éri el a 10% alatti variációs koefficiens (CV), ezért nem alkalmasak az AMI korai diagnózisára (1. táblázat) [127].

A diagnosztika egyik legforróbb területe a betegágy melletti, ellátási helyen használható (POC), akár komplex laboratóriumi vizsgálatokra alkalmas eszközök fejlesztése. A POC diagnosztika előnyei, ún. alacsony mintaigény, gyors és egyszerű kivitelezhetőség, valamint a viszonylagosan alacsony költség, mind-mind olyan tényezők, amelyek kiemelt jelentőséggel bírnak az akut betegellátásban. A POC biomarker diagnosztika szélesebb körű elterjedésének egyik legfőbb akadályja, hogy ezek a tesztek hagyományosan alacsonyabb érzékenységűek és kevésbé pontosak, mint a központi laboratóriumokban használatosak [128].



8. ábra A cTnI diagnosztika kimutatási határának változása [74].

Az utóbbi évtizedben a nyilvánvaló igény és az intenzív kutatások eredményeként olyan POC készülékek kerültek a forgalomba, amelyek a kedvező tulajdonságok megtartása mellett a nagy berendezéseket igénylő mérésekhez hasonló érzékenységgel és pontossággal rendelkeznek [129]. Ezek a fejlesztések a cTnI diagnosztikára is hatással vannak. A Quidel által forgalmazott TriageTrue High Sensitivity Troponin I teszt, egy olyan fluoreszcens jelölésen alapuló immunokémiai eljárás, amely 0,15 ml EDTA-s plazma, illetve teljes vér felhasználásával 10% CV-vel 20 perc alatt képes 10 ng/l alatti cTnI-koncentráció meghatározására [130]. Egy, az év folyamán megjelent közlemény több mint ezer beteg vizsgálata során vetette össze a nevezett teszt, illetve a központi laboratóriumi műszer alkalmazásával kapott cTnI mérési eredményeket, és a szerzők konklúziója szerint az említett POC teszt által nyújtott adatok egyenértékűek a magasabb költségű, hosszabb átfordulási időt igénylő központi laboratóriumi méréseknél látottakkal [131]. Ezen eredmények alapján okkal várhatjuk a POC tesztek AMI diagnosztikában történő további térnyerését.

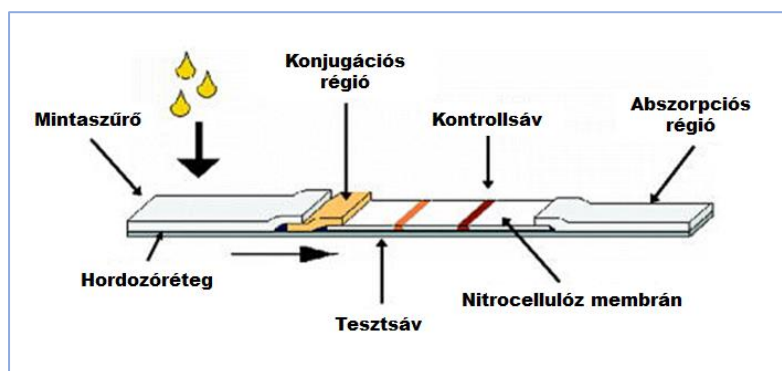
2.5. Vírusdiagnosztika

A vírusfertőzések diagnosztikája három nagy kategóriába osztható azok alapján, hogy az izolált vírussal fertőzött sejtvonalak morfológia változásainak (indirekt), a gazdaszervezet védekezése során megjelent ellenanyagok (szerológiai), vagy közvetlenül a vírus (direkt) kimutatására irányul [132]. A vírusok indirekt kimutatása speciális laboratóriumot és képzett személyzetet igényel, mindemellett a vizsgálatok heteket igényelhetnek és gyakran alacsony a szenzitivitásuk, így a klinikai diagnosztikából egyre inkább kiszorul ez a megközelítés [133]. A vírusfertőzés szerológiai igazolása során figyelembe kell venni, hogy a szerokonverzió bizonyos vírusok esetében akár több hónapot is igényelhet, hosszú ideig fennállhat, és ezek az időtartamok, valamint az immunválasz erőssége egyedi, az adott páciensre jellemző. Mindezek következtében a negatív teszteredmény nem zárja ki, míg a pozitív nem igazolja a vírusfertőzöttséget. A szerológiai vizsgálatok értékelését még tovább nehezíti, hogy ez egyes betegek által termelt antitestek változó szelektivitással és affinitással kötődnek a tesztekben alkalmazott vírusfehérjéket reprezentáló antigénekhez, és ennek megfelelően a különböző páciensek mintái erősebb, gyengébb, vagy akár fals negatív és pozitív jelet is adhatnak. A szerológiai eljárások inherensen alacsony precizitásuk ellenére, alacsony költségüknek és egyszerű kivitelezhetőségüknek köszönhetően jelenleg is a rutin vírusdiagnosztika részét képezik [134].

A vírusok közvetlen kimutatása az azokat alkotó makromolekulák, úm. nukleinsav- és fehérjekomponenseik szelektív azonosításán keresztül kivitelezhető. A virális DNS vagy RNS nagy érzékenységű és szelektivitású mérését a PCR, majd a reverz transzkripció és valós idejű PCR technika megjelenése tette lehetővé. A vírusok nukleinsav alapú detektálásának legfőbb előnye a viszonylag gyors kivitelezhetőséggel párosuló rendkívül magas szenzitivitás és specificitás, mely tulajdonságok a vírusdiagnosztikában általánosan elterjedt valós idejű PCR alkalmazásával még a kvantifikálhatósággal is kiegészülnek. Mindezen sajátságok következtében a valós idejű PCR-en alapuló diagnosztikai protokollok a vírus kimutatása mellett a fertőzés

progressziójáról és a kezelés hatékonyságáról is információt nyújtanak. A valós idejű PCR alapú vírusdiagnosztika általános elterjedésének legfőbb korlátja a viszonylag magas költség- és műszerigénye, továbbá a validált tesztek csak az erre dedikált központi laboratóriumokban kerülhetnek kivitelezésre. Habár számos fejlesztés történt a valós idejű PCR berendezésekkel kivitelezett POC protokollok területén, ezeknek a műszereknek egyelőre nem sikerült komoly teret nyerni a vírusdiagnosztikában. A POC nukleinsav-sokszorosításra és az ezen alapuló diagnosztikára valószínűsíthetően az olyan egyszerűbben kivitelezhető, kevésbé műszerigényes izotermális amplifikációs megközelítések, mint a hurokmediált izotermális amplifikáció (loop mediated isothermal amplification, LAMP) vagy gördülő gyűrű amplifikáció (rolling circle amplification, RCA) további optimalizálása hozhat megoldást [135]. A nagy átteresztőképességű DNS-szekvenálás (HTS) elterjedésével a vírusok teljes genomjának meghatározása is megjelent, mint lehetséges diagnosztikai eljárás [136]. A módszer kétségtelen előnye, hogy egyszerre több vírus és azok mutáns változatai is egy méréssel azonosíthatók, ugyanakkor figyelembe véve a több napos mintaátfordulási időt, az összetett mintafeldolgozási és szekvenálási protokoll következtében kialakuló magas költséget, nem várható, hogy a HTS a közeli jövőben rutin vírusdiagnosztikai megközelítéssé váljon.

Habár napjainkban egyre inkább a nukleinsav alapú víruskimutatás dominál a klinikumban, a vírusok fehérje-alkotórészeiken keresztül történő azonosítása továbbra is komoly jelentőséggel bír. A fehérje alapú megközelítés mellett a rendkívül gyors átfordulás idő, alacsony műszer-, szakértelem- és költségigény szól. Mindezen tulajdonságok az ELISA elméleti alapján nyugvó, bizonyos értelemben annak POC változatának tekinthető laterális áramlásos teszt kifejlesztésével (lateral flow test, LFT; lateral flow immunoassay, LFIA) váltak elérhetővé. Az LFT-ben a befogó ellenanyagok a nitrocellulóz membrán két elkülönült sávjához kapcsoltak, míg a detektáló ellenanyag a konjugáló régióban található. A minta a felvitelt követően a kapilláris hatás következtében vándorol az LFT-ben, melynek során először a valamilyen módon (enzimmel, arany nanorészecskével, fluoreszcens festékkel stb.) detektálhatóvá tett, mobilis ellenanyagot tartalmazó, konjugáló régió áramlik át, majd ezt követően az antigénre szelektív immobilizált ellenanyagot, végül a detektáló antitestre szelektív immobilizált ellenanyagot hordozó sávon halad keresztül. A vírust tartalmazó mintában mindkét ellenanyag sávnál megjelenik a jel, míg a vírusmentes minták csak a második, ún. kontrollsávon okoznak látható elváltozást (9. ábra).



9. ábra Az LFT vázlatos felépítése [137].

A koriális gonadotropin kimutatására alkalmas, első LFT 1978-as piacra kerülése óta eltelt években több száz cég kezdett ilyen típusú tesztek gyártásába, és alkalmazási területük a humán gyógyászat mellett magába foglalja a mezőgazdaságot, környezetvédelmet, élelmiszeranalitikát és a bioterrorizmus elleni védekezést is [137]. Az elérhető LFT-k között számos humán, állati és növényi vírus detektálására alkalmas validált diagnosztikai teszt is elérhető [138]. Az összehasonlító tanulmányok alapján az LFT-k által nyújtott eredmények általában jó korrelációt mutatnak az egyéb vírustetektálásra alkalmazott eljárásokból származókkal. Így például a hepatitis B szérumból LFT-vel történő kimutatása 97,5–99,2%-os egyezést mutatott a PCR alapú detekció eredményeivel, és hasonlóan jól egybeeső eredmények érhetők el az adenovírus garatkenetből történő kimutatására kifejlesztett LFT rendszerrel is [139][140]. Megjegyzendő, hogy elfogadhatatlanul rosszul teljesítő LFT-k is megjelentek a kereskedelmi forgalomban, melyekre példaként megemlíthető az adenovírus székletből történő kimutatására árusított készlet eredményeinek a PCR alkalmazásával kapott adatokkal való 22%-os egyezése [141].

Az ellenanyagokat taglaló fejezet bemutatta a megfelelően szelektív, nagy affinitással rendelkező antitestek előállításának nehézségeit. Ezek a problémák különösen hangsúlyosan jelentkeznek a vírusdiagnosztika területén, hiszen a vírusok magas mutációs rátája az antigén régiók aminosavszekvenciájának gyors változásában is megnyilvánul, így az ideális vírusdiagnosztika biztosításához a változással lépést tartani képes ellenanyagok előállítása szükséges. Ennek a feltételnek az antitest-fragmenteket kódoló phage-display könyvtárak felelhetnek meg, melyek alkalmazásával ideális esetben egy hónap alatt előállítható a kívánt rekombináns ellenanyag. A megközelítés életképességét alátámasztják a humán patogén vírusokat felismerő rekombináns ellenanyagok [142]. Habár a phage-display megoldást nyújthat a vírusdiagnosztikában központi jelentőségű gyors tesztfelkészítésre, az ellenanyagon alapuló eljárások továbbra sem tudnak eleget tenni egy, az LFT-vel szemben támasztott további elvárásnak, nevezetesen az egyszerű tárolhatóságnak és robusztusságnak. Egyes vizsgálatok szerint az LFT tesztcsíkok érzékenysége felére esik vissza kilenc hónapos szobahőn történő tárolást követően, ami a gyakorlati szempontból jelentős költségnövekedést eredményez [143]. A megfigyelt érzékenységvesztés valószínűsíthetően az ellenanyagok funkcióvesztésének következménye.

3. Az aptamerek

3.1. Az aptamerek felfedezése

Az aptamerekről szinte teljesen egy időben két kutatócsoport Nature-ben, illetve Science-ben megjelent közleménye jóvoltából értesült a világ tudományos közönsége. Az „aptus” és a „mer”, alkalmazkodás, illetve rész görög szavakból létrehozott aptamer elnevezésért felelős Ellington és Sosztak kutatópáros az RNS világ evolúciójának tanulmányozása során arra volt kíváncsi, hogy megjelenhetnek-e adott ligandokat szelektíven kötni képes RNS molekulák. Kérdésük megválaszolásához egy olyan, 155 nukleotidból álló RNS könyvtárat szintetizáltak, melynek középső 100 nukleotidos régiója random szekvenciával rendelkezett, míg az azt határoló szakaszok nukleotidsorrendje rögzített volt. A kiindulási, mintegy 10^{13} egyedi RNS-ből álló könyvtárat hat, különböző szerves festékekkel módosított agaróz gyantával inkubálták, majd a mosási lépést követően a gyantához kötött RNS-eket reverz transzkriptázzal átírták, a létrejött DNS-t PCR-rel sokszorozították, majd T7 RNS polimerázzal előállították a dúsitott RNS könyvtárat. Ezeket a lépéseket öt ciklusban ismételve olyan RNS-eket szelektáltak, amelyek különbséget tudtak tenni a molekulák között, vagyis csak az eljárás során használt szerves festékekkel alakítottak ki komplexet [144]. A kutatócsoport ez előbbi kísérletet random DNS könyvtár alkalmazásával is megismételte, és eredményeikkel igazolták, hogy az RNS-nél látottakhoz hasonló affinitással és szelektivitással bíró aptamerek DNS-ből kiindulva is generálhatók [145].

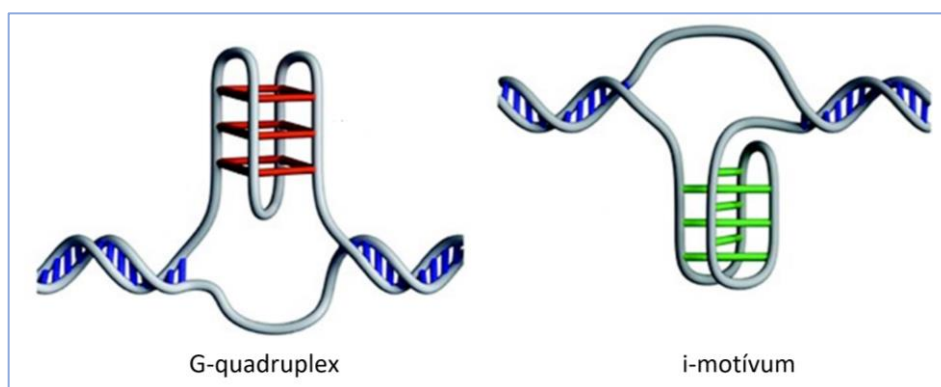
Az aptamer kutatás másik úttörő kettőse Tuerk és Gold teljesen más problémára kereste hasonló metodikai megközelítéssel a választ. A T4 bakteriofág DNS polimeráza negatív visszacsatolással szabályozza transzlációját, ugyanis a fehérjét kódoló mRNS-en a riboszóma-kötőhellyel átlapolva található egy 36 nukleotidból álló polimeráz-kötőhely. A kutatók a kölcsönhatáshoz szükséges nukleinsav-szekvencia meghatározásához a fentiekben leírt módon jártak el, de esetükben a random RNS-régió csak 36 nukleotidból állt, így az RNS könyvtár mérete jóval kisebb volt, ~65000 különböző oligonukleotidot tartalmazott, illetve a szelekció célmolekulájaként, a nitrocellulóz membránon rögzített polimeráz szolgált. A szelekciót négy cikluson át ismételve a már ismert polimeráz-kötő szekvencia mellett további, a fehérjéhez még erősebben kapcsolódó RNS-variánsokat is izoláltak. Az aptamerek szelekcióját leíró folyamatot a kutatópáros SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) elnevezéssel illette, és azóta is így ismert a szakirodalomban [146]. Mindkét kutatócsoport felismerte azt az elvi lehetőségét, hogy a SELEX lényegét jelentő *in vitro* molekuláris evolúcióval bármilyen molekulára előállítható aptamer.

Gold laboratóriuma rövid időn belül számos fehérjére szelektált aptamerrel igazolta a hipotézis helytállóságát, és meglátva az aptamerekben rejlő lehetőséget 1992-ben létrehozta a NexaGen nevű biotechnológia céget. A NexaGen-ben elkezdett munkák eredményezték az első terápiás aptamer 2005-ben történő piacra kerülését. A nedves típusú időskori makuláris degeneráció (AMD) kezelésére kifejlesztett gyógyszer (Macugen) a vaszkuláris endoteliális növekedési (VEGF) faktorra szelektív, annak receptorhoz való kötődését gátolja. Habár további jóváhagyott aptamer egyelőre sem a terápiában, sem a diagnosztikában nincsen alkalmazásban, számos jelölt van különböző

klínikai fázisban, és évente több mint ezer aptamerrel kapcsolatos közlemény jelenik meg a szakirodalomban, Mindezek alapján jogosan feltételezhetjük, hogy az aptamerek gyakorlati alkalmazásának csak a kezdeteit látjuk, és az elkövetkező évtizedekben az ellenanyagokhoz hasonlóan a mindennapi orvoslás részévé válnak.

3.2. Az aptamer-ligand kölcsönhatások molekuláris háttere

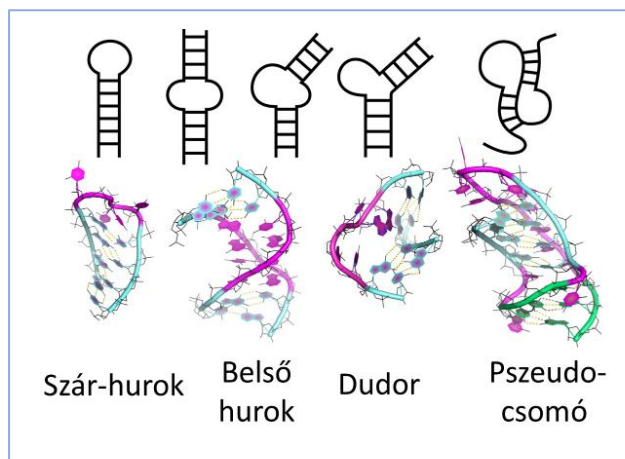
A Watson-Crick nukleotid bázispárképzés szabályai több mint félszáz éve a tananyag részét képezik, így olyan mélyen beivódtak a gondolkodásunkba, hogy a nukleinsav-szerkezetek kialakulását általában ezen kanonikus szabály mentén képzeljük el. A Watson-Crick bázispárképzés jelentősége megkérdőjelezhetetlen, a nukleinsavak döntő részt ezen szabály mentén alakítják szerkezetüket, hoznak létre kettősszalú régiókat. A megfelelő nukleotidok között létrejött hidrogénhid kötések nyomán képződő kettős szál azonban távolról sem kizárólagos másodlagos szerkezeti eleme a nukleinsavaknak, így például a genomban található guaninban, illetve citozinban gazdag régiók G-quadruplexet, illetve interkaláló-motívumot (i-motívumot) hozhatnak létre (10. ábra).



10. ábra G-quadruplex és i-motívum DNS-szerkezetek [148].

A G-quadruplexek általában a promóter és telomer régiókban találhatók, és annyira általánosan elterjedtek, hogy becslések szerint a gének mintegy 50%-ánál szerepet játszanak a transzkripció szabályozásában [147]. Az i-motívumok biológiai funkciójáról kevesebb ismerettel rendelkezünk, de az utóbbi időben született eredmények alapján – a G-quadruplexekhez hasonlóan – dinamikus keletkezésükkel és lebomlásukkal a génexpresszió regulációjában vehetnek részt [148][149]. Az aptamerek szempontjából nézve a két elem legfontosabb tulajdonsága, hogy egy DNS-szálon belül jönnek létre a kialakulásukhoz vezető kölcsönhatások, így egyszálú DNS is képes e szerkezetek kialakítására. A G-quadruplexben négy guanin egy olyan G-kvartettet hoz létre, amelyben egy guanin másik két szomszédos guaninnal a Hoogsteen bázispárosodás szabályainak megfelelően hidrogénhid kötésekkel alakít ki. Az általában két-három G-kvartettből felépülő G-quadruplex stabilizálásában koordinatívan kötött fémionok, jellemzően kálium ionok vesznek részt [150]. Az i-motívumban – a nevének megfelelően – két hemiprotonált citozin által formált struktúra egymásba interkalálódik [151]. A G-quadruplexek nagy stabilitásuknak köszönhetően a SELEX során az aptamerekben gyakran feldúsuló, általánosan előforduló szerkezeti elemek [152]. Ezzel

szemben a protonkoncentrációra rendkívül érzékeny i-motívumok a szelekció során nem jelennek meg, a már azonosított aptamerek azonban i-motívummal utólag kiegészítve pH-változásra szerkezetet, és ezen keresztül specificitást váltó aptamerekké konvertálhatók [153]. A G-quadruplex mellett változatos, Watson-Crick bázispárosodással kialakuló struktúrák, ún. szár-hurok, belső hurok, dudor és pszeudocsomó figyelhetők meg az aptamerekben (11. ábra) [154].

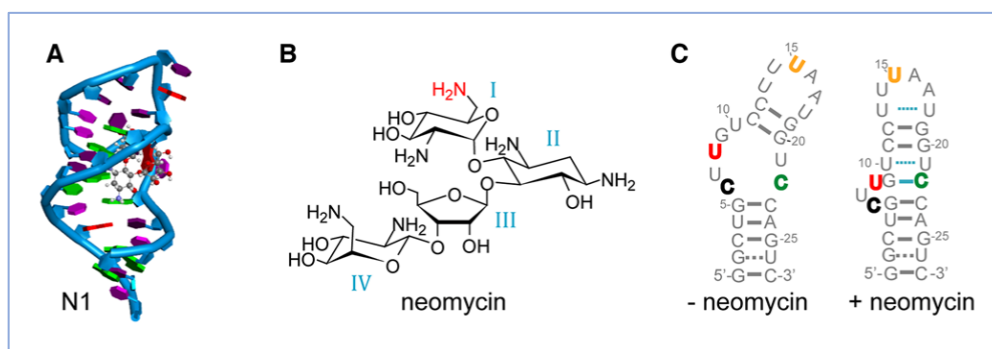


11. ábra Watson-Crick bázispárosodás nyomán kialakuló aptamerszerkezetek [154].

A nukleotidokat összekapcsoló foszfodiészter kötések következtében minden nukleinsav erős negatív töltéssel bír, így nem meglepő, hogy az aptamer-célmolekula kölcsönhatásokban az ionos kötések kiemelt szerepet játszanak. Így például a trombinra szelektált Toggle-25t RNS aptamerről röntgen kristallográfiás vizsgálatokkal igazolták, hogy bizonyos foszfátjai a fehérje argininben gazdag felszínéhez kapcsolódnak [155]. Hasonló megfigyelésekre jutott egy másik kutatócsoport is egy prion fehérjéből származó peptid és arra szelektív aptamer kölcsönhatásának vizsgálata során. Eredményeik alapján ezen aptamer esetében a foszfátcsoport a fehérjét alkotó, pozitívan töltött lizinnel lépett kölcsönhatásba [156]. Az ionos kölcsönhatáson kívül számos másodlagos kémiai kötéstípus is elengedhetetlen az aptamer-ligand komplex létrejöttéhez. A korábban említett trombin aptamer szerkezeti vizsgálata nem csak az arginin-foszfát kölcsönhatásra derített fényt, ugyanis az ionos kötésen túl van der Waals és hidrogénhid kötések, valamint az aromás gyűrűk pi elektronjai között látható rétegző kölcsönhatásokat is leírtak a kutatók [155].

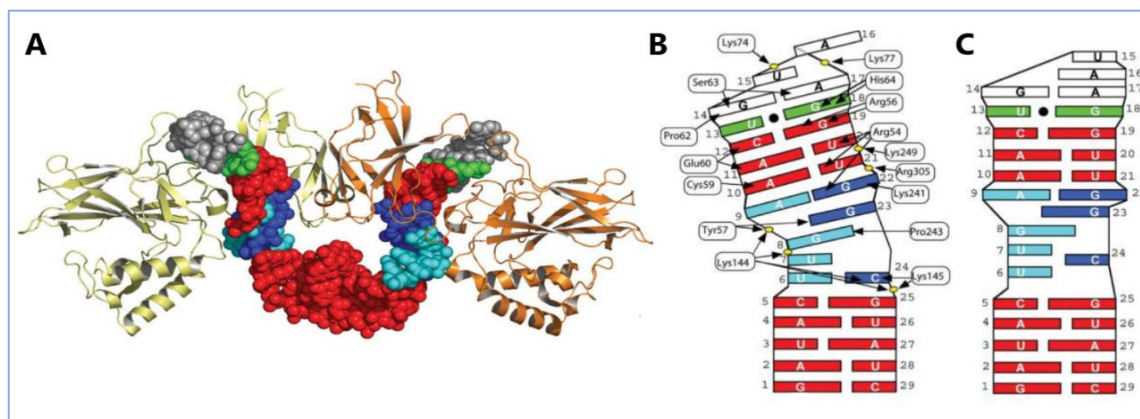
Az aptamerek az ellenanyagoknál dinamikusabban változó, rugalmasabb szerkezettel rendelkeznek. Ennek megfelelően az antitest-ligand komplex keletkezésének mechanizmusa a kulcs-zár modellhez, míg az aptamer-célmolekula kapcsolat kialakulása az indukált illeszkedés sémához áll közelebb. Az aptamerek rendkívül változatos szerkezetekkel rendelkeznek, és más-más módon lépnek kapcsolatba ligandjukkal, így sem a szerkezeti tulajdonságaik, sem a kölcsönhatás kialakításában részt vevő kémiai kötések nem általánosíthatók. Annyi azonban kijelenthető, hogy az eddigi adatok alapján a kismolekulák az aptamer által formált zsebbe illeszkednek, míg a makromolekulák az aptamerek felszínével lépnek kapcsolatba. Az aptamer mindkét kölcsönhatástípus esetében rendelkezik egy oldatban lévő szabad

formájú szerkezettel, amely a komplexképzés során adaptív változáson megy keresztül. A folyamatot a neomycin-specifikus aptamer segítségével részletekbe menően tanulmányozták, és a megfigyelések szerint az RNS szerkezetváltása két lépésben megy végbe. Az első lépés során a neomycin egy kisebb konformációváltozással kapcsolatba lép az aptamerrel, a második lépésben pedig kialakul a végleges szerkezet, melynek eredményeként az antibiotikum elfoglalja helyét az RNS által képzett zsebben (12. ábra) [157].



12. ábra Neomycin-szelektív aptamer ligandkötés nyomán bekövetkező szerkezetváltása.

(A) Az aptamer-neomycin komplex térbeli szerkezete. (B) A neomycin szerkezete. (C) A szabad, illetve ligandkötött aptamer szerkezetében megfigyelhető eltérések [157].



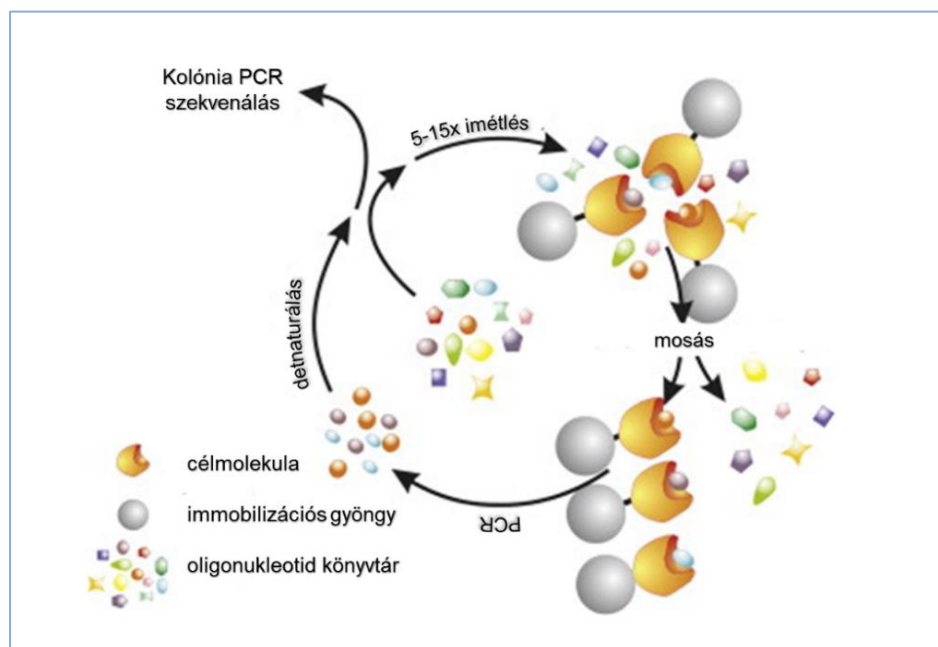
13. ábra NF- κ B-szelektív aptamer ligandkötés nyomán bekövetkező szerkezetváltása. (A) Aptamer-NF- κ B komplex kristályszerkezete. (B) A fehérjét kötő aptamer szerkezete és a kialakuló nukleotid-aminosav kölcsönhatások. (C) A szabad aptamer szerkezete [158].

A makromolekulákra szelektív aptamereket vizsgálva is az látható, hogy a kölcsönhatás létrejöttéhez elengedhetetlen a szabad oligonukleotidok megfelelő hajtogatódása. A nukleáris mágneses rezonancia (NMR) alkalmazásával kapott adatok igazolták, hogy habár a szabad anti-NF- κ B RNS aptamerre jellemző bizonyos szerkezeti sajátosságok a fehérjével alkotott komplexben is megmaradnak, a fehérje kötődése jelentősen megváltoztatja a GUAA négyes hurok szerkezetét. Az átalakulás azt jelzi, hogy

a dinamikusan változó hurok elengedhetetlen a transzkripció faktor szelektív felismeréséhez (13. ábra) [158].

3.3. Az aptamerek szelekciója

Habár a SELEX elméleti alapja nem változott a leírása óta eltelt harminc évben, metodológiája hatalmas fejlődésen ment keresztül, és az eljárás számos variációja jelent meg. A technológiai fejlesztések jelentőségét jól illusztrálja, hogy a SELEX leírását követő évtizedben mindössze néhány tucat célmolekulára szelektált aptamer került közlésre, és ez a szám a módszer tökéletesítésével párhuzamosan indult robbanásszerű növekedésnek. A leggyakrabban alkalmazott SELEX protokollok alapjaiban nem változtak, továbbra is immobilizált célmolekulák segítségével izolálják a szelektív aptamereket, a kötési, a mosási, az amplifikációs, és az egyszálúsítási lépések 8-15 cikluson keresztüli iterálásával (14. ábra).



14. ábra A SELEX vázlatos folyamatábrája [159].

A SELEX optimalizálása során több szempontból is fontos lépés volt a célmolekulák paramágneses gyantára történő kapcsolása: i.) A sikeres aptamerszelekcióhoz az oligonukleotid több nagyságrendnyi feleslege szükséges, ami a gyakorlatban néhány pikomólyi célmolekulára történő szelekciót jelent. Ilyen mennyiségű célmolekula immobilizálásához néhány mikroliter gyanta elegendő, mely térfogat hagyományos módon rendkívül körülményesen kezelhető, a mosási lépések során gyakorlatilag elveszik. ii.) A csökkent gyantatérfogat a célmolekula helyett gyantához kötődő aptamerek szelekcióját is csökkenti. iii.) A mosási lépések elválasztási hatékonysága megnő [160]. A módosított eljárást néhány év múlva egy másik kutatócsoport FluMag-SELEX néven publikálta, így ezen a néven vált ismertté a szakirodalomban [161].

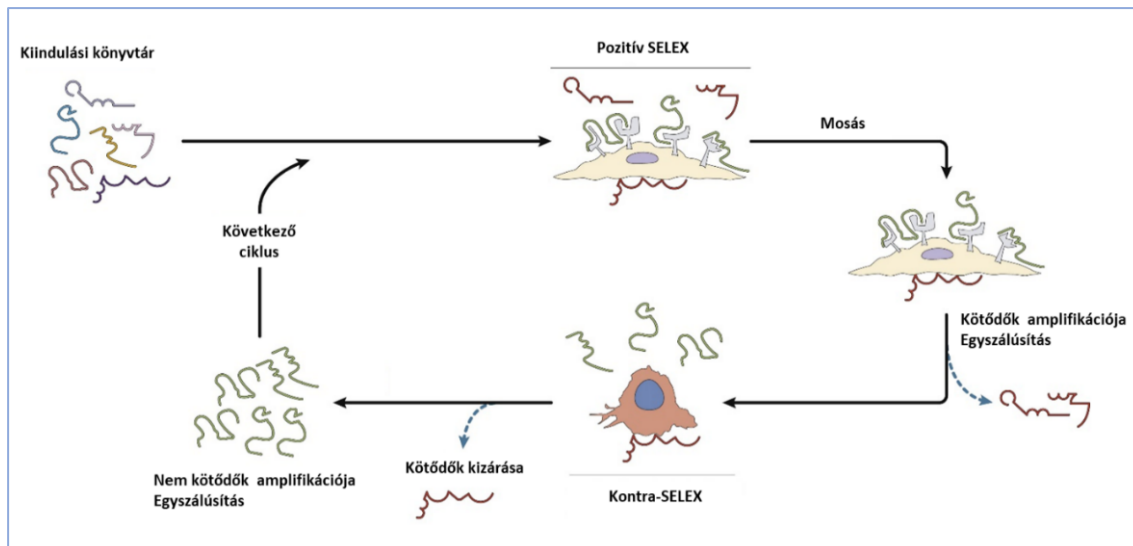
Amint a fentiekben látható volt, a SELEX során problémát jelent a célmolekula hordozójára szelektív aptamerek megjelenése. A nem kívánatos oligonukleotidok izolálását elkerülendő általánossá vált az ún. negatív-SELEX (negative-SELEX) alkalmazása, melynek során a SELEX-et megelőzően a kiindulási aptamerkönyvtárat a hordozóval inkubálják, majd ezt követően a felülúszóban maradt nukleinsavakkal folytatódik a szelekció [145]. Hasonló logikán alapul a kontra-SELEX (counter-SELEX) is – a nem célmolekulára szelektív oligonukleotidok eltávolítandók –, de egy lépéssel tovább gondolva, az aptamerek szelektivitását maximálisan kiaknázandó a SELEX kivitelezésekor több ciklust követően a célmolekulához szerkezetileg nagyon hasonló molekulával inkubálják az oligonukleotidokat, a következő SELEX lépésben pedig a kontra-SELEX utáni felülúszókat használják. A módszerben rejlő lehetőségeket jól igazolja, hogy első alkalmazása során az egymástól egyetlen metilcsoportban különböző teofilin és koffein között differenciálni képes aptamereket sikerült azonosítani [162].

A kontra-SELEX potenciálja nem korlátozódik a rendkívüli szelektivitással rendelkező aptamerek izolálására, jól alkalmazható a szelekció kezdetekor nem meghatározott célfehérjékre specifikus aptamerek azonosítására is. Ez a megközelítés sejt-SELEX (cell-SELEX) néven terjedt el, és az évek során számos módosított változata jelent meg [163]. A metodika elvi alapját az adja, hogy a kontra-SELEX beiktatásával az aptamerszelekcióhoz nem feltétlenül szükséges tisztított célmolekulát használni. A sejt-SELEX két különböző sejtvonalat használ szelekcióra, az egyik a SELEX, a másik pedig kontra-SELEX lépésben kerül alkalmazásra, így módon a kívánt sejtvonatra jellegzetes membránfehérjékre izolálható aptamerek (15. ábra). Az eljárás előnyei, hogy a membránfehérjék különleges kihívást jelentő előállítás és tisztítása szükségtelenné válik, és az ily módon szelektált aptamerek a fehérjét fiziológiai körülmények között kötik, így gyakorlati alkalmazhatóságuk valószínűsége nagyobb. Ez utóbbira példaként megemlíthető a metasztizáló vastagbélrák sejtekre szelektált aptamerek doxorubicinnel való konjugálása és célzott kezelésre történő felhasználása [164]. Ugyanilyen fontosságú, hogy a sejt-SELEX a fehérje-tömegspektrometriával kombinálva lehetőséget teremt korábban ismeretlen, adott sejtekre jellemző fehérjék azonosítására. Ezekben az esetekben a szelektált aptamereket a fehérjék affinitástisztítására használják, majd a sejt kivonatból ily módon izolált fehérjék tömegspektrometriával kerülnek azonosításra. A sejt-SELEX ilyen irányú alkalmazhatóságát igazolják a tumorsejtekre specifikus fehérjék felfedezését leíró közlemények [165].

A sejt-SELEX sikere bizonyítja, hogy aptamerszelekció a célmolekula ismerete nélkül is megvalósítható. Ezt az állítást még egyértelműbben igazolják az ún. *in vivo*-SELEX segítségével elért eredmények. A módszer elnevezése azon alapul, hogy a szelekció élő állatban történik, az egerek farki vénájába fecskendezik az aptamerkönyvtárat, majd a különböző szervek preparálását követően kitisztítják és amplifikálják az azokban felhalmozódott aptamereket. A tradicionálisnál magasabb ciklusszám után (15-25 ciklus) az akkumulálódott oligonukleotidok szekvenciáját minden egyes szervben HTS-sel meg kell határozni, mert a kontra-SELEX hiányában csak ezen szekvenálási eredmények összevetésével lehet azonosítani a szervekre specifikus aptamereket [166]. A *in vivo*-SELEX segítségével több szervre izoláltak aptamereket, mind közül a vér-agy gát endotél sejtjein keresztül az agyi parenchymába behatolók

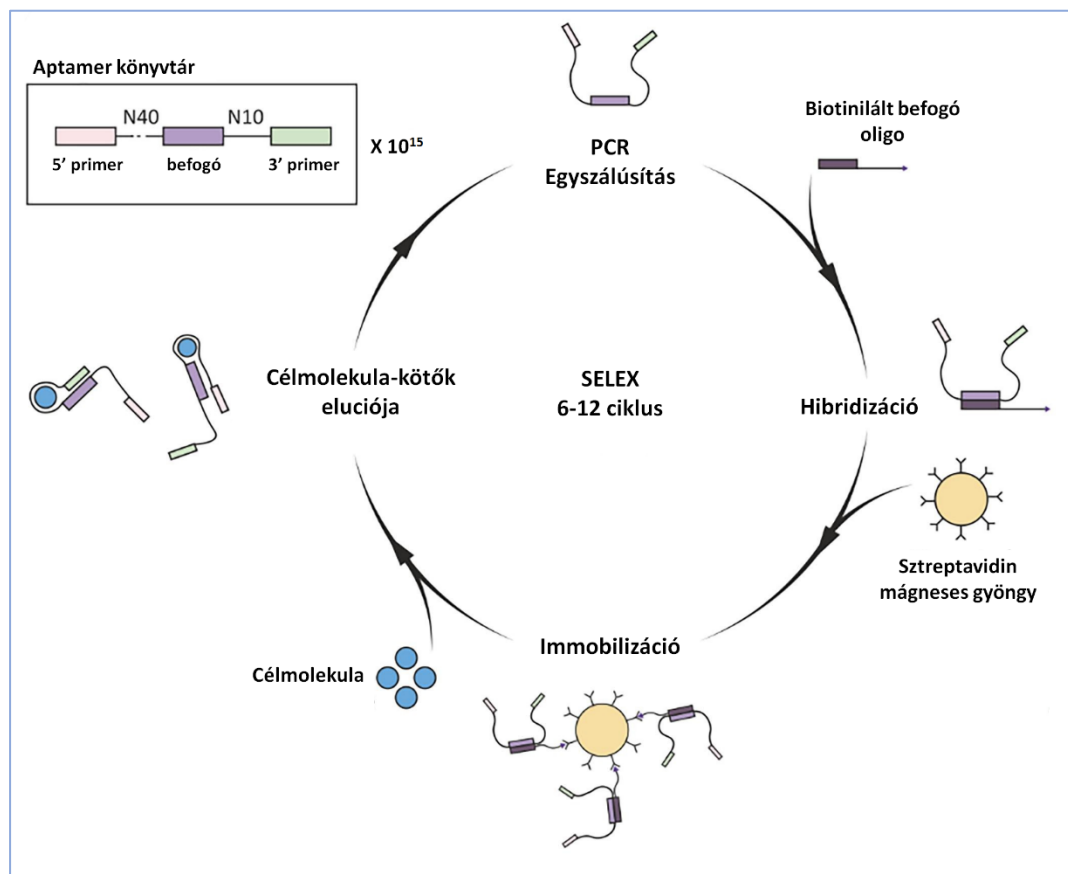
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

demonstrálják leginkább az eljárásban rejlő lehetőségeket [167]. Más kísérletekben az *in vivo*-SELEX-hez humán tumor xenograftot hordozó egereket alkalmazva rákos sejtekben feldúsuló aptamereket szelektáltak, és ily módon azonosítottak ismert tumormarkerre (pl. RNS helikáz) szelektív, illetve a tumornövekedést *in vivo* gátló aptamerket is [168][169].



15. ábra A sejt-SELEX vázlatos folyamatábrája [166].

A kismolekulákra specifikus aptamerek szelektációját megnehezíti, hogy a célmolekulák immobilizálásával az aptamerrel kölcsönhatást kialakítani képes molekulafelületek, funkciós csoportok tetemes része sztérikus okok miatt elérhetatlenné válik az oligonukleotidok számára, minek következtében a kismolekulákra kivitelezett SELEX sikerrátája általában alacsony. Egy kanadai kutatópáros – figyelembe véve azt a tényt, hogy az aptamerek célmolekula-kötésük nyomán szerkezet változáson mennek keresztül – a hagyományos SELEX mintegy inverz változatát alkalmazta ATP- és GTP-specifikus aptamerek azonosítására [170]. A kiindulási oligonukleotid-könyvtárunk három rögzített nukleinsav-szekvenciájú régiót tartalmazott, melyekből kettő a sokszorosíthatóságot hivatott biztosítani, míg az oligonukleotid random részének közepén elhelyezkedő harmadik, lehetővé tette az oligonukleotidok báziskomplementaritáson keresztüli rögzítését. A SELEX kivitelezésekor az oligonukleotidok a középső régiójukkal komplementer, paramágneses gyantához kapcsolt oligonukleotidokon keresztül immobilizálva, míg a szelekció célmolekulái, a purin nukleotidok oldatban voltak. Az oligonukleotid-könyvtárból azok, amelyek a célmolekulával való kölcsönhatás nyomán megfelelő szerkezetváltozáson mentek keresztül, oldatba kerültek. Ennek megfelelően – a konvencionális SELEX-szel ellentétesen – az oldatban lévő oligonukleotidok kerülnek sokszorosításra, lépnek tovább a következő szelektációs ciklusba (16. ábra). A FluMag-SELEX-hez hasonlóan, itt sem a módszer kifejlesztői lettek a névadók, a tudományos szakirodalomban bevett befogó-SELEX (Capture-SELEX) kifejezés később, a FluMag-SELEX elnevezést kitaláló kutatócsoport által közölt publikációban jelent meg először [171]. Habár az eljárás nem vált általánosan elterjedtté, alkalmazhatóságát, több antibiotikumra szelektív aptamer azonosítása igazolja [172].



16. ábra A befogó-SELEX folyamatának vázlatja [173].

A célmolekula immobilizálását kiküszöbölendő egy másik kanadai kutató laboratórium a befogó-SELEX-től eltérő stratégiát követett, és a kapilláris elektroforézis alkalmazásával kidolgozta az ún. a kapilláris elektroforézis-SELEX (CE-SELEX) eljárást [174]. A kapilláris elektroforézis (CE) előnyei között megemlítendő a minimális, néhány μ -es mintaigény, a hagyományos kromatográfiával összevetve több nagyságrendnyivel magasabb elválasztási hatékonyság, valamint a percekben mérhető szeparációs idő. E tulajdonságok következtében a CE-SELEX rendkívül kis mennyiségű célmolekulával, egy-két szelektációs ciklussal, tulajdonképp egy napon belül kivitelezhető. A CE-SELEX alkalmazását azonban súlyosan korlátozza, hogy a CE csak alacsony ionkoncentrációval kivitelezhető. Ennek következtében az aptamerek tervezett alkalmazási körülményeiktől jelentősen eltérő pufferben kerülnek szelektációra, így az ionkoncentráció változására érzékeny aptamerek szerkezete a gyakorlati felhasználásuk során nem megfelelően alakul, és az aptamerek gyakorlatilag funkciójukat veszítik. Az aptamerekkel szembeni bizalmatlanság egyik legfőbb oka általánoságban is az, hogy ezt a szempontot a szelektáció során gyakran nem vették figyelembe, így a közleményekben leírt aptamerek jelentős része csak ideális körülmények között működik, gyakorlati használhatóságuk minimális. Ezt a megfigyelést kutatócsoportunk saját tapasztalatai is alátámasztják, a CE-SELEX-szel poliovírusra szelektált aptamereink a tervezett vírusdetekciós körülmények között nem kötődtek a vírusához.

A fentiekben bemutatott SELEX módszereken túl számos további módosulat is ismert, ezek egy része elenyésző mértékben tér el a bemutatottaktól, a másik részükre vonatkozó szakirodalom pedig jobbra csak a módszer leírására korlátozódik, alkalmazhatóságukat további közlemények nem igazolják, így ezek tárgyalásától eltekintek.

Habár a kiindulási aptamerkönyvtárban található 10^{12} - 10^{14} egyedi szekvenciával rendelkező oligonukleotid száma drasztikusan csökken a SELEX során, az utolsó szelekciós ciklust követően is akár tízezres nagyságrendben találhatók az eltérő oligonukleotidok (nem közölt adataink). A HTS általánossá válását megelőzően a SELEX végén kapott oligonukleotidokat vektorokba illesztették, és a transzformált sejtekből felnőtt baktériumtelepekből tisztított néhány tucat vektor szekvenciáját Sanger-féle szekvenálással meghatározták. Az aptamerkutatóban is egyre nagyobb teret nyerő HTS ezt a lépést feleslegessé tette. A HTS-sel nyert szekvenciaadatok értékelésére pedig számos szabadon felhasználható program áll rendelkezésre. A legfejlettebbek az egyes szekvenciák dúsulása, szekvencia motívumok megjelenése mellett, a jóslott másodlagos szerkezetek kialakulását kísérő szabadenergia-változásokat is figyelembe veszik a legígéretesebb aptamerjelöltek azonosításához [175]. Végeredményben a SELEX-et követően – az egyik esetben a technológia áteresztőképességéből kifolyólag, a másik esetben a szekvenciaanalízis eredményeként – mindkét megközelítés esetén néhány tucat aptamer kerül további vizsgálatra.

Az aptamer-ligand komplex kinetikai paramétereinek vizsgálata elengedhetetlen a gyakorlati jelentőséggel bíró jelöltek azonosításához. A SELEX végén kapott oligonukleotidok célmolekula iránti affinitása és szelektivitása között óriási különbségek vannak, akár olyanok is előfordulhatnak, amelyek a szigorú szelekciós körülmények ellenére is gyengén vagy egyáltalán nem kötődnek feltételezett ligandjukhoz. A jelenségre magyarázatul szolgálhat, hogy a szelekció nem zárja ki azokat az oligonukleotidokat, amelyek egyedül nem, csak egy másik oligonukleotiddal együtt tudnak komplexet kialakítani a célmolekulával. Az aptamer-ligand komplex kinetikai vizsgálatára számos metodika van használatban. Mindezek részletes ismertetése messze túlnyúlna a dolgozat keretein, ezért csak felsorolásszerűen említem őket. Az alkalmazott megközelítések két nagy kategóriába oszthatók az alapján, hogy a mérésekhez az egyik feltételezett kölcsönható partner immobilizálása szükséges vagy mindkét molekula oldatban van. Az immobilizálást igénylő módszerek közé sorolhatók a legrégebb óta ismert, oszlopon történő particionálás, illetve filterkötés vizsgálat, a napjainkban legáltalánosabbak használtak közé pedig a felületi plazmon rezonancia (SPR), bioréteg interferometria (BLI) és ALPHA. Az oldatban történő mérési technikák közül a legősibb a dialízissel történő particionálás, az újabbak közé pedig a fluoreszcencia polarizáció (FP), CE, valamint a mikroskálás termoforézis (MST) tartoznak [176]. Megjegyzendő, hogy a különböző metodikákkal meghatározott disszociációs állandók akár nagyságrendileg is eltérhetnek egymástól, így ezek az eredmények csak orientációként szolgálnak. Az aptamer alkalmazhatósága csakis a valós körülmények között végzett vizsgálatokkal igazolható, vagyis az említett mérések csak a legjobb aptamerjelöltek azonosítására használandók.

3.4. Aptamerek módosított nukleotidokkal

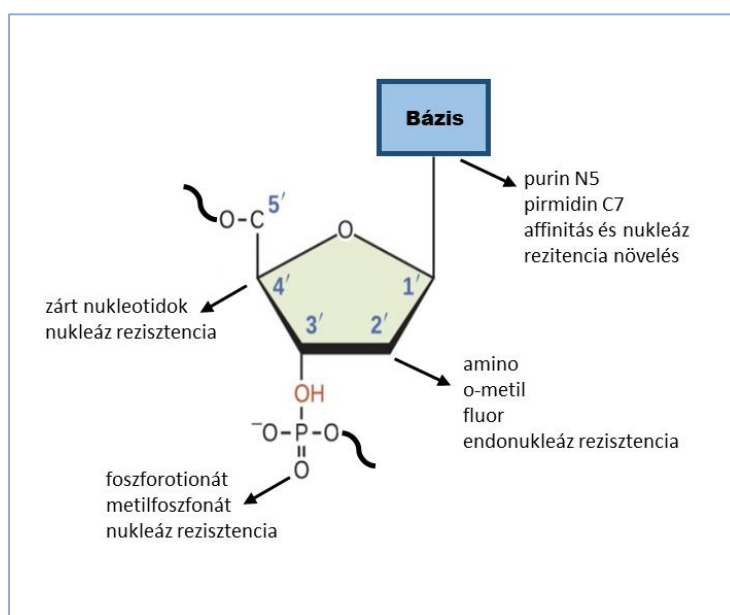
Az aptamerek ellenanyagokkal szembeni előnyei közül néhány a SELEX sajátosságaiból fakad, melyek már körvonalazódhattak a szelekciójukat bemutató fejezetből. Pontokba szedve a következőkben összegezhetők a SELEX kedvező tulajdonságai: i.) teljesen *in vitro*, sem állatot, sem sejtet nem igénylő folyamat; ii.) antigenitással nem rendelkező, illetve toxikus molekulákkal is megvalósítható; iii.) fiziológiás körülményektől távoli, akár szerves oldószerekben is kivitelezhető eljárás; iv.) egyes változatai nem igénylik a célmolekulák ismeretét és v.) viszonylag gyors és költséghatékony folyamat. Mindezen tulajdonságok következtében célmolekulára szelektív aptamerek sok esetben egyszerűbben, töredék idő- és költségigénnyel előállíthatók, mint a hasonló szelektivitással és affinitással rendelkező antitest megfelelőik. Ráadásul az aptamerek azonosításukat követően kémiai szintézissel teljesen reprodukálható módon előállíthatók, ami egy újabb érv az aptamerek mellett, figyelembe véve az ellenanyagok sejtekben való termeltetéséből fakadó nehézségeket és költségeket is. A teljes részletességgel ismert kémiai szerkezet ismét csak az aptamerek javára billenti a mérleget, ugyanis irányított módosítást tesz lehetővé, így tetszőlegesen immobilizálhatók, illetve konjugálhatók, mely lépések az aptamerek és ellenanyagok alkalmazása során általában elkerülhetetlenek, és az utóbbiak esetében szinte mindig aktivitásvesztéssel járnak együtt. Az aptamerek egy további előnyös jellemzője viszonylag egyszerű felépítésükhöz köthető, melynek következtében nem igényelnek különleges tárolási körülményeket, és aktivitásukhoz szükséges térszerkezetüket denaturálásukat követően is képesek ismét felvenni.

Az aptamerek kedvező tulajdonságának hátterében álló egyszerű felépítés egyben hátulütőjük is. A húszféle, eltérő kémia tulajdonsággal rendelkező aminosavakból felépülő ellenanyagokkal szemben az aptamerek mindössze négy, a kialakítható kémia kötések tekintetében nagyon hasonló nukleotidból állnak össze. Az oligonukleotidok kémiai homogenitása az aptamerszelekció viszonylag alacsony sikerrátájában nyilvánul meg, a becslések szerint a SELEX-eknek mintegy 30%-a eredményez kívánatos specificitású és affinitású aptamereket, bizonyos célmolekulára pedig a szelekció többszöri ismétlésével sem sikerül megfelelő tulajdonságokkal rendelkező aptamereket előállítani [177].

Az aptamerek alkalmazásának egyik további korlátozó tényezője az általánosan előforduló nukleázoknak való kitettségük és ebből adódó degradációjuk. Ez a probléma különösen az aptamerkutatás hajnalán volt hangsúlyos, ugyanis – annak az elképzelésnek köszönhetően, hogy az RNS-ek nagyobb konformációs rugalmassággal rendelkeznek, mint a DNS-ek – a szelektált aptamerek túlnyomó részt RNS-ek voltak. Az RNS hidrolíziséért nem csak az univerzálisan jelenlévő, a környezeti hatásoknak rendkívül ellenálló ribonukleázok felelősek [178]. Az RNS-ek 2'-hidroxilcsoportja nukleofil ágensként megtámadhatja a foszfoészter kötést, így enzim jelenléte nélkül, autohidrolízissel is lebomolhatnak [179]. Miután beigazolódott, hogy DNS és RNS aptamerek ugyanolyan eséllyel szelektálhatók, a legtöbb kutatólaboratórium felhagyott az RNS aptamerek alkalmazásával, napjainkban a SELEX-hez szinte kizárólag DNS kiindulási könyvtárat alkalmaznak [159]. Nagyobb stabilitásuk ellenére a DNS aptamerek

degradációja – különösen a terápiás alkalmazásuk esetén – továbbra is gyakran jelent megoldandó kihívást. A megfigyelések szerint az oligonukleotidok plazmában való lebontásáért szinte kizárólag az exonukleázok felelősek, és az egyszálú DNS-ek sokkal érzékenyebbek ezen enzimek támadására, mint a kétszálúak [180]. Az exonukleázok okozta hasítás viszonylag egyszerűen kivédhető az aptamerek 3'-végére kapcsolt biotinnal vagy 3'-3' kötést létrehozó inverz módon kapcsolt nukleotiddal. A 3' módosításhoz hasonlóan az aptamerek 5'-vége is megvédhető az exonukleázoktól, amennyiben valamilyen csoport (amin, foszfát), illetve molekula (polietilén-glikol, koleszterin, zsírsav, fehérje) kapcsolódik az oligonukleotid 5' foszfátjához [181].

Az aptamerek kémiai repertoárja és nukleázokkal szembeni ellenállóképessége egyaránt növelhető módosított nukleotidok alkalmazásával. Az aptamerek átalakítására alkalmazott nukleotidok nagy száma nem teszi lehetővé, hogy mindegyik tárgyalásra kerüljön, így a továbbiakban csak a legismertebbek kerülnek bemutatásra. A nukleotidokat alkotó komponensek közül a foszfáton és a cukron eszközölt módosítások elsősorban a nukleázrezisztenciát hivatottak fokozni, míg a bázisok módosításának elsődleges célja a SELEX sikerességének, valamint az aptamer-ligand kötés erősségének növelése, de az ilyen módosításokkal előállított aptamerek gyakran a nukleázoknak is jobban ellenállnak (17. ábra) [182].



17. ábra Az aptamereket alkotó nukleotidok leggyakoribb módosításai.

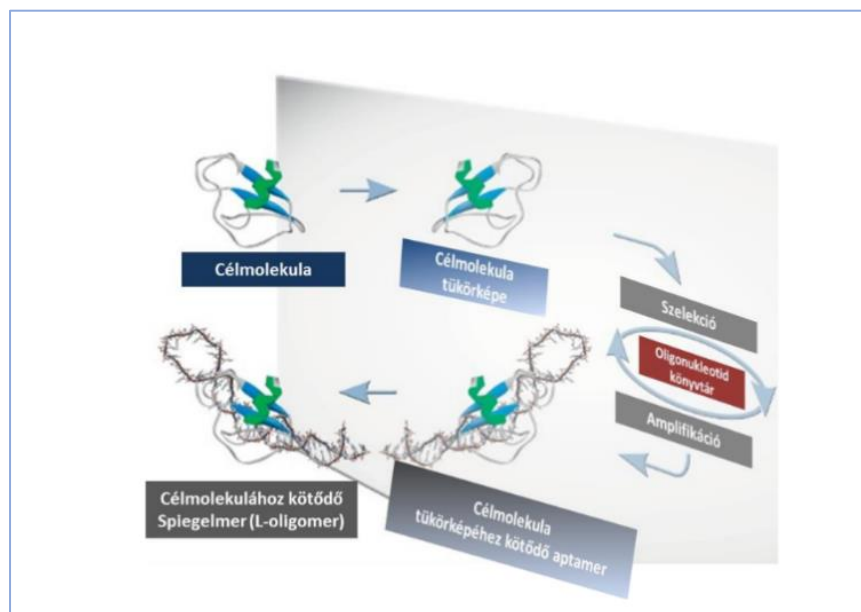
A módosított nukleotidokat beépíthetjük az aptamerekbe szelekciójukat követően, illetve kivitelezhetjük a szelekciót módosított nukleotidokkal, ezek alapján beszélünk post-és pre-SELEX módosításról [183]. Az első, módosított nukleotidokat tartalmazó aptamereket a post-SELEX módszerrel állították elő, de e megközelítés jelentősége – az alábbiakban részletezett okokból kifolyólag – csökkent [184]. A post-SELEX-szel kapcsolatos legkomolyabb nehézség, hogy a módosítás hatása az aptamer-célmolekula komplex röntgenkristallográfiával vagy mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) részleteiben feltárt szerkezetének ismerete nélkül megjósolhatatlan, és szélsőséges esetben az aptamer akár teljesen el is veszítheti ligandkötő-képességét. Az

aptamer-ligand komplex valós szerkezetének leírása rutinszerűen nem megvalósítható, így a post-SELEX aptamer módosítás jórészt próba-szerencse eljárás. A post-SELEX módszer nehézségeire jó példa a korábban említett Macugen, melynek esetében az aptamer szelekcióját követő módosítások éveket vettek igénybe [185]. A pre-SELEX aptamer módosítás mindezeket a nehézségeket kiküszöböli, azonban olyan DNS polimerázokat igényel, amelyek nagy hűséggel képesek beépíteni a megváltoztatott nukleotidokat. Ezeknek a követelményeknek a korábbi kísérletek alapján néhány B típusú DNS polimeráz felelhet meg a legjobban [186].

A foszfátcsoportot érintő módosítások tulajdonképpen az egyik, észterkötés kialakításában nem érintett oxigén kénre vagy metilcsoportra történő cseréjét jelentik, melynek nyomán a nukleázoknak jobban ellenálló foszforotionát, illetve metilfoszfonát csoportok keletkeznek. Az oxigén helyettesítésével kapcsolatos hátrány, hogy a módosítás az aptamerekben gyakran előforduló G-quadruplex struktúra csökkent stabilitásával jár együtt, így végső soron a SELEX sikerét kockáztatja. Ez a tény magyarázhatja, hogy a módszer kevésbé elterjedt, mindössze néhány tucat foszforotionátot, illetve metilfoszfonátot tartalmazó aptamer ismert a szakirodalomban [187]. A ribózt érintő modifikációk a reaktív 2'-OH csoport eliminálására irányulnak, melynek során a hidroxil helyére amino- vagy o-metilcsoport, illetve fluor kerül. A három variáns közül a fluorral módosított aptamerek a legelterjedtebbek, mivel a metilcsoporttal rendelkező nukleotidokat a DNS polimerázok nem fogadják el szubsztrátként, így a SELEX-ben nem alkalmazhatók. A fluor- és aminocsoport-tartalmú oligonukleotidok szintézise közül pedig az előbbié költséghatékonyabb [188]. Az ún. zárt nukleotidok (locked nucleic acid LNA) beépítése az aptamerek nukleázrezisztenciája mellett a kialakuló kettősszalú régiók stabilitását is növelik, így több szempontból alkalmas jelöltnek tűnnek módosított aptamerek szintézisére. Vonzó tulajdonságaikat ellensúlyozza az a megfigyelés, hogy az LNA nukleotidok – melyekben a ribóz 2'O és 4'C atomját egy metilén-híd köti össze – nem optimális szubsztrátjai az RNS és DNS polimerázoknak, bizonyos nukleinsav-szekvenciák hatékonyabban szintetizálódnak, így e nukleotidok alkalmazásával torzul a SELEX folyamata [189].

A fentiekben taglalt módosítások változó mértékben növelik az aptamerek nukleázokkal szembeni ellenállóképességét, de egyik sem nyújt teljes rezisztenciát. A nukleázok támadásának teljes mértékben ellenálló aptamerek fejlesztésének koncepciója azon alapul, hogy a királis molekulák kölcsönhatása sztereospecifikus, így a természetes nukleinsavakban található D-cukrok L enantiomer párját tartalmazó oligonukleotidok a nukleázok számára felismerhetetlenek. Az elképzelés helytállóságát Klussmann és mtsai. D-adenozinhoz specifikusan kötődő L-RNS molekulák szelektálásával demonstrálták [190]. A szerzők ezen új típusú aptamereket spiegelmer névvel illeték, és igazolták róluk, hogy affinitásuk a D-adenozinhoz közel négy nagyságrenddel nagyobb, mint annak enantiomerjéhez, valamint humán szérumban történő hatvanórás inkubálást követően sem degradálódnak. A gyakorlatilag teljes nukleázrezisztenciát még egyértelműbben igazolták a vazopresszinre szelektál spiegelmerekekkel kivitelezett mérések, melyek szerint még a tisztított nukleázt tartalmazó oldatban történő tíznapos inkubáció sem eredményezte a spiegelmer koncentrációjának csökkenését [191].

Az eddig leírtakból talán nem egyértelműen világlik ki, hogy a spiegelmerekkel kapcsolatban egy súlyos nehézség is felmerül, ugyanis, miként a nukleázok, úgy a polimerázok sem ismerik fel a természetes nukleotidok enantiomerjeit, így a SELEX-et a polimerázokkal amplifikálható, D-nukleotidokból álló oligonukleotid-könyvtárral, a felismerendő ligand enantiomerjét célmolekulaként használva kell kivitelezni (18. ábra).



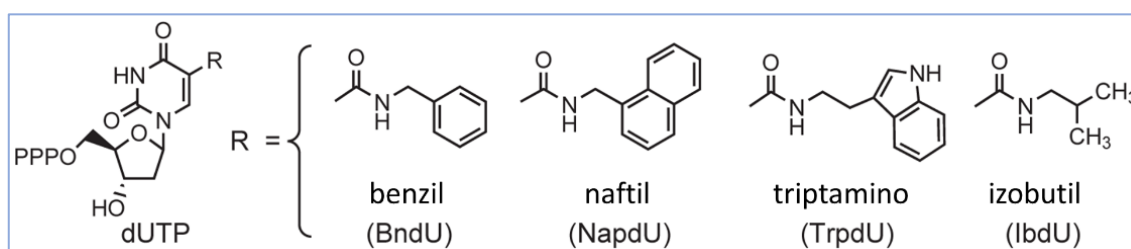
18. ábra A spiegelmerszelekció elvi alapja.

Ez a reciproknak tekinthető SELEX két okból jelent problémát: i.) Mivel a szelekció spiegelmer célmolekulájának enantiomerjét igényli, a kémiai fehérjeszintézis korlátai miatt fehérjékre körülményes a spiegelmerszelekció. ii.) A korábbiakban látható volt, hogy a SELEX-ből származó aptamerjelöltek közül egyedi karakterizálással azonosíthatók a legígéretesebb jelöltek. Ezen lépés megvalósítását súlyosan behatárolja a spiegelmer szintézis rendkívül magas költsége. Az elsőként megjelölt hátráltató tényezőt jól magyarázza, hogy szinte az összes spiegelmert kismolekulára, illetve peptide szelektálták [192]. A szakirodalomból két fehérjére szelektív spiegelmer ismert, melyek közül a kisebb méretű szelekciójához, a 110 aminosavból álló ribonukleáz D-aminosavakból álló enantiomerjét két részletben megszintetizálták, így adott volt a SELEX célmolekulája [193]. A kétszeres méretű, mintegy 28 kDa nagyságú bakteriális enterotoxinra szelektív spiegelmer izolálásánál ez a megközelítés nem volt járható, mert az ilyen méretű fehérjék kémiai szintézise praktikusán nem megvalósítható. A szerzők által kidolgozott, ún. domén eljárás alapjául az a megfigyelés szolgál, hogy az aptamerek – hasonlóan az ellenanyagokhoz – a fehérjéknek egy adott aminosavszekvencia-motívumán keresztül alakítják ki a kölcsönhatást, így ahogy fehérjeszelektív ellenanyagok generálhatók a megfelelően megválasztott peptidekre, úgy aptamerek is szelektálhatók a kérdéses fehérjét reprezentáló aminosav-motívumra [194]. Az elgondolásnak megfelelően a fehérje egy 25 aminosavból álló peptidszakaszának D enantiomerjét megszintetizálták, majd ennek segítségével hajtották végre a SELEX-et [195]. Habár a szelekció sikeres volt, a spiegelmer-fehérje komplex disszociációs konstansa a fehérje-aptamer komplexnél elvártnál magasabbnak, 420 nM-nak adódott. A

spiegelmerrel kapcsolatos kutatások és fejlesztések jelenleg szinte kizárólag a Noxon Pharma vállalathoz köthetők, a kifejlesztett spiegelmereik közül több is lehetséges tumorterápiás szerként különböző klinikai fázisban van [196].

A bázisaikban módosított nukleotidokban – összevetve természetes megfelelőikkel – a pirimidinek esetében a C5, míg purinoknál az N7 pozícióban figyelhetünk meg eltéréseket (17. ábra). Ezen módosítások népszerűségének oka két tényezőben keresendő, nevezetesen ezeket az eltéréseket bizonyos polimerázok tolerálják, és beépítik a szintetizálódó nukleinsavba, illetve az ezen pozíciókban megjelenő extra csoportok be tudnak illeszkedni a kettős hélix nagy árkába [197]. A bázisokat érintő módosítások meglehetősen sokszínűek, legtöbbjük a nukleotidoknak aminosav jellegű tulajdonságokat kölcsönöz. Mindezek közül csak a legsikeresebbek, a SELEX-et leíró Gold nevéhez köthető ún. SOMAmerek (Slow off modified aptamerek) kerülnek a dolgozatban ismertetésre [177].

A kutatócsoport a nukleotidok módosítása során abból a megfigyelésből indult ki, hogy az ellenanyagok leggyakrabban aromás oldalláncokkal rendelkező aminosavaikon keresztül lépnek kölcsönhatásba az antigénnel [198]. Ennek megfelelően, növelendő a SELEX sikerrátáját, olyan uracilváltozatokat szintetizáltak, amelyek az N7 helyen benzil, naftil, triptamino, illetve egyetlen nem aromásként izobutilcsoportot hordoztak (19. ábra).



19. ábra A SOMAmereket alkotó módosított nukleotidok szerkezete [177].

Hipotézisük igazolásra 13 olyan fehérjét jelöltek meg a SELEX célmolekulájaként, amelyekre többszöri próbálkozással sem sikerült aptamert izolálni. Az uracil-módosulatokkal eltérő eredményeket kaptak, egyes változatok más-más fehérjével vezettek sikeres szelekcióra. A triptamin azonban kiemelkedően teljesített, alkalmazásával mind a 13 vizsgált fehérjére sikerült megfelelő aptamer izolálni. A feltételezés helytállóságát az SOMAmer-fehérje komplexek szerkezeti vizsgálatai is igazolták, ugyanis a kölcsönhatás kialakításában a vizsgált komplexek mindegyikében központi szerepet kaptak a módosított nukleotidok [199]. A Gold által vezetett kutatócsoport egy további fontos módosítást is bevezetett a SELEX protokollba, nevezetesen dextranszulfátot alkalmazott a mosási lépések során, mellyel szignifikánsan csökkent a nem specifikusan kölcsönható oligonukleotidok száma, illetve megnőtt az izolált aptamerek affinitása [200]. Mindezen módosításoknak és fejlesztéseknek köszönhetően mára már több mint 7000 humán fehérjére szelektív SOMAmer létezik, és ezek döntő részének disszociációs konstansa kisebb, mint 1 nM, mely érték messze alatta van a természetes nukleotidokat tartalmazó aptamerek esetén mértéknél [201]. A SOMAmerekben rejlő lehetőségeket jól bizonyítja fehérjechipen, ún. SOMAScan-en történő alkalmazásuk. A SomaLogic által forgalmazott csipet patológiás elváltozások

tucatjainál használták az adott testfolyadék proteomjában bekövetkező változások nyomon követésére. Az eljárás robusztusságát az a tanulmány illusztrálja legszebben, amelyben a genom és a plazmaproteom közötti asszociációt kutatták. A kísérlethez 3301 egészséges ember 150 µl-nyi plazmáját használták, és ezzel nyolc nagyságrendnyi tartományban kvantifikáltak 3622 fehérjét [202]. Az újabb SOMAmereket folyamatosan szelektálják, jelenleg már több mint 7000 fehérje szimultán mérésére alkalmas SOMAscan is elérhető. A módszer általános elterjedésének akadálya, hogy a vállalat üzletpolitikájának következtében sem a fehérjéket felismerő SOMAmereket, sem a SOMAscan technológiához szükséges vegyszereket és műszereket nem forgalmazzák. A vizsgálandó mintákat a vállalat központi laboratóriumába kell eljuttatni, ahol a teljes munkafolyamatot – az adatfeldolgozással bezárólag – kivitelezik. Ennek eredményeként a SomaLogic egy folyamatosan növekvő, patológiás elváltozásokra vonatkozó, üzleti stratégiájuk részét képező fehérje-adatbázissal rendelkezik. Megjegyzendő, a SOMAscan magas költsége és komplex mintafeldolgozási protokollja következtében az előbbi akadálytól eltekintve sem alkalmas rutindiagnosztikára.

3.5. Kardiális troponinokra szelektált aptamerek

A szívizomban található három tropinin közül mindkét szövetre specifikus izoformára, azaz cTnI-re és cTnT-re is szelektáltak aptamereket. A cTnI-t felismerő aptamerek két kutatócsoport, szinte egy időben megjelenő közleményeiben kerültek nyilvánosságra. Az elsőként publikált cTnI aptamerek szelekciójához nem feltüntetett eredetű cTnI fehérjét biotiniláltak és használtak célmolekulaként sztreptavidin gyantára történt immobilizációját követően [203]. A kontra SELEX lépésben cTnT-ét és troponin C-t használták, és a szelekciót követően is ezzel a két fehérjével demonstrálták az izolált aptamerek specificitását. A célmolekula legközelebbi homológjait, a vázizom troponin I-eket semmilyen formában nem alkalmazták kísérleteikben, így a prezentált aptamer szelektivitása megkérdőjelezhető. Ezt a feltételezést alátámasztja a publikációban bemutatott dot blot eredmény, ahol is az arany nanorészecskével jelölt aptamerük a cTnI-t nem tartalmazó vérplazma mintával is intenzív jelet adott. A közleményben ismertetett aptamerek további alkalmazására utaló adat nem található a szakirodalomban.

A néhány hónappal később közölt szelekció célmolekulája mágneses gyöngyön immobilizált, baktériumban előállított cTnI volt, és ez a laboratórium nem iktatott be kontra SELEX lépést [204]. Az SPR mérések alapján az aptamerek kiemelkedő, nM körüli disszociációs konstans értékkel rendelkeztek, és a monomer troponin mellett a komplex kötésére is képesek voltak. Az aptamerek szelektivitását igazoló kísérletek azonban ebben az esetben is kívánnivalót hagynak maguk után, ugyanis a vizsgált fehérjék között itt sem találjuk sTnI-t, és vérszérumban vagy plazmában sem végeztek méréseket. Habár az eredeti közleményben bemutatott eredmények nem zárták ki az aptamerek keresztreaktivitását, azóta több tucat közlemény igazolta vérplazmában való alkalmazhatóságát, minek alapján feltételezhetjük az aptamer szelektivitását.

A cTnT szelektív aptamerek használatát ismertető közlemények mindegyikében biotechnológiai vállalatól beszerzett aptamereket találhatunk, így azok előállításáról,

szelektivitásáról nem áll rendelkezésre információ [205] [206][207]. A vásárolt aptamerekkel változatos metodikai fejlesztéseket hajtottak végre és demonstrálták a mezőhatás-tranzisztor, a ciklikus voltammetria és a differenciál impulzus voltammetria rendszerekben történő alkalmazhatóságukat.

Érdekes módon az egyetlen laboratóriumunkban azonosított cTnT aptamer tumoros endotél sejtekkel kivitelezett sejt-SELEX eredménye [208]. A szelekció nyomán kapott aptamerekkel affinitástisztították a teljes fehérjekivonatot, és az aptamerekhez kötődő fehérjék között tömegspektrometriával azonosították a cTnT-t. Ezt az eredményt mRNS- és fehérje-expressziós adatokkal is megerősítették, minek alapján a szerzők az endotél sejtek felszínén megjelenő cTnT-t mint lehetséges tumormarkert javasolják.

A fentiek alapján kijelenthető, hogy a kardiális troponinokra szelektív aptamerek vizsgálata egy intenzíven kutatott terület, és a munkák szinte teljes egészében az aptamerek használatára koncentrálnak, a diagnosztikai alkalmazásig azonban még egyik módszer sem jutott el.

3.6. Vírusokra szelektált aptamerek

Amint az egy korábbi fejezetben már látható volt, a vírusfehérjék ellenanyagok segítségével történő azonosítása a vírusdiagnosztika egyik leggyakrabban alkalmazott módszere, így nem meglepő, hogy számos kutatócsoport érdeklődése fordult az antitesteknél egyszerűbben, költséghatékonyabban előállítható és alkalmazható, egyes vírusokra szelektív aptamerek irányába. Az intenzív kutatások különböző vírusokra szelektív aptamerek százait eredményezte, tulajdonképp minden humán patogén vírusra kiviteleztek aptamerszelekciót [209]. Ennek fényében a dolgozatban nem teszünk kísérletet az egyes aptamerek bemutatására és katalogizálására, csak néhány olyan példa kerül ismertetésre, amely jól reprezentál egy-egy vírusszelektív aptamer izolálására alkalmas SELEX variánst.

Az ide vonatkozó közlemények döntő részében a klasszikus SELEX módszer alkalmazását találjuk, azaz a vírusfehérjék immobilizálásával kivitelezett szelekció vezetett az aptamerek izolálásához. Ezzel a megközelítéssel a humán immundeficiencia-vírus (HIV) és humán papillomavírus (HPV) összes fehérjéjére sikeresen szelektáltak olyan DNS és RNS aptamereket, melyek változó eredményességgel gátolták a vírusok sejtfertőző képességét, illetve replikációját [210].

A másik legelterjedtebb vírus aptamerszelekciós eljárást akár vírus-SELEX-nek is nevezhetnénk, hiszen ugyanazt a logikát követi, mint a sejt-SELEX, attól annyiban eltérve, hogy sejtek helyett teljes vírusok szolgálnak célmolekulaként. A megközelítésben rejlő lehetőségeket elegánsan illusztrálja egy Gopinath és mtsai. által jegyzet közlemény, amelyben az A típusú influenza H3N2 altípusának törzsei között differenciáló RNS aptamereket írtak le [211]. A megfelelő vírustörzsszel kivitelezett kontra-SELEX-nek köszönhetően az aptamerek diszkriminációs képessége magas affinitással is kiegészül, a mérések szerint a legjobb aptamer tizenötször jobban kötődik a vírushoz, mint a vizsgált monoklonális antitest.

A sejt-SELEX egy továbbfejlesztett változatát, az ún. CS-SELEX-et (cell-surface-SELEX) hepatitis C vírust (HCV) felismerő aptamerek szelekciójára alkalmazták

sikeresen. A módszer alapját egy, a felszínén a HCV E2 fehérjét kifejező sejtvonal adja, mely segítségével tulajdonképpen egy sejt-SELEX került kivitelezésre, és vezetett HCV-ére specifikus aptamerek azonosításához [212].

A vírusokra szelektív aptamerek izolálásánál is találhatunk immobilizálást nem igénylő eljárásokat, úm. a korábban már ismertetett CE-SELEX-et, illetve a grafén-oxid-SELEX-et (GO-SELEX). Kapilláris elektroforézissel kontra-SELEX nem kivitelezhető, így a CE-SELEX csak nagy tisztaságú célmolekulával valósítható meg. Mindezek eredőjeként teljes vírusra nem, csak vírusfehérjékre szelektált aptamereket sikerült izolálni ezzel a módszerrel. A madárinfluenza vírus H9N2 törzsének HA fehérjéjére szelektált aptamerek alkalmasak voltak a vírus fluoreszcens jelölésére, és sejt kultúrák vírusinfekcióját is gátolták [213].

A GO-SELEX használata tulajdonképpen egyetlen koreai kutatócsoporthoz köthető. Az eljárást valójában helyesebb reverz immobilizálást igénylőnek, mint immobilizálás nélkülinek titulálni, ugyanis a szelekció során a grafén-oxidból készült nanolemezhez pi-pi elektron kölcsönhatásokon keresztül az aptamerek kapcsolódnak, míg a célmolekulák oldatban vannak. Az oligonukleotidok a célmolekulával történő kölcsönhatás nyomán megváltoztatják konformációjukat, minek hatására leválnak a nanolemezről, így az oldatba kerülő oligonukleotidok képviselik a célmolekulára szelektív aptamereket [214]. A kutatócsoport a GO-SELEX segítségével eddig két vírusra szelektált aptamereket, úm. szarvasmarha vírusos hasmenés vírusra (BVDV) és madárinfluenza H5N2 törzsére [215] [216]. A módszerbe könnyen beilleszthető kontra-SELEX lépésnek köszönhetően a vírustörzsek között differenciálni képes, a detektálandó vírushoz magas affinitással rendelkező aptamereket eredményezett mindkét szelekció. Külön kiemelendő, hogy mindkét GO-SELEX esetében olyan aptamerpárokat is sikerült azonosítani, amelyek egyszerre képesek kötődni a vírushoz.

Napjainkban megjelenő aptamerekkel kapcsolatos szakirodalom többsége a különböző bioszenzorokban történő alkalmazásukat írja le, ezzel összhangban a vírusszelektív aptamerek jelentős része is az ilyen irányú fejlesztésekben jelenik meg. Tulajdonképpen a bioszenzorok minden típusára (optikai, tömeg, és elektrokémiai változásokat mérő módszerek) találhatunk példát az aptamereken alapuló vírusdiagnosztikai kutatásokban [217]. Ezek közül az optikai bioszenzorok legegyszerűbben és legolcsóbban kivitelezhető változatát, az LFA-t érdemes kiemelni. A GO-SELEX-szel nyert madárinfluenza-specifikus aptamerpár jelentőségét a kutatócsoport egy olyan LFA kifejlesztésével demonstrálta, amely alkalmas a vírus kacsaszékletben történő azonosítására. A bemutatott LFA kiértékelése szabad szemmel kivitelezhető, érzékenysége pedig összevethető a kereskedelmi forgalomban elérhető, antitest alapú vírusdetekciós LFA készletekével [216]. Az LFA vírusfertőzött mintákon történő használatára további példa a halakat megbetegítő idegi nekrozis vírus kimutatására kidolgozott rendszer. A mérési rendszer elrendezése megegyezik az előző példában alkalmazottal, amennyiben a befogó aptamer biotinjelölt, így sztreptavidinen keresztül immobilizálható a membránra, a detektáló aptamer arany nanorészecskével történt módosítása pedig a szabad szemmel való kiértékelést teszi lehetővé [218]. Az LFA érzékenysége az arany nanorészecske fluoreszcens festékre cserélésével több mint egy nagyságrenddel növelhető, de az értékelés komplexebb, mivel fluoreszcens leolvasót

igényel. A fluoreszcens jelölés alkalmazásával olyan LFA-át hoztak létre, amely az influenza A vírus H1N1 altípusának törzseit képes detektálni klinikailag releváns koncentrációknál, akár garatkenet-mintákban is [219]. A vírudetektálásra alkalmas LFA rendszereket bemutató közlemények szinte kizárólag az utóbbi években jelentek meg, így minden bizonnyal csak a kezdeteit látjuk a megközelítés alkalmazásának. Figyelembe véve az LFA egyszerű kivitelezését és alacsony költségét valószínűsíthetjük, hogy validált, kereskedelmi forgalomban elérhető változatai is hamarosan megjelennek.

4. Célkitűzések

Munkánk kezdetekor az aptamerkutató megthonosítása, illetve az aptamerek diagnosztikai alkalmazásának vizsgálata volt az elsődleges célunk, az aptamerszelekciós kísérleteink során azonban megoldásra váró technikai nehézségekkel is szembeesültünk, így feladataink metodikai fejlesztésekkel is kiegészültek, eredeti célkitűzéseink ennek megfelelően módosultak. Céljaink pontokba szedve az alábbiakban összegezhetők:

1. A fehérjékre specifikus aptamerszelekció fehérjeigényének gyors és költséghatékony biztosítása *in vitro* transzlációval.

A búzacsíra fehérjekivonaton alapuló transzlációs rendszer alkalmazhatóságának vizsgálata. A fehérjék gyorsabb és hatékonyabb előállítását a rendszerhez rendelkezésre álló vektorok továbbfejlesztésével.

2. Az aptamer-fehérje kölcsönhatás kimutatására alkalmas homogén mérési rendszer optimalizálása.

Az ALPHA módszer alkalmazhatóságának vizsgálata, illetve optimalizálása aptamer-fehérje kölcsönhatások mérésére.

3. Nagyszámú aptamerjelölt szűrésére alkalmas egyszálú DNS-t biztosító eljárás kifejlesztése.

A primer blokkolt aszimmetrikus módszer kifejlesztése, ALPHA módszerben történő alkalmazhatóságának vizsgálata.

4. Módosított nukleotidot tartalmazó aptamerkönyvtár létrehozása.

Módosított nukleotid beépítésére alkalmas hőstabil DNS polimeráz azonosítása, majd annak alkalmazásával létrehozott aptamerkönyvtár paramétereinek vizsgálata.

5. Kismolekulára szelektív aptamerek előállítása és alkalmazása.

Ochratoxin A-t felismerő aptamerek szelekciója, specifitásuk és alkalmazhatóságuk vizsgálata.

6. ASPV-szelektív aptamerek izolálása és alkalmazása.

Aptamerek szelekciója a különböző ASPV vírustörzsek burokfehérjeire. Az aptamerek alkalmazása western és dot blot, valamint ELISA eljárás során. Teljesen aptamerekre alapuló, víruskimutatásra alkalmas ELONA kifejlesztése.

7. RSV-szelektív aptamerek izolálása és alkalmazása.

Inaktivált, teljes vírustörzsekre kivitelezett aptamerszelekció. A szelektált aptamerek felhasználása ALPHA rendszerben a vírus klinikailag releváns koncentrációban és mintában történő kimutatására.

8. cTnI fehérjét szelektíven felismerő spiegelmerek izolálása és alkalmazása szendvics típusú mérési rendszer fejlesztéséhez.

A cTnI megfelelő epitópjaira specifikus spiegelmerek szelekciója és szűrése. A legkedvezőbb paraméterekkel rendelkező spiegelmerpár alkalmazásával cTnI kimutatására alkalmas ALPHA kifejlesztése.

5. Anyagok és módszerek

A bemutatott kísérletek döntő részében a molekuláris biológiában rutinszerűen használt metodikákat alkalmaztunk, így ezek általános leírása nem járulna hozzá a dolgozat jobb értelmezhetőségéhez, a kísérletek reprodukálhatóságát lehetővé tévő minden részletre kiterjedő ismertetésük pedig messze túlmutatna a dolgozat keretein, ezek az adottak a hivatkozott közleményekben találhatóak meg. Kutatási feladataink jelentős része módszertani fejlesztéseket is magában foglalt, ezek értelemzhetőségét megkönnyítendő, az alkalmazott eljárások lényegi pontjai az „Eredmények és értékelésük” fejezetben kerülnek feltüntetésre. E tényezők figyelembevételével itt csak két, általános laboratóriumokban kevésbé, kutatócsoportunkban viszont szinte napi szinten alkalmazott módszert ismertetek.

1. mRNS előállítása in vitro transzkripcióval

A transzkripció hatékonyságát növelendő, a szintetizálandó fehérje stop kodonjától mintegy 1600 bp távolságra található *NotI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyet kihasználva linearizáljuk a vektorkonstrukciót.

Plazmid linearizáció: 5 µg plazmidot, 5 µl (50 U) *NotI* enzimet, 5 µl 10x FastDigest puffert (Thermo Fischer Scientific), 50 µl végtérfogatra kiegészítünk desztillált vízzel, majd 1 órát inkubáljuk 37 °C-on. A hasítási reakciót követően PEG PCR Clean Up eljárás szerint kicsapott plazmidot 10 µl nukleázmentes vízben oldjuk fel.

In vitro transzkripció: A reakcióelegyet jégen RN-ázmentes körülmények között készítjük elő. A transzkripció elegyet (1 µg linearizált plazmidot, 8 µl 400 mM NTP keveréket, 4 µl 5x TranscriptAid Reaction Buffer-t, 2 µl TranscriptAid Enzyme mix-et, 20 µl-re kiegészítve DEPC kezelt vízzel (TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit)) 2 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on. A fehér csapadékot formáló magnézium-pirofoszfát megjelenése a reakció sikerességét jelzi.

Az mRNS kicsapásához 55 µl 7,5 M ammónium-acetátot, 875 µl előhűtött abszolút etanolt és 330 µl nukleázmentes vizet adunk a reakció elegyhez. Összekeverés után 15 perces jégen történő inkubáció, majd 15 perces 4 °C-on 13000 rpm-en kivitelezett centrifugálás következik. A csapadékra 1 ml előhűtött abszolút etanolt pipetázunk, a csövet néhányszor átfordítjuk, majd 15 percig azonos körülmények között centrifugáljuk. Az etanolt eltávolítjuk, a csapadékot pedig 5 percig szárítjuk, majd 21 µl 1x SUB-AMIX oldatban (CellFree Sciences) felfuszpendáljuk. A SUB-AMIX oldatot mindig frissen készítjük el a 40x S1, S2, S3 és S4 törzsoldatokból.

Az mRNS minőségének ellenőrzéséhez 1 µl mintát 0,8%-os agaróz gélen elválasztunk.

2. Fehérjeszintézis in vitro transzlációval

Az *in vitro* transzlációhoz használt ENDEXT Technology Wheat Germ Cell-Free Expression System készlet (CellFree Sciences) komponenseit jégen olvasztjuk fel. A gyártó utasításai szerint steril 96 kamrás mikrotiter lemezbe 206 µl 1x SUB-AMIX oldatot pipetázunk, majd 20,8 µl végtérfogatban összemérjük a transzlációs elegyet (5 µl (15 µg)

mRNS, 10 µl WEPRO oldat (búzacsíra translációs elegy), 0,8 µl kreatin-kináz és 5 µl 1x SUB-AMIX oldat). A translációs elegyet buborékképzés nélkül óvatosan szuszpendáljuk, majd a mikrotiter lemezen előkészített tápláló oldat alá rétegezzük. A párolgást elkerülendő öntapadós fóliával leragasztjuk a kamrákat. A translációs reakciót 20 órán át 20 °C-on szigorúan mozdulatlanul inkubáljuk. A homogénné vált, célfehérjét tartalmazó translációs elegyet Eppendorf csöbe pipetázzuk, majd a további felhasználásig jégen tároljuk. A transláció eredményességét 5 µl totál translációs elegy SDS-PAGE-n történő elválasztását követően Coomassie-kék festéssel, illetve 1 µl elválasztásával western blottal ellenőrizhetjük.

3. ASPV burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója

A szelekció során mintegy 10^{14} féle nukleotidszekvenciát tartalmazó, 1 nmólnyi HPLC-vel tisztított oligonukleotid-könyvtárból indulunk ki. A könyvtárt alkotó oligonukleotidok két rögzített szekvenciájú, 18 nukleotid hosszúságú primerkötő része egy random nukleotidból álló, 40 bázisnyi szakaszt fog közre: 5'-agcctcgtctgttctccc-40N-gggaagacaagcagacgt-3'.

A szelekcióhoz 1 nmol DNS-t tartalmazó oligonukleotid-könyvtárat 100 µl PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal hígítunk, 95°C-on inkubáljuk 2 percre, majd azonnal jégre tesszük, hogy az esetleges DNS-hibrideket denaturáljuk illetve újraformálódásukat megakadályozzuk. Ezt követően az oldatot kiegészítjük 9,9 ml 0,1 µg/ml dIdC-t és 1 µg/ml BSA-t tartalmazó PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal. A létrejött oldatot 30 µl, körülbelül 300 pmol PSAH, vagy MT32 fehérjét tartalmazó Ni-NTA HisBind agaróz affinitáskromatográfiás gyantával inkubáljuk 30 percen keresztül szobahőmérsékleten enyhe rázatással. A gyengén vagy egyáltalán nem kötődött DNS-szekvenciákat háromszori, 1 ml PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal történő mosással távolítjuk el. A fehérjét és az ahhoz kötődött oligonukleotidokat 20 µl 500 mM imidazolt tartalmazó 20 mM Tris pH 8,0 oldattal eluáljuk a gyantáról, és templátként használjuk PCR során.

A 100 µl térfogatú PCR elegy összetétele a következő: 20 µl templát, 10 µl 10x Reaction Buffer, 1,5 U Taq polimeráz, 1-1 µM SELF és biotinilált SELR primerek, 0,865 mM dNTP és 1,5 mM MgCl₂ ultra tiszta vízzel kiegészítve. Az elegyet két PCR csöbe szétosztjuk, és a következő program szerint amplifikáljuk az oligonukleotidokat: 2 perc 95°C, majd 18 cikluson keresztül 30 másodperc (mp) 95°C, 30 mp 56°C, 30 mp 68°C, és végül 2 perc 68°C. A keletkezett termékből 5 µl-t 2,5%-os agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőrizzünk.

Az ellenőrzést követően a maradék 90 µl PCR termékhez 23 µl 5 M-os NaCl oldatot adunk, kétfelé osztjuk, és Reacti-Bind sztreptavidin-módosított mikrotiter tálca 1-1 cellájában inkubáljuk egy órán keresztül. Az inkubáció végeztével a felülúszót eltávolítjuk, és a cellákat háromszor 1 ml PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal mossuk. A biotint nem tartalmazó DNS szálakat ezután 30 µl/cella frissen készített 100 mM NaOH oldattal eluáljuk az immobilizált komplementer szálakról. Az eluált oligonukleotidokat tartalmazó oldatot begyűjtése után azonnal neutralizáljuk 1 ml 1,5 µl 1 M NaH₂PO₄ oldattal kiegészített PBS-0,05% Triton-X 100 oldat hozzáadásával. Az így előállított elegyet 95°C-on 5 percre inkubáljuk, jégen lehűtjük, és felhasználjuk a SELEX következő ciklusában.

A szelekciós nyomást növelendő, a SELEX további ciklusait azonos körülmények között, de csökkenő fehérjemennyiséggel végezzük. A 2-9 ciklusban 150 pmol-t, a 10-15 ciklusban 100 pmól fehérjét használunk fel a szelekcióhoz. A szelektál oligonukleotidok specificitását kontraszelekciós lépések beiktatásával is fokozzuk, úm. 3., 6., 9. ciklus után nyert PSAH, illetve MT32 specifikus oligonukleotid tartalmazó elegyet rendre 15 µl Ni-NTA HisBind agaróz affinitáskromatográfiás gyantához kötött MT32, illetve PSAH fehérjével 30 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk enyhe rázatással, és a gyantához nem kötődő oligonukleotidokat visszük tovább a következő SELEX ciklusba.

A legutolsó ciklust követően a PCR elegyben biotin-mentes reverz primert alkalmazunk, és a keletkezett termékből 4 µl-t T/A klónozással p-GEM-T-easy vektorba inszertálunk. A ligálási eleggyel DH5α kompetens *E. coli* sejteket transzformálunk. A felnőtt telepekből 20-20 darabot ellenőrizünk a vektorra specifikus M13 forward és reverse primereket tartalmazó kolónia PCR-rel. A keletkezett PCR termékből 5-5 µl 2,5%-os agaróz gélelektroforézissel elválasztunk. A megfelelő mérettel rendelkező elegyek maradék 45 µl-ből PEG PCR Cleanup pufferral kitisztítjuk a terméket. A tisztított terméket M13 promóter primerekkel szekvenáltatunk, és az így nyert aptamerszekvenciákat Clone Manager program alkalmazásával vizsgáljuk.

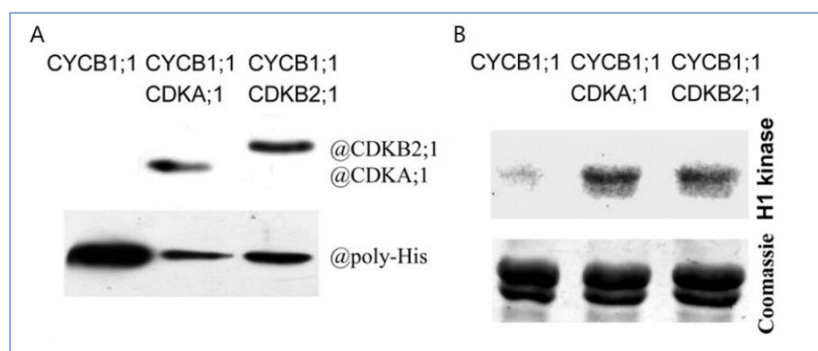
6. Eredmények és értékelésük

1. Fehérjetermelés *in vitro* transzlációval

1.1. A búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszer alkalmazása és továbbfejlesztése

Első *in vitro* transzlációs kísérleteink célja az *Arabidopsis* Ciklin B1 (Arath CYCB1;1) és A és B típusú CDK (Arath CDKA;1 and CDKB2;1) fehérjék közötti lehetséges kölcsönhatások vizsgálata volt. Amint az már korábban tárgyalásra került, az eukarióta fehérjék termelése *E. coli* sejtekben sok esetben sikertelen, illetve nagyon kis hatékonyságú, és a megfigyelések szerint a ciklin, CDK fehérjék is ezekbe a kategóriákba esnek. A probléma áthidalására, az enzimatikusan aktív ciklin-CDK komplexek baktériumban történő előállításához egy, két fehérje kódolására alkalmas vektort fejlesztettek – mellyel a CDK-t és annak foszforilálásáért felelős kinázt fejeztették ki –, és egy további, ciklint kódoló plazmiddal együttesen transzformálták a sejteket, majd optimalizálták a fehérjetermelés körülményeit [220]. Habár sikeresen állították elő a kinázaktivitás-méréshez elegendő mennyiségű fehérjét, az eljárás rendkívül munka- és időigényesnek bizonyult.

Ezen eredmények tudatában úgy döntöttünk, megvizsgáljuk, hogy a búzacsíra fehérjekivonaton alapuló *in vitro* transzlációs rendszer mennyiben alkalmazható a nevezett fehérjék előállítására. A kérdéses fehérjéket kódoló szekvenciákat cDNS könyvtárból amplifikáltuk, oly módon, hogy a ciklin esetében alkalmazott primer a megfelelő restrikciós endonukleáz helyek mellett az affinitástisztításra alkalmas His₆ régiót is tartalmazza. A PCR-fragmentek és a pEU3N-II vektor megfelelő restrikciós endonukleáz kezelést követően ligálással létrehoztuk a vizsgálandó fehérjéket kódoló vektorokat. A létrejött vektorokat templátként használva *in vitro* transzkripcióval előállítottuk az mRNS-eket, melyeket az *in vitro* transzlációs rendszerhez adtunk. A homogén transzlációs elegy éjszakán át történő inkubációját követően Ni-agaróz gyönggyel izoláltuk az Arath CYCB1;1-et és az ahhoz kötődő fehérjéket.



6.1. ábra *Arabidopsis* ciklinek és CDK-k kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro* transzlációval.

Az *in vitro* transzlált fehérjék a jelzett módon történt összekeverésüket követően Ni-agaróz gyönggyel kerültek tisztításra és immunoblot analízisre a membrán mellett jelzett ellenanyagokkal (A), illetve *in vitro* kinázaktivitás-mérésre mielin bázikus fehérje szubsztrát alkalmazásával (B) [221].

Az ily módon kapott minták immunoblot analízise bizonyította, hogy a ciklin mindkét vizsgált kinázzal kölcsönhat, az *in vitro* aktivitásmérés pedig azt is igazolta, hogy a transláció során termelt fehérjék funkcionális komplexszé állnak össze (6.1. ábra) [221]. Az általunk elsőként leírt Arath CYCB1;1-CDKB2;1 kölcsönhatást azóta több közlemény is megerősítette, az Arath CYCB1;1-Arath CDKA;1 vonatkozó újabb eredmények azonban ellentmondásosak, ugyanis születtek a mi megfigyelésünket támogató, illetve annak ellentmondó adatok is [222] [223]. Ez utóbbi eredmények jól jelzik, hogy az *in vitro* kölcsönhatás-vizsgálatokból levont következtetéseket csak fenntartással lehet kezelni, az ilyen adatok *in vivo* vizsgálatokkal történő megerősítése elengedhetetlen.

A sejtciklus szabályozás tanulmányozására irányuló kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a búzacsíra alapú, sejtmentes transláció hatékonyan alkalmazható olyan eukarióta fehérjék gyors és költséghatékony előállítására, melyek termeltetése a prokarióta sejt rendszerében csak nagyon körülményesen, vagy egyáltalán nem kivitelezhető. Habár a megközelítés, mint fehérjetermelő rendszer alapvetően jól használható, az áteresztőképesség tekintetében két okból kifolyólag is kívánnivalókat hagy maga után. Egyrészt a vektorkonstrukciók hagyományos módon restriktációs endonukleázok és ligáz alkalmazásával hozhatók létre, másrészt a szintetizált fehérjék nem rendelkeznek affinitástisztításra alkalmas címkével. Ezen hiányosságok nagymértékben megnövelik a fehérje előállításához szükséges időt és a költségeket, illetve korlátozzák a szintetizált fehérjék felhasználhatóságát, így a rendszer továbbfejlesztése mellett döntöttünk, mely esetünkben a vektor megfelelő módon történő átalakítását jelentette.

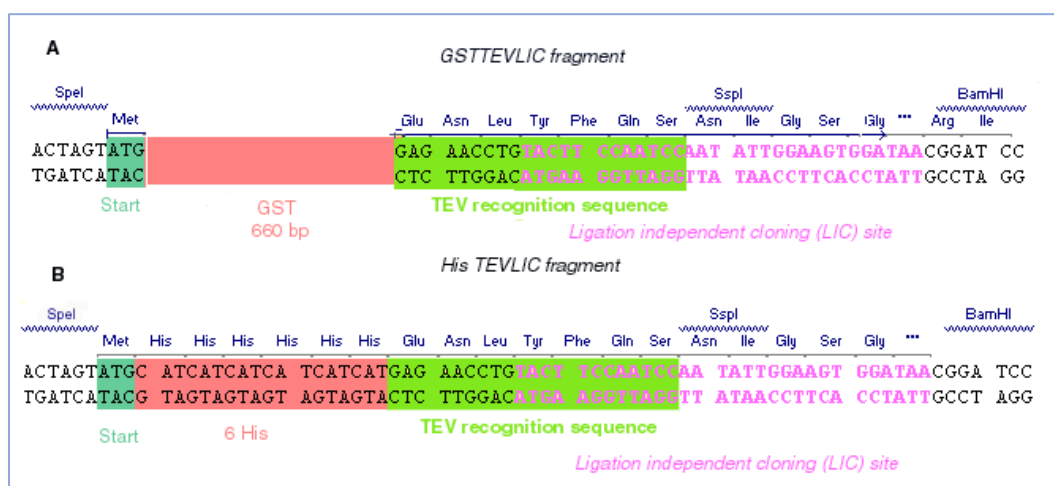
Az első hiányosággként megjelölt, a célfehérjét kódoló vektor létrehozásából származó nehézségek orvoslására számos eljárás kínálkozik, melyek közül célkitűzéseinknek a következő szempontok alapján a ligálás-független klónozás (LIC) felelt meg legjobban: i.) Az általánosan elérhető, 5'-3' polimeráz és 3'-5' exonukleáz aktivitással bíró T4 DNS polimerázon és *SspI* restriktációs endonukleázon túl nincs további enzimigénye, mely tényező költséghatékonyá teszi a módszert. ii.) A gyakran alacsony hatékonyságú ligálási lépés szükségtelenné válik. iii.) A megfelelően tervezett, proteáz-felismerő motívumot magába foglaló LIC hely lehetővé teszi az affinitástisztítást biztosító címke szinte teljes eltávolítását, így a proteáz kezelést követően mindössze két plusz aminosav marad a célfehérje N-terminális végén.

A másodikként feltüntetett nehézség még komolyabban behatárolja a rendszer alkalmazhatóságát, mivel a célfehérje tisztítása minden esetben egyedi, több kromatográfiás lépésből álló protokoll kidolgozását igényelné, míg szelektív detektálása a kérdéses fehérjére specifikus ellenanyag meglétét feltételezi. Megjegyzendő, hogy a fehérje tisztítására alkalmas eljárás kidolgozása gyakorlatilag kivitelezhetetlen, mivel az általánoságban alkalmazott *in vitro* translációs léptéknél néhány tíz µg-nyi fehérje szintetizálódik, ilyen mennyiségű fehérje több lépésben történő tisztítása nem megvalósítható, az egyes kromatográfiás lépéseknél jelentkező veszteség tulajdonképpen a fehérje teljes elvesztését eredményezi. Fejlesztésünk első fázisában a rekombináns fehérjetechnológiában legelterjedtebb két címke, úm. GST és His₆ vektorba építése mellett határoztunk. A GST-re, viszonylag nagy mérete (26,98 kDa) ellenére, azért esett a választás, mert segíti a fehérjék natív konformációjának felvételét. A His₆ címke előnye kis méretében rejlik, a célfehérje N-terminálisán megjelenő plusz hat

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

hisztidin várhatóan sem a fehérje szerkezetét, sem pedig funkcióját nem befolyásolja. Mindemellett a His₆-jelölt fehérjék tisztítására dedikált gyöngyök széles palettája kedvező áron elérhető.

A fentebb részletezett szempontok figyelembe vételével olyan vektorokat hoztunk létre, melyekbe a célfehérje kódoló szekvenciája LIC segítségével beilleszthető, a jelölő címke pedig a nagy szelektivitású TEV proteáz segítségével lehasítható (6. 2. ábra) [224]. A GST vektor kialakításához a GST-t kódoló szekvenciát a megfelelő túlnyúló végekkel rendelkező primerekkel amplifikáltuk, míg a His₆ címkét biztosító vektor esetében a teljes beillesztendő DNS-fragmentet kémiai szintetizáltattuk. A LIC során *SspI* kezeléssel hozzuk létre a szükséges tompa végeket, ezért a kiindulási pEU3-NII és pEU-E01 vektorokban eredetileg megtalálható *SspI* restrikciós endonukleáz hasítási helyet *in vitro* mutagenézissel elimináltuk. Az ily módon létrejött vektorokat és fentebb leírt DNS fragmenteket a megfelelő restrikciós endonukleázokkal kezeltük, majd a ligálást követően a plazmidokkal DH10B kompetens sejteket transzformáltunk. Egy-egy, a kolónia PCR alapján pozitív baktérium kolóniából plazmidot tisztítottunk, és szekvenálással megerősítettük a vektorkonstrukció sikeres kialakítását.

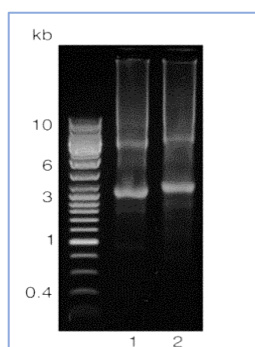


6.2. ábra A továbbfejlesztett vektorok ligálás-független klónozó helyének nukleinsav-szekvenciája [224].

A vektorok funkcionális tesztelését egy *Arabidopsis* mitogén-aktivált protein kináz, az AtMPK6 termelésével valósítottuk meg. A fehérjét kódoló szekvenciát LIC-re alkalmas primerekkel egy AtMPK6-ot hordozó plazmidból amplifikáltuk, majd a PCR-terméket PEG-es kicsapással tisztítottuk. A létrehozott pEU3-NII-HLIC, pEU3-NII-GLIC, pEU-E01-HLIC, pEU-E01-GLIC vektorainkat *SspI*-gyel linearizáltuk, ezt követően dGTP jelenlétében T4 DNS polimerázzal kezeltük, hogy létrehozzuk a LIC-hez szükséges, 14 nukleotid hosszúságú túlnyúló véget. A PCR terméken azonos módon hoztuk létre a túlnyúló véget, azonban ez esetben dGTP helyett dCTP került a reakció elegybe. A polimeráz enzim hőinaktiválása után a reakció elegyeket összekevertük, és 20 perc inkubáció után kompetens sejteket transzformáltunk velük. A baktériumtelepek kolónia PCR-rel történő ellenőrzése alapján a LIC nagy hatásfokkal működött, a több tucat felnőtt telep több mint 90%-a pozitív volt, azaz hordozta az AtMPK6-ot kódoló inszertet.

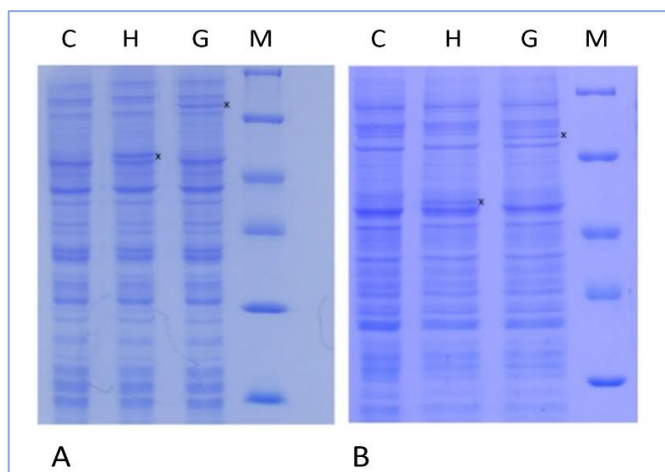
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az általunk preferált búzacsíra transzlációs rendszerben az mRNS előállítása és a fehérje termelése két elhatárolt lépésben történik, az mRNS egy külön reakcióban *in vitro* transzkripcióval kerül szintézisre. A pEU3-NII és pEU-E01 vektorok a prokarióta RNS polimerázoknál nagyobb aktivitással rendelkező, bakteriofág eredetű T7, illetve SP6 RNS polimerázok promóterét hordozzák, ennek megfelelően az *in vitro* transzkripciót a megfelelő polimerázt tartalmazó elegyekkel valósítottuk meg. Az RN-ázok általános előfordulásának következtében az RNS-ek könnyen degradálódnak, ezért a szintetizálódott mRNS minőségét minden esetben ellenőrizzük gélelektroforézissel.



6.3. ábra *In vitro* transzlációra alkalmas mRNS-eket bemutató agaróz gélelektroforézis. His-AtMPK6 (1) és GST-AtMPK6 (2) fehérjéket kódoló mRNS [225].

A 6.3. ábra egy sikeres *in vitro* transzkripció eredményét reprezentálja, ahol is az mRNS számított méreténél egy intenzív, felette pedig változó méretű és intenzitású sávok láthatók, míg a kisebb mérettartományban – ahol a degradált mRNS-eket váránk – nem detektálható nukleinsav.

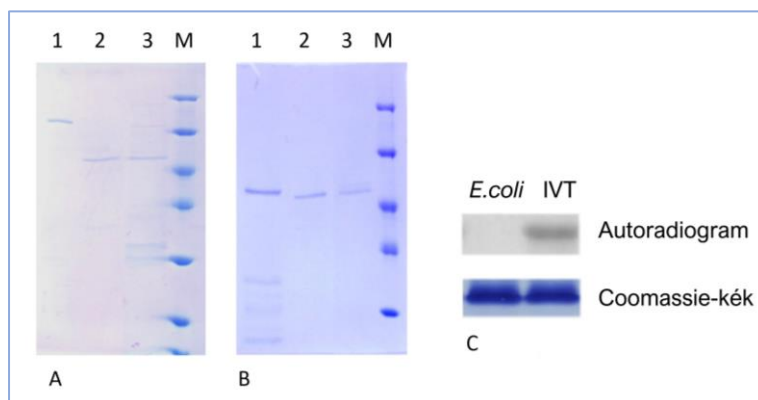


6.4. ábra *In vitro* transzlált GST-AtMPK6 és His-AtMPK6 fehérjék SDS-PAGE analízise. pEU3-NII (A) és pEU-E01 (B) vektorokból fejlesztett plazmidokkal előállított His-AtMPK6 (H) és GST-AtMPK6 (G) fehérjék (x-szel jelölve) Coomassie-kék festéssel azonosíthatók a kontroll transzlációs (C) eleggyel összevetve [224].

Az *in vitro* transzkripció segítségével kapott, GST-AtMPK6 és His-AtMPK6 fehérjéket kódoló mRNS-ek hozzáadásával kétrétegű transzlációt állítottunk össze, majd 16 óra múltán ellenőriztük a fehérjeszintézis eredményét. A transzlációs elegyből kivett teljes fehérjeminták denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) történő elválasztása egyértelműen igazolta a transzláció sikerét, mindkét konstrukció esetében a várt molekulatömegnél jelent meg egy plusz fehérje (6.4. ábra).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

Amint korábban jeleztem, a vektorkonstrukciók létrehozásakor egyik kiemelt célunk a termelt fehérjék elválasztásának elősegítése volt. Megvizsgáltuk tehát, milyen mértékben tisztíthatók a rekombináns fehérjék affinitáskromatográfiával. Az alkalmazott fehérjecímkének megfelelően redukált glutationnal borított, illetve IMAC gyöngyöket adtunk a kihígított transzlációs elegyekhez, majd az 1 órás inkubációt követően mosással eltávolítottuk a nem specifikusan ágyhoz kötött fehérjéket. A célfehérjénk tisztíthatóságát kétféle megközelítéssel vizsgáltuk, miszerint vagy megfelelő koncentrációjú redukált glutation, illetve imidazol hozzáadásával eluáltuk, és utána proteázzal kezeltük, vagy közvetlenül a gyöngyről hasítottuk TEV-kezeléssel. A 6.5. ábrán látható eredmények igazolják, hogy mindkét fehérjecímke esetében az elúciós és közvetlen proteáz kezeléssel megközelítés alkalmazásával egyaránt egy lépésben nagy tisztaságú fehérjét tudunk előállítani. A felülúszókban túlnyomórészt egyetlen, megfelelő molekulatömegű fehérjét detektáltunk a gél Coomassie-kékkel történő festését követően.



6.5. ábra Az *in vitro* transzlált GST-AtMPK6 és His-AtMPK6 fehérjék affinitástisztítása és a His-AtMPK6 *in vitro* kináz aktivitásának vizsgálata SDS-PAGE analízissel.

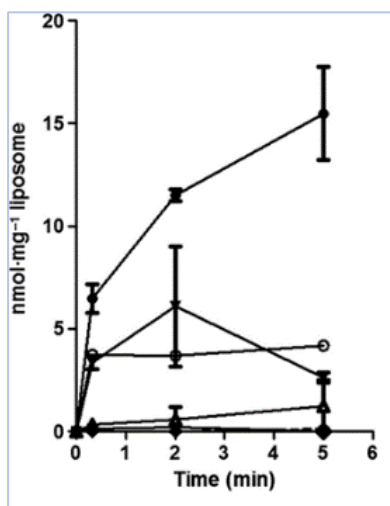
(A) Gyöngyhöz kapcsolt (1), közvetlenül TEV-hasított (2) és eluálást követően hasított (3) GST-AtMPK6. (B) Gyöngyhöz kapcsolt (1), közvetlenül TEV-hasított (2) és eluálást követően hasított (3) His-AtMPK6. (C). Baktérium sejtekben (*E.coli*), illetve *in vitro* transzlációval (IVT) előállított His-AtMPK6 fehérje *in vitro* kinázaktivitása röntgenfilmmel (A) és a géltre felvitt MBP mennyisége Coomassie-kék festéssel detektálva [224].

Az előállított rekombináns fehérjékkel szemben támasztott egyik legfontosabb elvárás a natívnak megfelelő térszerkezet kialakulása, mely követelmény a prokarióta rendszerekkel előállított eukarióta fehérjék esetében gyakran nem teljesül. Annak tisztázására, hogy az általunk alkalmazott búzacsíra rendszer hogyan teljesít ebben a tekintetben a His-AtMPK6 fehérjét *E. coli* sejt rendszerben is előállítottuk. Ezt követően azonos mennyiségű baktériumban, illetve *in vitro* transzlációval előállított protein kinázot adtunk a mielin bázikus fehérje (MBP) szubsztrátot és radioaktív γ -P ATP-t tartalmazó kinázaktivitás mérésére alkalmas reakcióelegyhez. A reakció leállítását követően az elegyet PAGE-val elválasztottuk, a röntgenfilmet a géllal exponáltuk, melynek eredményeként egyértelmű igazolást nyert, hogy a búzacsíra-kivonat segítségével, *in vitro* transzlációval termelt AtMPK6 több nagyságrenddel nagyobb kinázaktivitással rendelkezik (6.5. ábra).

A vektorkonstrukciók kifejlesztését követően több tucat fehérjét állítottunk elő búzacsíra-kivonaton alapuló *in vitro* transzlációs rendszerrel. A termelt fehérjék döntő része növényekből származott, így ezek előállításuk a várakozásoknak megfelelően nem ütközött akadályba. Ezen fehérjékkel kivitelezett kísérletes munkák ismertetése túlmutat a dolgozat keretein, az ezekből származó publikációk a 6.1. 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 (6.1. 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 többet funkcionális vizsgálatokban alkalmaztunk.

A kidolgozott módszerben rejlő lehetőségeket szemléltetendő csak egy, a technikailag legnagyobb kihívást jelentő fehérjével végzett kísérletünkre szeretném felhívni a figyelmet. A GLUT transzportfehérje család GLUT10 tagjában bekövetkező mutációk kanyargós artéria szindrómát eredményezhetnek. Intézetünk Bánhegyi Gábor által vezetett kutatócsoportja ezen fehérje celluláris lokalizációját, illetve transzportban játszott szerepét tanulmányozta [226]. *In vitro* transzlációs rendszerünk ezen utóbbi kérdés tisztázásában volt segítségünkre. Transzportfunkciójának megfelelően a GLUT10 membránlokalizált fehérje, így *in vivo* szintézise a 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 egészítettük ki, majd háromórás inkubációt követően centrifugáltuk az elegyet. A csapadék és felülúszó immunoblot analízise igazolta, hogy a liposzóma hozzáadása drasztikusan növeli az oldatban jelenlévő GLUT10 fehérje mennyiségét, és az ily módon előállított proteoliposzóma funkcionális vizsgálatokra is alkalmas. Az *in vitro* transzlációból származó proteoliposzómával kivitelezett rapid filtrációs kísérletek elsőként bizonyították, hogy a GLUT10 fehérje a dehidroaszkorbát transzportjáért felelős (6.6. ábra) [226].



6.6. ábra GLUT10 transzporter aktivitásának vizsgálata proteoliposzómával.

A transzport a következő radioaktív ligandok alkalmazásával történt: kontroll (○); dehidroaszkorbát 5 (●); aszkorbát (▲); glükóz (▼); UDP-glükuronsav (⊗); szacharóz (□). [226].

| Organizmus | Előállított fehérje | Alkalmazás | Közlemény |
|-----------------------------|---|---|--|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | γ -Tubulin, E2FA, E2FB, E2FC és mutánsaik | kölcsönhatás vizsgálat | J. OF EXPERIMENTAL BOTANY (2020) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtMPK4, AtMPK6, AtMCK1, AtMCK4, PIN6 és mutánsaik | szubsztrát azonosítás és foszforilációs hely meghatározás | NEW PHYTOLOGIST (2018) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtMPK4, AtMPK6, AtMCK1, AtMCK4, 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, AtMCK4, WUS | foszforilációs hely meghatározás | BMC PLANT BIOLOGY (2016) |
| <i>Homo sapiens</i> | GLUT10 | membrántranszport-aktivitás mérés | FEBS LETTERS (2016) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtMPK6, AtMCK4, γ -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) |

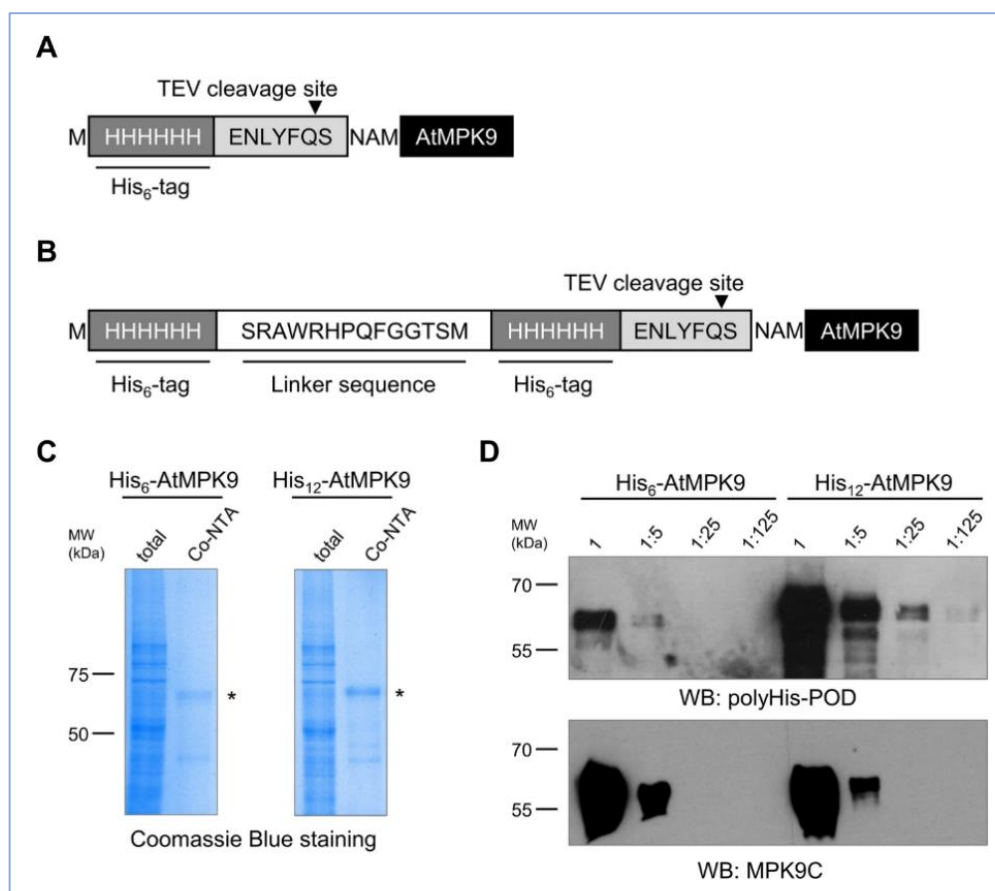
6.1. táblázat A laboratóriumunkban *in vitro* transzlációval előállított fehérjék alkalmazásával született publikációk összegzése.

1.2. A búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs vektorcsalád bővítése

Az előző fejezetben részletezett eredmények igazolták, hogy a búzacsíra *in vitro* transzlációs rendszer az eukarióta fehérjék előállítására jól alkalmazható, a fehérjék döntő része natív konformációban és aktív formában szintetizálódik. Mindezek alapján a nagy áteresztőképességű, költséghatékony fehérje-kölcsönhatást, illetve funkcionalitást vizsgáló kutatások ideális fehérje forrása lehet. A rendszer sokrétűségét növelendő a vektorcsaládot további rekombináns fehérjecímkéket kódoló plazmidokkal bővítettük [236].

Habár a His₆ a rekombináns fehérjetechnológiában legáltalánosabban használt címke, alkalmazását egyrészt az IMAC gyöngyök és a címke közötti viszonylagosan magas disszociációs állandó, másrészt a His₆-szelektív ellenanyagok promizskuitása korlátozza. A korábbi kutatások alapján a His₆ duplázása e hiányosságokat jelentősen redukálja, így egy His₁₂ címkét kódoló vektor létrehozása mellett döntöttünk. A kémiai

szintézissel létrehozott kétszer hat hisztidint összekötő aminosav-szekvenciát és a második His₆ címkét kódoló DNS-szakaszt *SpeI* restriktációs endonukleázzal emésztettük, majd az azonos enzimmel kezelt pEU3-NII-HLICNot vektorba ligáltuk (6.7. ábra). Az elkészített vektort az *AtMPK9* termelésével teszteltük, melynek során a nevezett fehérjét a His₆ és His₁₂ címkét kódoló vektorokba inszertáltuk. A kétrétegű transzlációs reakciót követően az *AtMPK9* kobaltkelát ágyon tisztítottuk, illetve His₆ specifikus ellenanyaggal detektáltuk. A PAGE, illetve western blot eredmények megerősítették a vektorral kapcsolatos elvárásainkat, a kobaltkelát ágyhoz a dupla His₆ címkés fehérjéből több kötődött, az immunbloton pedig erősített kemilumineszcencia (ECL) alkalmazásával legalább egy nagyságrenddel kevesebb fehérje volt detektálható, amennyiben His₁₂-jelöléssel volt ellátva (6.7. ábra).

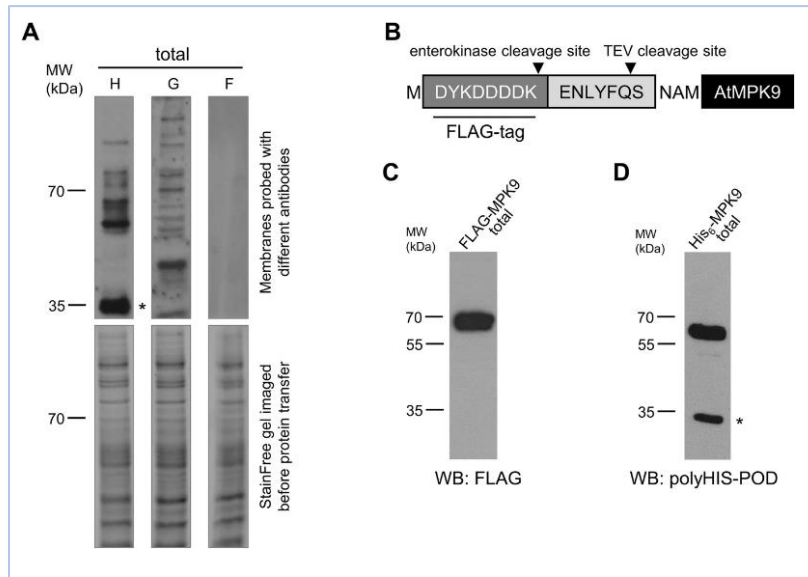


6.7. ábra pEU3-NII-HxHLICNot vektor funkcionális vizsgálata.

(A) A kiindulási vektor affinitáscímkéjének aminosav-szekvenciája. (B) A létrehozott, His₁₂ jelölést biztosító vektor affinitáscímkéjének aminosav-szekvenciája. (C) His₆, illetve His₁₂ jelölt *AtMPK9* fehérjék IMAC tisztítást követő PAGE analízise, a várt molekulatömeg magasságok csillaggal jelölve. (D) A His₆, illetve His₁₂ jelölt *AtMPK9* fehérjét tartalmazó totál transzlációs elegyek hígítási sorozatának immunblot analízise. Az affinitáscímkék detektálása polyHis-POD ellenanyag és ECL alkalmazásával történt. Az *AtMPK9* C-terminálisára szelektív ellenanyag alkalmazása igazolja, hogy a megfelelő sávokba azonos mennyiségű *AtMPK9* került felvitelre [236].

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az általunk preferált transzlációs elegy tulajdonképpen a búzacsíra-homogenizátum centrifugálás utáni felülúszója, így nem meglepő, hogy tömegspektrometriás analízise több ezer fehérjét azonosított (személyes közlés alapján). Ez a nagy komplexitás magas, 20 mg/ml körüli fehérjekoncentrációval is párosul, így sok endogén fehérje nagy mennyiségben van jelen az elegyben. Mindezen tényezők hangsúlyossá teszik a megfelelő szelektivitással kimutatható fehérjecímkék alkalmazását. A FLAG címke megfelelhet ennek az elvárásnak, mivel egy olyan kisméretű, nyolc aminosavból álló, tirozintartamú, hidrofil peptidmotívum, amelyre rendkívüli szelektivitással rendelkező ellenanyagok érhetőek el a kereskedelmi forgalomban [237]. A FLAG címke búzacsíra fehérjekivonatban való alkalmazhatóságára vonatkozó feltételezésünk igazolására western blot analízist végeztünk a két legelterjedtebb fehérjecímkére (úm. His₆ és GST), illetve FLAG-re specifikus ellenanyagok segítségével. A kísérlet eredménye egyértelműen igazolta, hogy a FLAG ellenanyag szelektivitás tekintetében egyértelműen felülmúlja a másik két vizsgált antitestet (6.8. ábra). A His₆ és GST ellenanyagok számos fehérjéhez kapcsolódtak, míg a FLAG esetében gyakorlatilag nem volt detektálható semmilyen endogén fehérje (6.8. ábra). Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy a pEU3-NII-HxHLICNot vektornál leírtakhoz hasonló módon létrehozzuk a FLAG címkét kódoló pEU3-NII-FLAGLICNot plazmidot is. A két folyamatban különbség csak a kémiai szintézissel létrehozott DNS-fragmentek vektorba illesztésére használt restriktációs endonukleázok mibenlétében volt, ugyanis ez esetben *SpeI* és *SspI* enzimekkel kiviteleztük a DNS-ek hasítását.



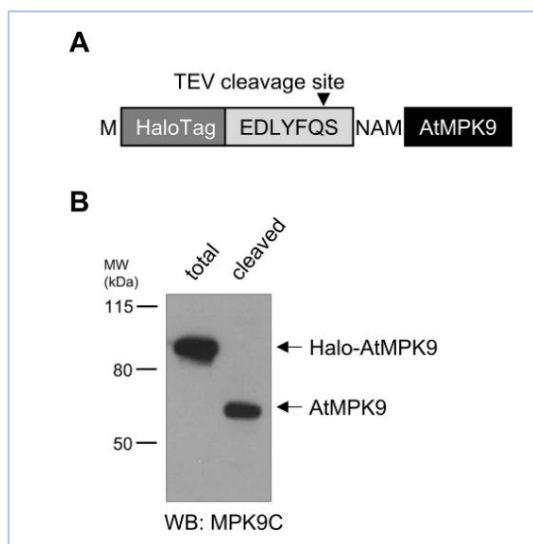
6.8. ábra pEU3-NII-FLAGLICNot vektor funkcionális vizsgálata.

(A) Búzacsíra transzlációs elegy immunoblot vizsgálata polyHis-POD (H), anti-GST (G) és anti-FLAG (F) ellenanyagok és ECL alkalmazásával. Az egyenlő mennyiségű fehérje felvitelét a festést nem igénylő TGX Stain-Free UV megvilágítása nyomán kapott felvétel igazolja. (B) A vektor FLAG címke jelölést biztosító részletének aminosav-szekvenciája. (C) A FLAG, illetve His₆ jelölt AtMPK9 tartalmú totál transzlációs elegyek western blot analízise megfelelő ellenanyagok és ECL alkalmazásával [236].

Az elkészült pEU3-NII-FLAGLICNot vektorba ligálás-független klónozással bejuttattuk az *AtMPK9*-et kódoló DNS-szakaszt, majd erről és a laboratóriumunkban elérhető, pEU3-NII-HLICNot:*AtMPK9* konstrukcióról készült mRNS-ekkel kétrétegű *in vitro* transzlációs reakciót állítottunk össze. A teljes reakcióelegyek western blot analízisének eredménye összhangban volt az előzetes eredményeinkkel, a FLAG címkét magán hordozó fehérje egyetlen határozott sávban volt detektálható, míg a His₆-jelölt kináz kimutatására használt szelektív ellenanyag a várt molekulatömegű fehérje mellett egy kisebb méretűvel is erős, nem specifikus jelet adott (6.8. ábra).

A fehérjeinterakciók *in vitro* tanulmányozásának legáltalánosabb megközelítése a pull-down technika, mely során egy adott felületen, leggyakrabban mágneses gyöngyön immobilizált csali fehérjével kerülnek kihúzásra a kölcsönható fehérjék. Az eljárás egyik kulcslépése a nem szelektíven kölcsönható partnerek mosással történő eltávolítása, mely lépés a felület és az immobilizált fehérje közötti erős kölcsönhatást feltételezi. Vektorcsaládunkat ennek a feltételnek megfelelő fehérjecímkét hordozó plazmiddal is bővíteni kívántuk, így létrehoztuk a HaloTag jelölést kódoló plazmidot. A HaloTag egy olyan 297 aminosavból álló bakteriális eredetű, mutáns haloalkán dehalogenáz, amely az erre célra kifejlesztett szintetikus ligandummal kovalens kötést alakít ki, így az ilyen címkét hordozó rekombináns fehérjék irreverzibilisen immobilizálhatók a ligandummal borított felületeken [238]. A plazmid kialakításához megfelelő túlnyúló végekkel rendelkező primerekkel a pHTN HaloTag CMV-neo vektorból amplifikáltuk az enzim nyílt leolvasási keretét (ORF), majd az ily módon nyert fragmentet az *SpeI* és *SspI* restriktációs endonukleáz kezelést követően az azonos módon emésztett pEU3-NII-GLICNot vektorba illesztettük (6.9. ábra) [236].

A létrejött pEU3-NII-HaloLICNot plazmid funkcionalitásának ellenőrzését az *AtMPK9*-et kódoló vektor kialakításával, illetve a Halo-címkézett fehérje kináz *in vitro* transzlálásával kiviteleztük. A reakciót követően két megközelítéssel vizsgáltuk a szintetizált fehérjét, egyrészt western blottal bizonyítottuk az elegyben való jelenlétét, másrészt HaloLink gyöngy segítségével affinitástisztítottuk. A laboratóriumunkban *AtMPK9* C-terminálisára előállított ellenanyag a western blot analízis során egyetlen, a várt magasságban megjelenő fehérjét ismert fel a totál transzlációs elegyben, ezzel igazolva a vektorkonstrukció sikerét (6.9. ábra). Amint korábban jeleztem a Halo címke legfontosabb jellemzője a liganddal történő kovalens kötés kialakítása, ennek megfelelően az affinitástisztítás során HaloLink ágyhoz tulajdonképpen irreverzibilisen kapcsolódó fehérje gélelektroforézissel közvetlenül nem detektálható. A vektorban lévő TEV proteáz felismerő hely azonban lehetővé teszi a tanulmányozandó fehérje Halo címkéről való lehasítását, így a proteázkezelt HaloLink ágy felülúszójában várhatóan megjelenik a most már címkementes *AtMPK9*. Kísérleteink jól igazolták várakozásainkat, az ágyhoz kapcsolt fehérje SDS mintapufferrel 95 °C-on történő 5 perces inkubációt követően sem volt detektálható a membránra transzferált PAGE-vel elválasztott mintában (nem bemutatott adat). Ezzel szemben a proteázkezelt minta western blot analízise egy, az *AtMPK9* molekulatömegének megfelelő magasságban elhelyezkedő fehérje megjelenését eredményezte (6.9. ábra). Mindezen eredmények együttesen bizonyítják, hogy a Halo címkével transzlált rekombináns fehérjék kiválóan alkalmasak lehetnek pull-down vizsgálatok és aptamerszelekció kivitelezésére.



6.9. ábra A pEU3-NII-HaloLICNot vektor funkcionális vizsgálata.

(A) A vektor Halo címke jelölést biztosító részletének aminosav-szekvenciája. (B) PVDF membránra transzferált teljes transzlációs elegy, illetve HaloLink gyantáról TEV kezeléssel hasított fehérje vizsgálata AtMPK9 C-terminálisára szelektív ellenanyag és ECL alkalmazásával [236].

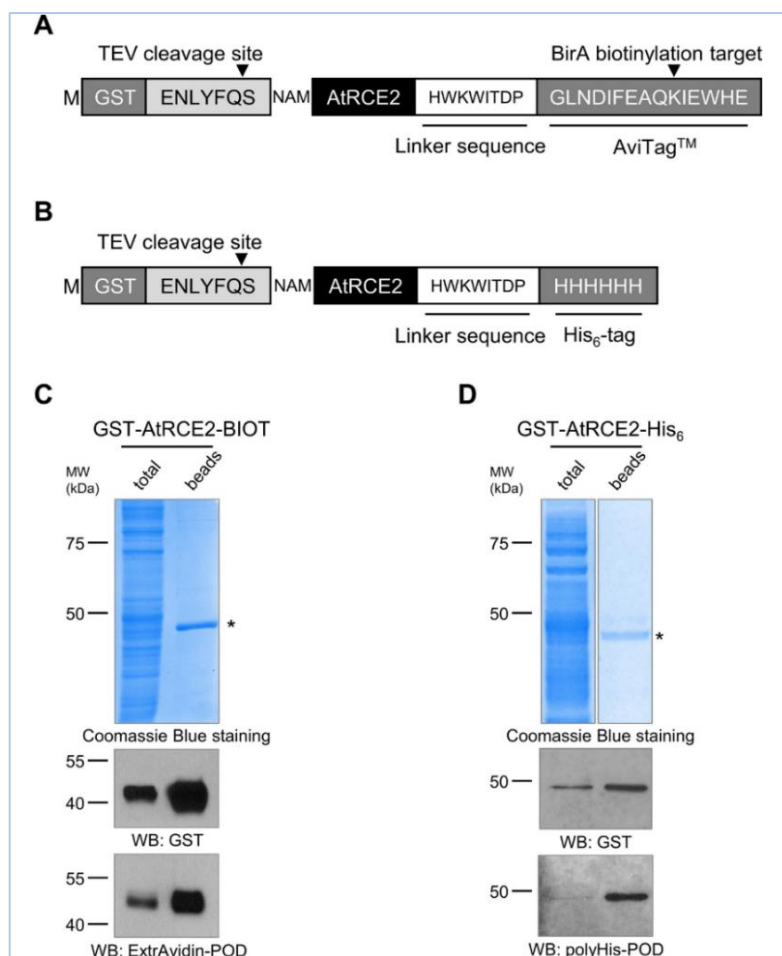
Vektorcsaládunk utoljára bemutatandó két tagjával az affinitáskromatográfiával tisztított fehérjéknél felmerülő általános nehézségre kívántunk megoldást nyújtani. Az affinitástisztítás során az elúció legtöbbször a ligandkötő hely kompetitorának hozzáadásával történik, mely jelenléte sok esetben gátolja a további munkafolyamatokat, ezért dialízissel vagy sótanító oszlop segítségével eltávolítandó, ezen utóbbi lépések azonban elkerülhetetlenül fehérjevesztéshez vezetnek. A rekombináns fehérjék termelését lehetővé tevő vektorok a címkét követően gyakran tartalmaznak valamilyen proteázfelismerő helyet, így a liganddal borított ágyhoz kapcsolt fehérje megfelelő proteázkezeléssel is eluálható. Ez a forgatókönyv sem hátrányoktól mentes, ugyanis a címke eltávolítását követően a fehérje csakis az adott fehérjére szelektív antitesttel mutatható ki. Ezekre a problémákra a két címkével jelölt rekombináns fehérjék jelenthetnek megoldást. Ebben az esetben az egyik címke használható az affinitástisztításra, és azt követően proteázzal lehasítható, míg a másik címke lehetővé teszi a fehérje általánosan elérhető ellenanyagokkal történő detektálását. Ezeknek az elvárásoknak megfelelő kétféle, kettős jelölésű vektort hoztunk létre. Mindkét esetben a fehérje hajtogatódását elősegítő GST címke helyezkedik el a rekombináns fehérje N-terminálisán, míg a C-terminális végen a His₆, illetve a biotinizációs címke található [236].

A vektorkonstrukciós stratégia nagyon hasonló volt a fentiekhez, a fő eltérés a szintetizált DNS-ek pEU3-NII-GLICNot vektorba ültetésére használt enzimekben volt, ugyanis jelen esetben *Bam*HI és *Sma*I restriktációs endonukleázokat alkalmaztunk.

A pEU3-NII-GLICNot-C-HIS és pEU3-NII-GLICNot-C-BIOT vektorok teszteléséhez az *AtRCE2* ORF-ét illesztettük a plazmidokba, majd az *in vitro* transzkripciót és transzlációt követően glutationnal borított mágneses gyöngyökkel izoláltuk a kérdéses fehérjéket. A pEU3-NII-GLICNot-C-BIOT vektor ellenőrzése során a transzlációs elegyet kiegészítettük biotinnal, valamint a biotinizációért felelős BirA biotin ligáz enzimmal, hogy a biotinizáció a fehérjeszintézissel szimultán mehessen végbe. A gyöngyökhöz kikötődött fehérjéket PAGE-vel és azt követő Coomassie-kék festéssel, valamint western blottal is vizsgáltuk. Mindkét megközelítés megerősítette a vektor konstrukció sikerességét, a Coomassie-kék festés egy, a várt magasságban megjelenő fehérjét azonosított, a western blot analízis pedig a GST-szelektív antitest segítségével mindkét fehérje

kimutatására alkalmas volt, míg a biotinált fehérje extravidinhez, a His₆ címkével jelölt pedig polyHis ellenanyaghoz konjugált torna peroxidázzal is detektálható volt (6.10. ábra).

Az újonnan létrehozott vektorainkkal olyan fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tudunk igazolni, melyek a korábbi változatok alkalmazásával nem voltak láthatók. A His₁₂ címkés konstrukció alkalmazásával tudtuk igazolni az *Arabidopsis* E2F fehérjék és γ -tubulin közötti kölcsönhatást, míg a HaloLink jelölést biztosító plazmid lehetővé tette az *Arabidopsis* E2F fehérjék retinoblastoma fehérjekötéséért felelős doménjeinek meghatározását [227].



6.10. ábra pEU3-NII-GLICNot-C-BIOT és pEU3-NII-GLICNot-C-HIS vektorok funkcionális vizsgálata.

(A) pEU3-NII-GLICNot-C-BIOT vektor GST és biotiniláció kettős jelölést biztosító részeinek aminosavszekvenciája. (B) pEU3-NII-GLICNot-C-HIS vektor GST és His₆ kettős jelölést biztosító részeinek aminosavszekvenciája. (C) A GST-biotin kettős jelölt AtrRCE2 tartalmazó totál transzlációs elegy, illetve az affinitástisztított fehérje PAGE analízise. Az előbbi minták vizsgálata anti-GST ellenanyaggal és ExtrAvidin-POD-dal. (D) A GST- His₆ kettős jelölt AtrRCE2 tartalmazó totál transzlációs elegy, illetve affinitástisztított fehérje PAGE analízise. Az előbbi minták vizsgálata anti-GST és polyHis-POD ellenanyagokkal. A várt fehérjeméreteket csillaggal jelölve. [236].

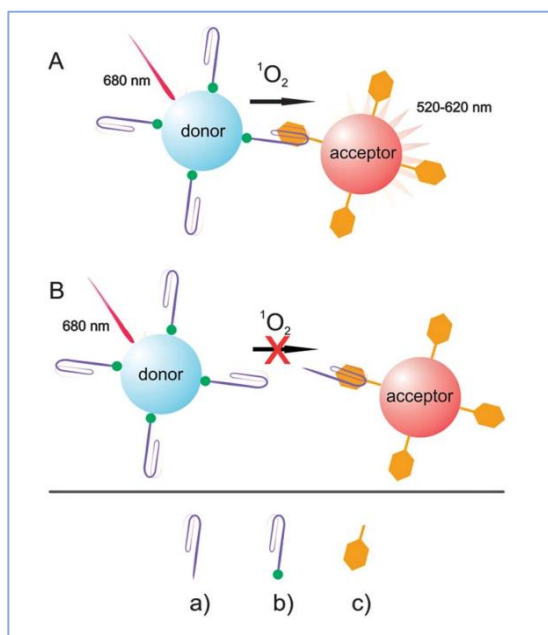
2. Aptamerszelekcióhoz kapcsolódó módszertani fejlesztések

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.

Ebbe a családba tartozik a nagy jelerősítésű, homogén távolság modulált lumineszcens vizsgálat, ami az angol elnevezés nyomán ALPHA néven terjedt el. A módszert már több mint egy negyedszázada leírták, de igazán csak akkor vált népszerűvé, amikor a Perkin Elmer vállalat számos változatát kereskedelmi forgalomba hozta [239]. A rendszer 250 nm átmérőjű polisztirol donor és akceptor gyöngyökből áll, melyek a felületükre kapcsolt molekulák kölcsönhatása következtében kerülhetnek egymás közelségébe. A donor gyöngy ftalocianinja 680 nm hullámhosszúságú fény hatására szingulett oxigént generál, amely alapállapotú oxigénné történő visszaalakulását megelőzően 200 nm-t tesz meg vizes oldatban. Amennyiben a vizsgált molekulák között kölcsönhatás jön létre, a szingulett oxigén eljut az akceptor gyöngyig, és reagál az abban található tioxén származékkal, minek következtében egy 370 nm-es kemilumineszcencia jön létre, amely az akceptor gyöngy fluorofóráját aktiválja. A fluorofór a gerjesztő fénynél rövidebb hullámhosszú, 520-620 nm közötti fényt emittál, egy donor gyöngy pedig mintegy 60 000 szingulett oxigént hoz létre. Ez két tényező együttesen szavatolja a rendszer rendkívül alacsony háttérét és nagy érzékenységet. Az ALPHA rugalmas és egyszerű alkalmazhatóságát a különböző affinitástisztításra (pl. Ni-kelát, glutation, sztreptavidin stb.) alkalmas ligandumokkal borított donor és akceptor gyöngyök, illetve dedikált fehérjék, kismolekulák mérésére kifejlesztett készletek elérhetősége biztosítja [240].

Az ALPHA alkalmazhatóságára irányuló vizsgálatainkat – a dolgozat egy későbbi fejezetében bemutatásra kerülő módon szelektált és karakterizált – alma törzsgöndörödés vírus (ASPV) kapszidfehérjékre specifikus aptamerek használatával valósítottuk meg. Az aptamerekkel kölcsönható PSA-H kapszidfehérje N-terminális His₆ címkézett változatát bakteriális fehérjetúltermeléssel állítottuk elő, és Ni-kelát affinitáskromatográfiával tisztítottuk. Méréseinket a sztreptavidin-, illetve Ni-kelátburkolt donor és akceptor gyöngyökből összeálló ún. „His detection” készlettel kívántuk kivitelezni, ennek megfelelően az aptamereket 3' végen tetraetilén-glikol távtartón keresztül kapcsolt biotinnal szintetizáltattuk (6.11. ábra) [241].

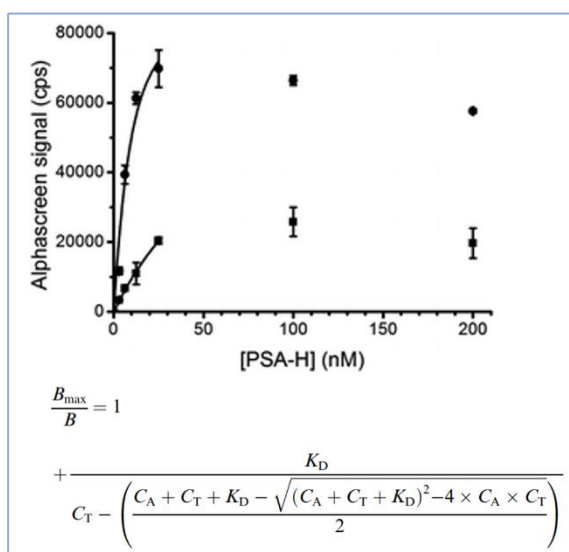


6.11. ábra Az aptamer-fehérje komplex K_D értékének meghatározása ALPHA alkalmazásával.

Fehérjetelítéssel (A) és kompetitív méréssel (B) történő K_D meghatározás elrendezése. Jelöletlen (a) aptamer, biotin jelölt aptamer (b), His₆-PSA-H fehérje (c). [241].

A fehérje-aptamer kölcsönhatások K_D értékeinek meghatározását megelőzően meghatároztuk az optimális mérési körülményeket, és a kapott adatok alapján a további mérések során 1 mg/ml marhaszérum albumin- (BSA-)tartalmú foszfátpufferes sóoldatot (PBS), illetve 12,5 nM aptamerkoncentrációkat alkalmaztunk.

Az optimális mérési körülmények ismeretében először telítéssel állapítottuk meg a két vizsgált aptamer K_D értékét, melynek során állandó aptamer mennyiség mellett a kapszidfehérje koncentrációját 1-200 nM tartományban változtattuk (6.12. ábra). A mért értékek által kijelölt pontokra egy olyan görbét illesztettünk, melynek egyenlete az aptamer-fehérje kölcsönhatás 1:1-es sztöchiometriáját veszi alapul, és számításba veszi, hogy a kisebb koncentrációk esetén a szabad célmolekula egyensúlyi koncentrációja jelentősen eltérhet a bemérési célmolekula koncentrációtól (6.12. ábra). Az ALPHA méréssel számított értékek jó egyezést adtak a korábbi, SPR-rel meghatározott disszociációs állandókkal: PSA-H aptamer $K_D = 5,3 \pm 3,9$ nM, illetve 8 nM (SPR); PSA-MT32 aptamer $K_D = 70,5 \pm 28,0$ nM, illetve 83 nM (SPR).

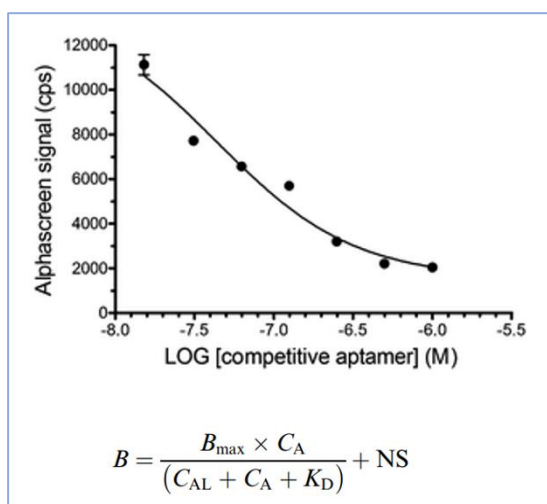


6.12. ábra Az aptamerek fehérjetelítési görbéje és a K_D számításához használt egyenlet [241].

PSA-H (●) MT32 (■) aptamerek.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Következő lépésként PSA-H aptamer-fehérje kölcsönhatás K_D értékét kompetitív mérésrel is meghatároztuk. Ebben az elrendezésben a biotinnal jelölt aptamer és fehérje koncentrációját egyaránt állandó értéken tartottuk (rendre 15nM és 3 nM), míg a biotinnal nem módosított aptamert változó mennyiségben adtuk az elegyhez (6.13. ábra). A mérési adatokra egy olyan homológ kompetitív modell alapján illesztettünk görbét, amely feltételezi, hogy a biotinnal módosított és a módosítás nélküli aptamerek célfehérje iránt affinitása megegyezik (6.13. ábra). Habár az ily módon számított $28,4 \pm 16,6$ nM-os K_D érték kissé eltér a korábban meghatározott $5,3 \pm 3,9$ nM-tól, kétmintás t-próbát alkalmazva 95%-os konfidenciaszinten nem különböznek szignifikánsan az értékek.



6.13. ábra A PSA-H K_D értékének meghatározás kompetitív mérésrel és a számításhoz használt egyenlet.

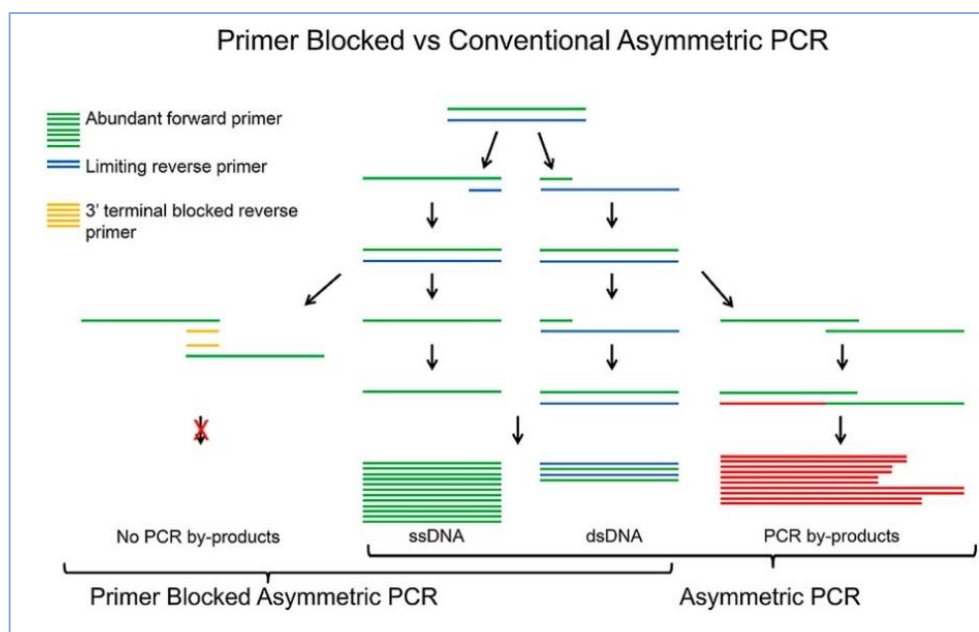
Ezek az eredmények összességükben azt jelzik, hogy az ALPHA megfelelő alternatívája lehet a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikai vizsgálatára leginkább elfogadott SPR módszernek. Az ALPHA aptamerszelekcióban történő alkalmazására irányuló vizsgálatokat minden bizonnyal párhuzamosan végeztük egy francia kutatócsoporttal, ugyanis ők röviddel eredményeink megjelenése előtt közölték hasonló kísérleteken alapuló megfigyeléseiket [242]. Az általunk kivitelezett vizsgálatok ennek ellenére is újdonságot jelentettek, mivel az említett közlemény RNS-t felismerő RNS aptamerek kölcsönhatását igazolta. Az ALPHA egyszerű kivitelezhetősége elsősorban a nagyszámú kölcsönhatásvizsgálat során jelent előnyt, így kiegészítve valamilyen egyszálú DNS-t biztosító módszerrel (lásd következő fejezet) ideális választás lehet a SELEX nyomán kapott aptamerjelöltek szűrésére.

2.2. Primerblokkolt aszimmetrikus PCR

Az egyszálú nukleinsavaknak a molekuláris biológia kutatások kezdete óta nagy jelentőségük van DNS-ek és RNS-ek szekvenciaszelektív kimutatásában, az aptamerek megjelenésével ezen molekulák jelentősége pedig csak még tovább fokozódott. Lévén laboratóriumunk egyik fő kutatási profilja az aptamerszelekció, a nagyszámú megfelelő mennyiségű és minőségű egyszálú DNS (ssDNS) előállítása kutatócsoportunk mindennapos feladata. Elméletileg a szükséges ssDNS-ek kémiai szintézissel is biztosíthatók, ez a megközelítés esetünkben azonban két okból kifolyólag sem jelenthet megoldást. Egyrészt a SELEX minden egyes szelekciós lépése a PCR-rel amplifikált,

dúsított könyvtár egyszálúsításával végződik, melynek során tízezres nagyságrendben lévő, ismeretlen szekvenciájú oligonukleotid előállítás a feladat, mely kémiai szintézissel megvalósíthatatlan. Másrészt a SELEX-szel nyert oligonukleotidok egyedi karakterizálása elengedhetetlen a legkedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező aptamerek azonosításához. Habár az aptamerszelekció ezen fázisánál már ismertek az oligonukleotidok szekvenciái, a szintetizálandó ssDNS-ek nagy száma miatt a kémiai szintézis rendkívüli módon növelné a folyamat költségét. E szempontok figyelembevételével egy egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan kivitelezhető ssDNS-szintetizáló módszer kifejlesztése mellett döntöttünk.

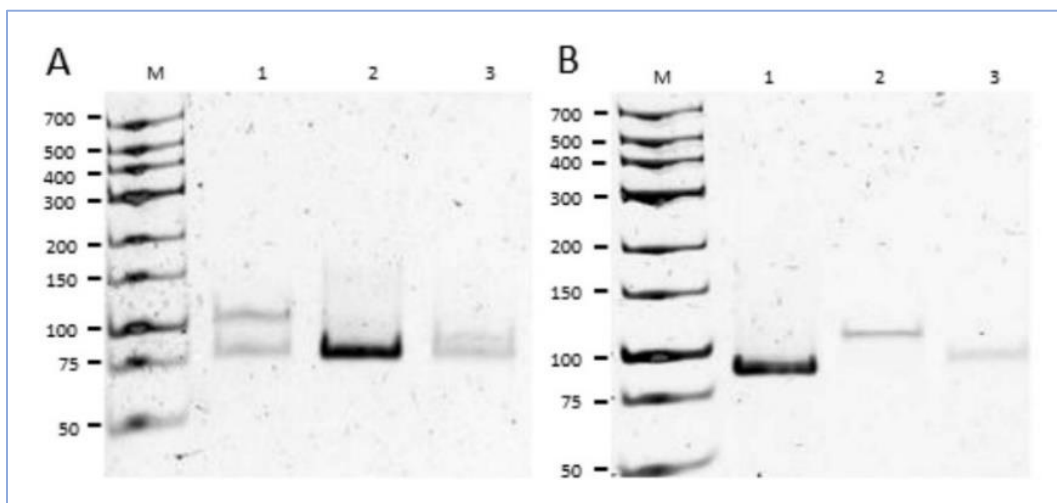
A legegyszerűbben kivitelezhető ssDNS-generáló rendszer a PCR-rel szinte egyidőben megjelenő, két primert eltérő koncentrációban tartalmazó aszimmetrikus PCR (aPCR) a gyakorlatban csak korlátozottan alkalmazható, mivel a reakció során gyakran nem specifikus DNS-ek is keletkeznek, sőt sok esetben ezek adják a szintetizálódott DNS túlnyomó részét. A jelenség hátterében többek között az áll, hogy a primerek olvadási hőmérsékletét (T_m) szekvenciájuk mellett reakcióelegyben lévő koncentrációjuk is befolyásolja. Az adott PCR során alkalmazandó pontos T_m érték a számított primer olvadási hőmérsékletek mellett a koncentrációkat is számításba vevő, ún. legközelebbi szomszéd képlettel számítható [243]. Ezt a tényt figyelembe véve dolgozták ki a LATE-PCR-t (Linear-After-The-Exponential), ahol is primereket úgy tervezik, hogy a legközelebbi szomszéd számítással legyen közel azonos az olvadási hőmérsékletük, és ezzel nagyságrendekkel növelték a valós idejű PCR érzékenységét [244]. Hipotézisünk szerint az aPCR során a primerkoncentrációk eltéréséből fakadó probléma egyszerűbben is orvosolható. Nevezetesen a két primert azonos koncentrációban adjuk a reakcióelegyhez, azonban limitáló primer egy része blokkolt, 3' végén foszforilált formában van jelen, így a limitáló primerek, habár egyaránt bekötődnek, döntő részükről nem indul DNS-polimerizáció (6.14. ábra.).



6.14. ábra A primerblokkolt és hagyományos aszimmetrikus PCR amplifikációs folyamatát összehasonlítása [245].

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

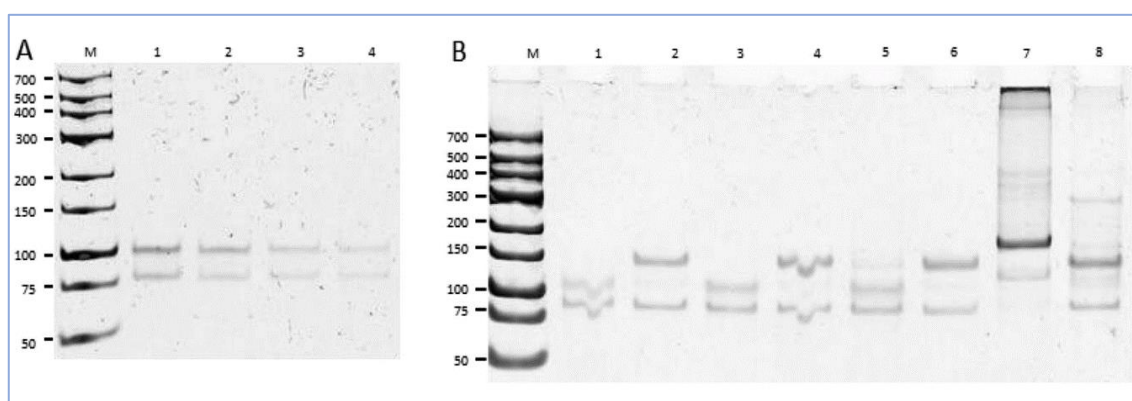
Elméletünk helytállóságának igazolására a lehető legegyszerűbb PCR-t állítottuk össze, az elegybe a primereken kívül egyetlen templát, egy 75 nukleotidból álló ssDNS került. A primerek tekintetében háromféle elrendezés alkalmaztunk, ekvimoláris primerkoncentrációjú, hagyományos, 20:1 (feleslegben lévő : limitáló) primerkoncentráció-arányú aPCR, illetve 20:1:19 (feleslegben lévő : limitáló : blokkolt limitáló primer) arányú primerblokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) elegy. A reakcióelegyek amplifikációt követő PAGE elválasztása és GelRed festése szignifikánsan eltérő mintázatokat mutatott. A PCR a várakozásoknak megfelelően egy határozott méretű terméket eredményezett, míg a kétféle aPCR mintában több, kisebb mennyiségben megjelenő DNS-fragment volt látható (6.15. ábra). A hagyományos aPCR esetén az elválasztást követően egy elmosódott sávot detektáltunk, ezzel szemben a PBA-PCR-mintánál két határozott csík jelent meg. Az aPCR-eket oly módon is megismételtük, hogy az 5' végén biotinnal jelölt limitáló primert alkalmaztunk, hogy az egyszálú termékeket egyértelműen azonosítani tudjuk. Az amplifikációs reakciót követően a biotinilált kétszálú termékeket mágneses gyöngyre rögzített sztreptavidinnel eltávolítottuk, majd a felülúszókat PAGE segítségével vizsgáltuk. Az eredmények alapján, mindkét aPCR egy jól meghatározott ssDNS-t biztosított, és mindkét reakció termék kisebb mobilitással rendelkezett, mint a dsDNS (6.15. ábra). Megjegyzendő, a két aPCR egyszálú termékei is eltérő sebességgel mozogtak a gélben, ami minden valószínűség szerint a PBA-PCR termék részleges kétszálúságának tudható be, ugyanis a biotin jelölést nem hordozó, blokkolt limitáló primer az egyszálú termék 3' végével a PAGE során is hibridizált állapotban marad.



6.15. ábra (A) ssDNA előállítás PBA-PCR-rel (1), PCR-rel (2) és aPCR-rel (3). (B) Az egyszálú termékek vizsgálata sztreptavidin gyönggyel történő elválasztást követően. A PCR elegy sztreptavidin inkubáció nélkül (1), sztreptavidin inkubáció felülúszója PBA-PCR (2) és a PCR esetében. A dsDNS marker bázispár hosszúságban (M) [245].

Miután a fenti adatok igazolták hipotézisünket, a PBA-PCR optimalizálására irányuló kísérleteket hajtottunk végre. A primer és teljes limitáló primer (blokkolt és nem blokkolt) koncentrációkkal minden esetben 20:1 arányt biztosítottunk, míg a blokkolt, illetve nem blokkolt primerek közötti arányt változtattuk. Ezen arányok változtatásával úgy

találtuk, a kétszálú:egyszálú termék aránya és a kitermelés tekintetében a 1:19 nem blokkolt:blokkolt arány a legkedvezőbb, így továbbiakban ennek megfelelően állítottuk össze a PBA-PCR-eket (6.16. ábra). A következő vizsgálataink során a PCR-ciklusok számát növeltük, és a kapott adatokkal egyértelműen bizonyítottuk a PBA-PCR előnyöségét. A hagyományos aPCR alkalmazása során 45 ciklusnál már jelentős mennyiségű melléktermék keletkezett, az 55 ciklusos amplifikáció során a várt ssDNA tulajdonképpen teljesen eltűnt, és a melléktermékek váltak dominánssá. Ezzel szemben a PBA-PCR-ből származó minták PAGE analízise alapján kijelenthetjük, 45 ciklus nem befolyásolja kedvezőtlenül a termék:melléktermék arányt, és még az 55. ciklusnál is a megfelelő méretű ssDNA van jelen legnagyobb mennyiségben (6.16. ábra). A megfelelő PBA-PCR körülmények azonosítását követően a módszer általános alkalmazhatóságát további négy oligonukleotid amplifikálásával is bizonyítottuk (nem bemutatott adat).

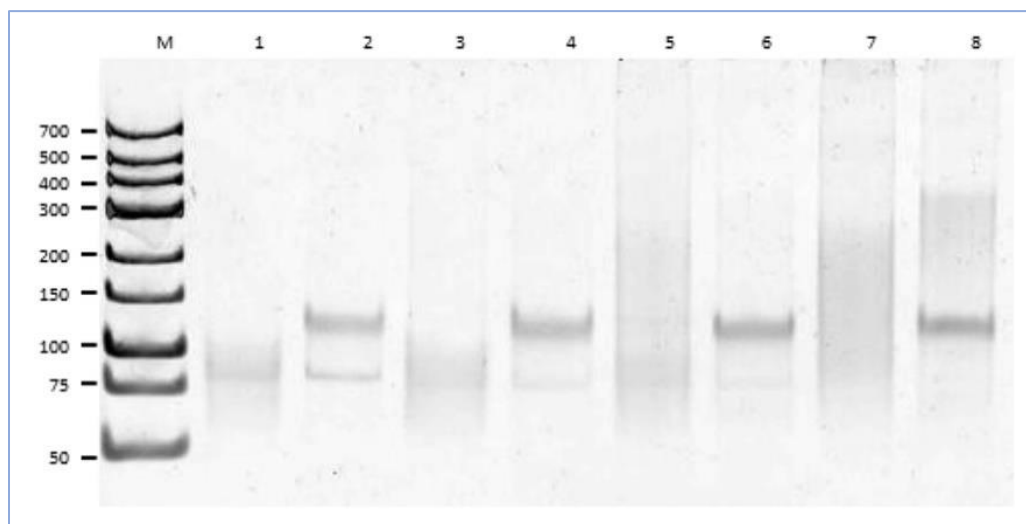


6.16. ábra (A) PBA-PCR optimalizálása a primerek arányának változtatásával.

Az alkalmazott nem blokkolt és blokkol limitáló primer arányok 1:9 (1), 1:19 (2), 1:49 (3) és 1:99 (4). (B) Az aPCR (1), (3), (5), (7) és PBA-PCR (2), (4), (6), (8) esetében megfigyelhető termékek rendre 25, 35, 45 és 55 ciklusszámot követően. A dsDNS marker bázispár hosszúságban (M) [245].

Kutatásaink szempontjából kiemelt fontosságú volt annak tisztázása, mennyiben alkalmazható a PBA-PCR egy tipikusan 10^{12} - 10^{14} különböző szekvenciával rendelkező oligonukleotidból álló aptamerkönyvtár amplifikálására. Ez a kérdés különösen érdekes volt annak tudatában, hogy az ilyen komplexitású DNS könyvtárak sokszorosítása már hagyományos PCR-rel is komoly kihívást jelent. Vizsgálatainkhoz három elrendezésben amplifikáltunk 1 nmolnyi oligonukleotid-könyvtárat, úm. ekvimoláris primertartalmú PCR, hagyományos aPCR és PBA-PCR. A reakciókat minden esetben 25-55 ciklusszámmal ismételtük, majd az elegyeket PAGE-vel elemeztük. Az ekvimoláris PCR-minták vizsgálata megerősítette az irodalmi adatokat: már a legkisebb ciklusszámnál sem tudtunk azonosítani határozott sávokat, egy 75-300 bp tartományban festődő, diffúz jelet detektáltunk (nem ismertett adat). Ehhez nagyon hasonló eredménnyel járt az aPCR is, míg a PBA-PCR-re sokszorosított könyvtár fő terméke még az 55. ciklus követően is a várt magaságban volt detektálható (6.17. ábra). A módszer általános alkalmazhatóságát ebben az esetben is megerősítettük, ugyanis további négy könyvtár sokszorosítása hasonló eredménnyel járt (nem bemutatott adat).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKESELÉSÜK



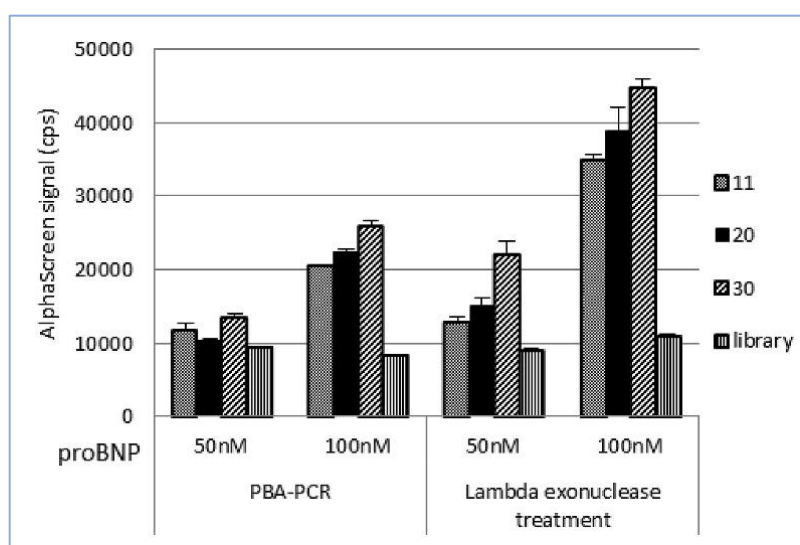
6.17. ábra Oligonukleotid-könyvtár amplifikációjából származó termékek aPCR (1), (3), (5), (7) és PBA-PCR (2), (4), (6), (8) alkalmazásával rendre 25, 35, 45 és 55 ciklusszámot követően. A dsDNS marker bázispár hosszúságban (M) [245].

A PBA-PCR specificitást fokozó hatására magyarázat lehet a teljes reakció során jelenlévő blokkolt limitáló primer. Az ekvimoláris és a hagyományos aszimmetrikus PCR-ben a primerek beépülnek a keletkező termékekbe, koncentrációjuk folyamatosan csökken, így a növekvő ciklusszám egyre inkább kedvez a fals DNS-hibridek kialakulásának, ez pedig végső soron a nem kívánatos DNS-fragmentek keletkezésének. A bemutatott adatok alapján feltételezhető, hogy a teljes PCR során konstans koncentrációjú blokkolt limitáló primer a nem kívánatos DNS-hibridek kialakulását gátolja.

Az eddig bemutatott, gélelektroforézis segítségével nyert adatok alapján kijelenthető, hogy a PBA-PCR nagymértékben növeli a PCR specificitását, arra azonban az eredmények nem adnak választ, az eljárás mennyire torzítja el a könyvtár oligonukleotid-összetételét. Az ún. PCR-torzítás (PCR bias) egy jól ismert jelenség, mely háttérben a különböző nukleinsav-szekvenciák különböző hatékonyságú amplifikációja áll, így a komplex nukleinsav-templátok sokszorosításakor a növekvő ciklusszámmal együtt nő a jól amplifikálódó szekvenciák mennyisége, míg ezzel párhuzamosan a rosszul amplifikálódó oligonukleotidok egyre inkább alulreprezentálttá válnak [246]. A SELEX alaphipotézise szerint az egyes ciklusok során fokozatosan emelt szelekciós nyomás a célmolekulához nagy affinitással kötődő oligonukleotidok dúsulásához vezet. Figyelembe véve a tényt, hogy a minden egyes ciklusban amplifikálni kell a kötődő DNS-eket, nem nehéz belátni, hogy a PCR-torzításnak végzetes következményei lehetnek a SELEX-re, amennyiben a folyamat során a célmolekulát szelektíven felismerő oligonukleotidok helyett a jól amplifikálódók szaporodnak fel a könyvtárban. Mindezek fényében elengedhetetlen volt annak tisztázása, milyen mértékű PCR-torzítást eredményez a PBA-PCR. A kérdésre a PBA-PCR-rel sokszorosított aptamerkönyvtár HT szekvenálásával tudtunk választ adni. A szekvenálási eredmények 203 795 oligonukleotid egyedi szekvenciáját tartalmazták, melyekből 203 433 egyetlen kópiaként volt jelen, ami több mint 99%-a az összes kópiának. Megjegyzendő, hogy a kémiai szintézissel létrehozott random DNS könyvtárakban csak elméletileg egyedi minden szekvencia, ezek a

könyvtárak is torzultak, így a szekvenálási adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a PBA-PCR gyakorlatilag nincs hatással a könyvtár komplexitására.

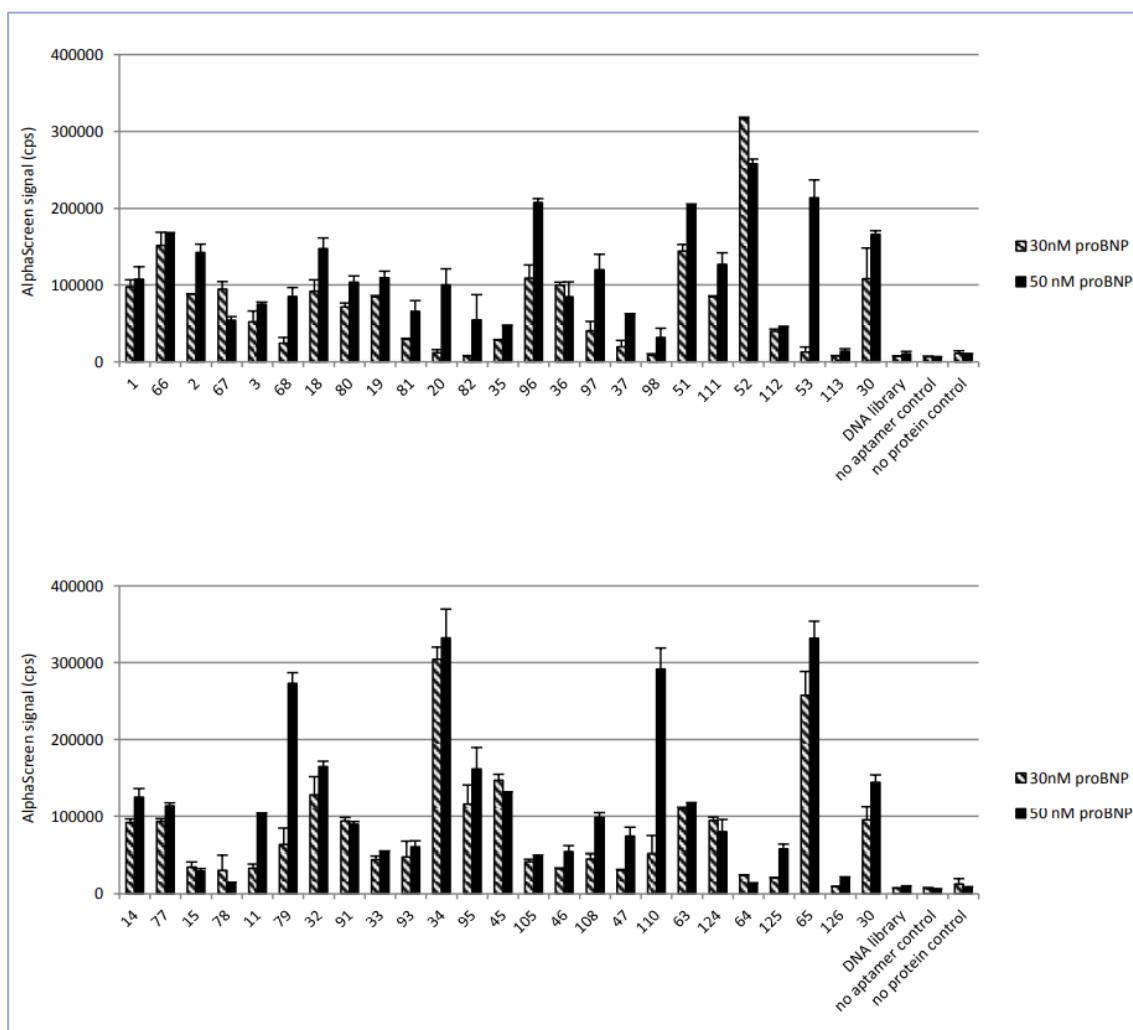
A módszerfejlesztés utolsó lépéseként összevetettük a PBA-PCR-t és az λ exonukleáz-kezelést, mint két alternatív ssDNS-szintetizáló rendszert. Munkacsoportunk ipari partnerünk számára proBNP-re szelektált aptamereket. Ezek célmolekulakötő-képességének vizsgálatához először a szelekció eredményeként kapott baktériumtelepek közül hárommal kolónia PCR-t végeztünk az oligonukleotid inszerteket hordozó vektorra specifikus primerekkel. A kolónia PCR-ből származó termékeket, illetve a kiindulási oligonukleotid-könyvárat templátként használva, a leírt módon, 5' biotinnal jelölt, feleslegben lévő primer alkalmazásával elvégeztük a PBA-PCR-t. A λ exonukleáz-kezeléshez szükséges dsDNS előállításához ekvimoláris mennyiségben alkalmaztuk, az 5' biotin és 5' foszforilált primereket, míg a templátok megegyeztek a PBA-PCR-nél jelzettekkel. A PCR-termék tisztítását követően λ exonukleáz hozzáadásával egyszerűsítettük a DNS-t. A kölcsönhatás-vizsgálathoz az AlphaScreen GST készletét alkalmaztuk, amely a streptavidinnel burkolt donor és GST antitesttel borított akceptor gyöngyökből áll össze. A mérési elegy a gyöngyök mellett a kétféle módszerrel szintetizált biotinjelölt ssDNS-t, illetve az *in vitro* transzlációval termelt GST-címkézett proBNP-ét tartalmazta. Az adott inkubációs időt követően leolvasott lumineszcens jelek, egyértelműen jelezték a SELEX sikerét, ugyanis 100 nM-os fehérjekoncentráció mellett az aptamerekkel kapott értékek a könyvtárnál látottak többszörösei voltak (6.18. ábra). A kísérleti célkitűzés szempontjából ugyanilyen fontos megfigyelés, hogy a két ssDNS-generáló módszer felhasználásával kapott eredmények egyforma tendenciákat mutattak, mindkét esetben a 30-as jelű aptamer rendelkezett a legnagyobb affinitással (6.18. ábra). Habár a jel:háttér arány tekintetében a λ exonukleáz megközelítés teljesített jobban, ugyanakkor egyszerű kivitelezhetőségének, alacsonyabb időigényének és jobb költséghatékonyágának köszönhetően mégis a PBA-PCR módszer tűnik az ideális ssDNA-szintetizáló módszernek.



6.18. ábra Három szelektált aptamerjelölt (11), (20), (30) proBNP-kötő képességének vizsgálata PBA-PCR-rel, illetve λ exonukleáz-kezeléssel előállított ssDNS-esekkel ALPHA módszerrel [245].

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

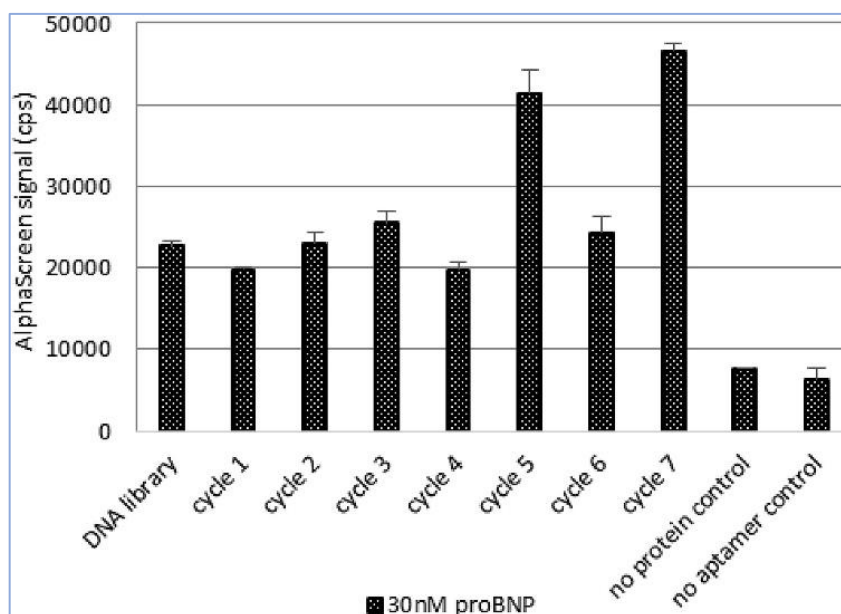
A kifejlesztett PBA-PCR-t először a szívelégtelenség diagnosztikájában biomarkerként alkalmazott proBNP-re kivitelezett SELEX során alkalmaztuk. Elsőként AlphaScreen-nel, a fentiekben részletezett módon, de nagyobb számú kolóniával végeztük az aptamerjelöltek szűrését, illetve His₆-címkézett fehérjét és Ni-kelát akceptor gyöngyöt alkalmaztunk a GST rendszer helyett. Az egyes oligonukleotidoknál látható lumineszcencia értékek jól illusztrálják az aptamerjelöltek egyedi, kísérletes karakterizálásának jelentőségét (6.19. ábra). A SELEX során izolált oligonukleotidok nem rendelkeznek azonos célfehérjekötő-képességgel, affinitásukban jelentős eltérések vannak, és ezek a különbségek csak kísérletes megközelítéssel válnak nyilvánvalóvá, így ez a lépés a sikeres aptamerszelekció elengedhetetlen része.



6.19. ábra proBNP-szelektív aptamerjelöltek szűrése PBA-PCR és ALPHA módszer alkalmazásával [245].

A SELEX egy olyan iteratív folyamat, melynek ismétlésszámát ideális esetben a célmolekulára szelektív oligonukleotidok dúsulása határozza meg. Az alacsony ismétlésszám sok esetben nem elegendő a célmolekulára szelektív oligonukleotidok felszaporításához, míg a túl magas ciklusszám a PCR-torzulásnak kedvez. Végeredményben mindkét forgatókönyv sikertelen aptamerszelekciót eredményezhet. Az optimális ismétlésszám becsléssel nem meghatározható, csakis az egyes SELEX

ciklusok dúsult oligonukleotid-könyvtárainak vizsgálatával lehetséges. Ezen feladatot az előző bekezdésben leírtak szerint végeztük el annyi eltéréssel, hogy a PBA-PCR templátjai a SELEX ciklusok oligonukleotid-könyvtárai voltak. A 6.20. ábra értelmezéséhez ismertetni kell a proBNP-specifikus aptamerek szelekciója során alkalmazott ún. Toggle-SELEX körülményeit. A szelekció során felváltva használtuk célmolekulaként a mágneses gyöngyhöz kapcsolt NT-proBNP egyik peptidmotívumát (1., 2., 3., 4., 6. ciklus), illetve a proBNP fehérjét (5., 7. ciklus). A szelekciós nyomás folyamatos növelése mellett egy negatív és egy kontraszelekciós lépést is beiktattunk a 4. és 5. ciklust követően. A negatív szelekciónál a célmolekulák immobilizálására használt gyönggyel, míg a kontraszelekciónál vérszérumban burkolt mágneses gyönggyel inkubáltuk az oligonukleotid-könyvtárat, majd a felülúszókat vittük tovább a következő szelekciós lépésbe, hogy növeljük az aptamerek szelektivitását. A növekvő SELEX ciklusszám egy tendenciózusan emelkedő lumineszcens jellel párosul, amit több helyen drasztikus visszaesés, illetve kiugró emelkedés tör meg. A 4. ciklustól vezettük be az intenzív, dextrán-szulfátot is tartalmazó mosási lépést, ami valószínűsíthetően a fehérjével erős, ionos, de nem szelektív kölcsönhatásokon keresztül kötődő oligonukleotidok elvesztését eredményezhette. Az 5. ciklust követő kontraszelekciós lépés vérszérumban található fehérjékkel kapcsolatba lépő oligonukleotidokat hivatott eltávolítani. A lumineszcens jel csökkenése arra utal, hogy az intenzív mosási lépés bevezetése sem volt elegendő a fehérjékkel nem szelektíven komplexet képező oligonukleotidok kizárására, a proBNP-hez kötődő aptamerjelöltek egy jelentős része egyéb fehérjékhez is kapcsolódni képes. Az 5. és 7. ciklus kiugróan magas lumineszcens jellemelkedésre magyarázatául szolgálhat, hogy e szelekciós lépések célmolekulája megegyezett az ALPHA mérésnél használttal, mindkét esetben a His₆-proBNP-t alkalmaztuk.



6.20. ábra proBNP-re kivitelezett SELEX egyes lépéseinek monitorozása PBA-PCR és ALPHA módszer alkalmazásával [245].

Az NT-proBNP diagnosztikára alkalmas aptamereket ipari partnerünk számára szelektáltuk, ezért az ehhez a kutatási témához kapcsolódó eredményeink részletei

nem kerülhetnek ismertetésre. Annyi azonban közölhető, hogy a fentebb leírt ALPHA módszer és a PBA-PCR kombinálásával olyan aptamereket sikerült azonosítanunk, amelyek az SPR mérések alapján 10 nM körüli K_D értékkel rendelkeznek, így jó eséllyel alkalmazhatók diagnosztikai fejlesztésre.

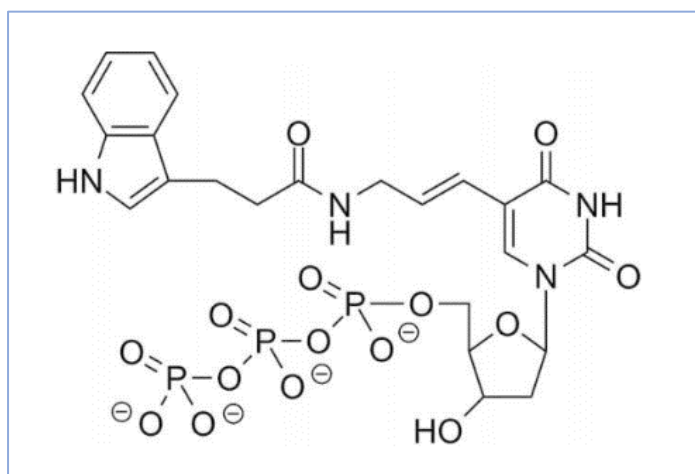
Az általunk kidolgozott primerblokkolt aszimmetrikus PCR alkalmazhatósága nem korlátozódik az aptamerszelekcióra, várakozásaink szerint a különböző próbákon alapuló valós-idejű PCR eljárások kimutatási határát is csökkenthetik. Egy közelmúltban megjelent publikáció alapján pedig az egy sejtes HTS-ek kivitelezése során növeli az eredményességet [247].

2.3. Aptamerkönyvtár előállítás módosított nukleotiddal

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

A mesterséges nukleotidokat tartalmazó oligonukleotid-könyvtárak – habár rendkívül magas áron – kereskedelmi forgalomban is elérhetők, ez azonban nem jelent megoldást az ilyen típusú aptamerek szelekciójára, hiszen a SELEX egyes ciklusaiban a dúsuló oligonukleotidokat a módosított nukleotidok megtartásával kell PCR-rel amplifikálni, így megkerülhetetlen a mesterséges nukleotidokat is beépítő termofil DNS polimerázok kiválasztása.

A tudományos közlemények több tucat különböző módosított nukleotiddal való kísérletről számoltak be, melyek alapján az aptamerszelekció kimenetelére való tekintettel egyértelműen az aminosavszerű oldalláncokkal rendelkező nukleotidok használata jár a legnagyobb sikerrel. Ezen információk birtokában a kereskedelmi forgalomban elérhető, a nukleotidnak triptofánszerű tulajdonságokat kölcsönző, indol oldallánccal rendelkező 5-Indolil-AA-dUTP (TAdUTP) alkalmazhatóságát vizsgáltuk (6.21. ábra) [248].



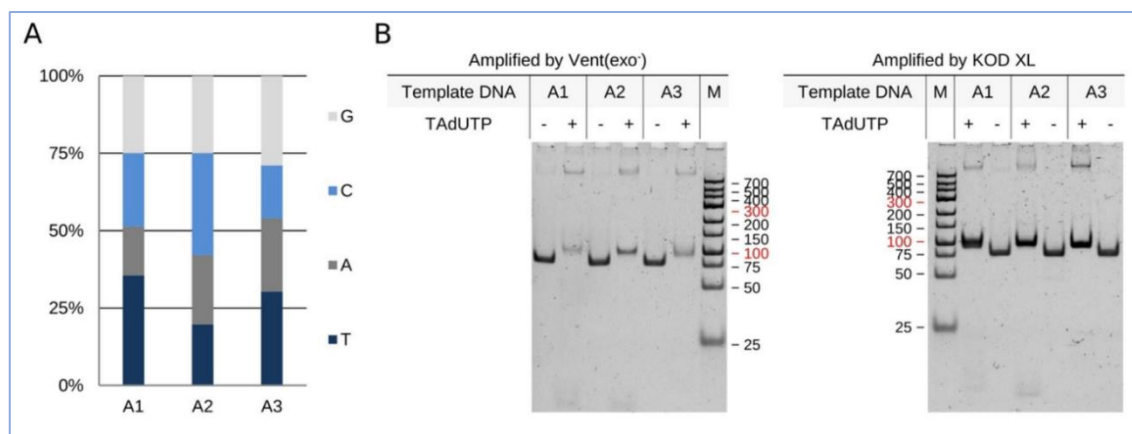
6.21. ábra Az 5-Indolil-AA-dUTP (TAdUTP) szerkezete [248].

Kísérleteink első célja a TAdUTP-t szubsztrátként elfogadó termofil DNS polimerázok azonosítása volt. Vizsgálataink során három különböző bázisösszetételű oligonukleotidot amplifikáltunk nyolc olyan polimerázzal, amelyek az előzetes publikációk alapján módosított nukleotidok beépülését is katalizálják (6.2. táblázat) [249] [250].

| A vizsgált termofil DNS polimerázok fő jellegzetességei és TAdUTP nukleotid beépítő képességük | | | | |
|--|----------------------------|------------------|---|--------|
| Polimeráz | 3'-5' exonukleáz aktivitás | TAdUTP beépítése | Jellegzetességek | Család |
| iProof | + | - | <i>Pyrococcus</i> -szerű enzim processzivitást fokozó Sso7 doménnel | B |
| OneTaq | + | - | Tag és Deep Vent polimerázok keveréke | A & B |
| Vent(exo-) | - | + | <i>Thermococcus litoralis</i> enzim | B |
| PWO Superyield | + | - | <i>Pyrococcus woesei</i> enzim | B |
| Q5U | + | - | Magas hőségű enzim Sso7d doménnel fúzionálva | B |
| KOD XL | +/- | + | KOD és KOD(exo-) enzimek keveréke | B |
| Pfu | + | - | <i>Pyrococcus furiosus</i> enzim | B |
| Therminator | - | - | 9°N exo- variáns | B |

6.2. táblázat A vizsgált termofil DNS polimerázok főbb jellegzetességei és TAdUTP-beépítő képessége. [248].

A PCR-t követő PAGE eredmények nyomán egyértelműen kijelenthető, hogy a vizsgált polimerázok közül csak kettő, a Vent(exo-) és a KOD XL fogadta el a reakcióelegyben dTTP-t helyettesítő módosított nukleotidot (6.22. ábra és nem bemutatott adatok).



6.22. ábra Aptamerek amplifikációja Vent(exo-) és a KOD XL enzimekkel, dTTP, illetve TAdUTP jelenlétében.

(A) A templátként használt aptamerek nukleotidösszetétele. (B) Aptamerek amplifikációja Vent(exo-)-val. (C) Aptamerek amplifikációja KOD XL-lel. A dsDNS marker bázispár hosszúságban (M) [248].

Habár mindkét enzim a nukleotidösszetételtől függetlenül katalizálta a DNS-szintézist, a Vent(exo-) esetében a hatékonyság jelentősen alacsonyabb volt a TAdUTP tartalmú mintákban, míg a KOD XL polimerizációs hatékonyságában ilyen eltérés nem volt megfigyelhető. A két enzim közös jellemzője, hogy egyik sem rendelkezik 3'-5' exonukleáz aktivitással, így feltételezhetjük, hogy a DNS polimerázok hibajavításért felelős doménje felismeri és eltávolítja TAdUTP-t. Érdeemes megemlíteni, hogy a Therminator nevű enzim sem rendelkezik 3'-5' exonukleáz aktivitással, ennek ellenére

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

sem működött vele a DNS-szintézis a mesterséges nukleotidot tartalmazó mintákban, jelezve, hogy a hibajavító domén hiánya szükséges, de nem elégséges feltétele a TAdUTP elfogadásának (6.2. táblázat). A vizsgált enzimek a korábban között kísérletekben mesterséges nukleotidokkal is katalizálták a DNS-polimerizációt, míg esetünkben közülük csak kettő mutatott ilyen aktivitást. A látszólagos ellentmondás magyarázatául szolgálhat, hogy a hivatkozott publikációk egyikében sem alkalmaztak aromás aminosavszerű oldalláncot hordozó nukleotidokat.

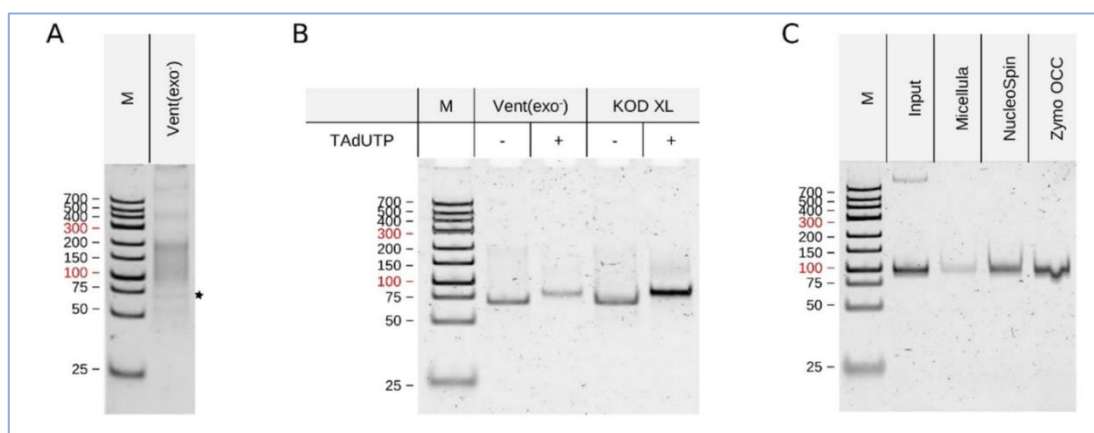
Az előzőkben nem emeltem ki, hogy a 6.22. ábrán a természetes és mesterséges nukleotidot tartalmazó DNS-ek eltérő migrációs sebességgel mozogtak a PAGE-ben, ami az oligonukleotidok megváltozott fizikokémiai tulajdonságára utal. Ezt a megváltozott tulajdonságot olvadási görbeanalízissel is megerősítettük, mégpedig oly módon, hogy a három fentebb is tanulmányozott oligonukleotidot KOD-XL-lel, SYBR Green (SG) (*N',N'*-dimetil-*N*-[4-[(*E*)-(3-metil-1,3-benzotiazol-2-ylidene)metil]-1-fenilquinolin-1-ium-2-yl]-*N*-propilpropén-1,3-diamin) DNS-interkaláló festék jelenlétében valós idejű PCR készülékben amplifikáltuk. A PCR-t követően 60 °C-ról fokozatosan 95 °C-ra emeltük a hőmérsékletet miközben mértük a fluoreszcencia intenzitását. Az eredmények kiértékelése mindhárom oligonukleotid esetén 5-10 °C-os T_m csökkenést jelzett, ami arra utal, hogy a nukleotidhoz kapcsolt nagyméretű, apoláris indol csoportok következtében a kettős spirál szerkezete megváltozik, a Watson-Crick bázispárok közötti hidrogénhid kötések ereje gyengül (6.3. táblázat).

| A TAdUTP beépülése csökkenti az olvadási hőmérsékletet | | | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | A1 | | A2 | | A3 | |
| TAdUTP | - | + | - | + | - | + |
| $T_m \pm SD$ [°C] | 88.64 ± 0.03 | 78.74 ± 0.07 | 89.60 ± 0.03 | 82.2 ± 0.05 | 89.00 ± 0.03 | 83.55 ± 0.05 |

6.3. táblázat A TAdUTP beépülése nyomán bekövetkező olvadási hőmérsékletváltozás három különböző dsDNS termék esetében [248].

Amint azt a dolgozat korábbi részében már tárgyaltam a nagy komplexitású DNS könyvtárak amplifikációja olyan mértékű műtermék-képződéshez vezet, ami a könyvtárat használhatatlanná teszi (6.23. ábra). A nem kívánatos DNS-fragmentek felszaporodását meggátolhatjuk az olaj-víz emulziós PCR (ePCR) segítségével. Az eljárás során egy speciális olajkeveréket állítunk össze a PCR-eleggyel, minek következtében nagyságrendileg 10^9 kompartment alakul ki, így tulajdonképpen ennyi mikroreaktort, azaz elkülönült PCR-t hozunk létre egyetlen csőben [251]. A módszer alkalmazhatóságát vizsgálándó a kereskedelmi forgalomban elérhető ePCR-készlettel (Micellula DNA Emulsion & Purification Kit (Roboklon)) állítottuk össze a reakcióinkat, melyekhez a két bevált DNS polimerázt és természetes dNTP-éket, illetve dTTP helyett TAdUTP tartalmazó oldatokat adtuk hozzá. A reakciótermékek PAGE analízise a várakozásainknak megfelelő eredményt mutatott, mindkét enzimmel, illetve mindkét dNTP-eleggyel egy határozott sávot láttunk a gélen (6.23. ábra). A szintetizált DNS-ek migrációs sebessége és a polimerizáció hatékonysága is összhangban volt korábbi megfigyeléseinkkel, amennyiben a módosított nukleotid beépülése lassította a DNS vándorlását, illetve a KOD-XL polimerizációs aktivitását nem csökkentette TAdUTP jelenléte (6.23. ábra). Habár a GelGreen festés alapján a KOD-XL produktívabb tűnik TAdUTP tartalmú

reakciókban, a szintetizált DNS mennyiségére nem vonhatunk le egyértelmű következtetéseket, ugyanis a markánsabb jel háttérben a festék sajátos fiziko-kémiai tulajdonságú DNS-hez való erősebb kötődése is állhat.



6.23. ábra Aptamerkönyvtárak amplifikációja *Vent(exo-)* és *KOD-XL* enzimekkel emulziós PCR alkalmazásával.

(A) Amplifikáció hagyományos PCR-rel, dTTP jelenlétében. A várt bázispárhosszúságú termék csillaggal jelölve. (B) Amplifikáció a két különböző enzimmel dTTP, illetve TAdUTP hozzáadásával. (C) Módosított nukleotidot tartalmazó aptamerkönyvtár tisztítása három, kereskedelmi forgalomban elérhető készlet alkalmazásával. A dsDNS marker bázispár hosszúságban (M) [248].

Az ePCR-rel szintetizált, módosított nukleotidot tartalmazó DNS-ek fiziko-kémia jellegzeteségei egy gyakorlati jelentőségű problémát is eredményeztek. Az ePCR olajkomponensei membránokon vagy gyöngyökön alapuló metodikával eltávolítandók a DNS további felhasználását megelőzően. Az ePCR-készlethez biztosított membránnal kivitelezett DNS-tisztításunkat nagyon alacsony hatásfokúnak találtuk, ami abban a tekintetben nem meglepő, hogy a száz nukleotidnál kisebb nukleinsavak szeparálása általában is különleges kihívás, amit jelen esetben tovább nehezített, hogy az alkalmazott készletet természetes nukleotidokból felépülő DNS izolálására optimalizálták. Az oligonukleotid-izoláció kitermelését növelendő további két kommersz szilikamembránon alapuló DNS-tisztító rendszert teszteltünk, és a megfelelő készlet alkalmazásával az amplifikált aptamerkönyvtár tisztításának hatékonyságát többszörösére emeltük (6.23. ábra).

Az eddig ismertetett eredmények azt jelzik, hogy a *Vent(exo-)* és *KOD-XL* enzimek a polimerizáció során beépítik a TAdUTP-t, és az ePCR alkalmazásával hatékonyan előállítható a módosított nukleotidot tartalmazó aptamerkönyvtár, arra azonban nem adnak választ, hogy a TAdUTP mennyire változtatja meg a két polimeráz replikációs hűségét. A kérdés tisztázására ismételten a HT szekvenálást hívtuk segítségül.

Elsőként az egyes oligonukleotidok amplifikációja nyomán keletkezett DNS-fragmenteket szevenáltattuk. A kapott adatokkal elvégzett számítások az előzetes közleményekkel gyakorlatilag megegyező replikációs hűséget igazoltak mindkét polimeráz esetében, és ezt az értéket érdemben TAdUTP jelenléte sem befolyásolta (6.4. táblázat) [252] [253]. A következőkben a dTTP, illetve TAdUTP hozzáadásával amplifikált

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

oligonukleotid-könyvtár szekvenálását végeztettük el, és azt találtuk, hogy mindkét enzim esetében, mindkét nukleotid jelenlétében az összes oligonukleotid, mintegy 99%-a egyetlen kópiában volt jelen, így megállapítható, hogy a dTTP módosított nukleotiddal való helyettesítése a könyvtár komplexitását sem csökkentette (nem bemutatott adat). Az amplifikált oligonukleotidok nukleotidösszetételének elemzése érdekes eredményre vezetett: úgy tűnik, a két polimeráz eltérő nukleotidpreferenciával rendelkezik. A KOD-XL nem torzítja a kémiai szintézissel létrehozott könyvtár elvárt 1:1:1:1, dATP:dTTP:dGTP:dCTP összetételét, míg a Vent(exo-) közreműködésével felsokszorosított oligonukleotidokban túlsúlyba kerültek az A:T bázispárok, vagyis úgy tűnik, hogy ez utóbbi enzim hatékonyabban használja az dATP-t vagy dTTP-t (6.4. táblázat). A két polimeráz nukleotidpreferenciájában látható különbségek eltűnnek, amint a dTTP-t TAdUTP helyettesíti, és mindkét amplifikált könyvtárban némi túlsúlyba kerülnek a guanozin és citozin nukleotidok (6.4. táblázat). Ez azt is jelenthetné, hogy a SELEX egyes PCR lépései során a dúsuló könyvtárból folyamatosan kiszorul a TAdUTP, így a vázolt megközelítés nem alkalmas módosított nukleotidot tartalmazó aptamerek szelekciójára. A laboratóriumunkban folyamatban lévő, vírusfehérjére kivitelezett SELEX azonban eloszlatta ezen aggályunkat, mivel a szelekció egyes lépései során az adenin- és timin-nukleotidok arányának folyamatos emelkedését látjuk (nem bemutatott eredmények). Ez az eredmény azt a feltételezésünket is megerősíti, hogy az aminosavszerű oldallánccal rendelkező nukleotidok központi elemei lehetnek az aptamer-fehérje komplexek kialakításának. Ennek megfelelően, terveink szerint a továbbiakban TAdUTP-tartalmú aptamerek szelekciójára fókuszálunk.

| A A Vent(exo-) és KOD-XL polimerázok hibázási aránya dTTP, illetve TAdUTP jelenlétében | | | | |
|---|---------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Vent(exo-) | | KOD XL | |
| | – | + | – | + |
| TAdUTP | – | + | – | + |
| Error rate observed \pm SD [$\times 10^{-6}$] | 555 \pm 398 | 418 \pm 343 | 256 \pm 153 | 336 \pm 192 |
| Published error rate [$\times 10^{-6}$] | 200 ^[17] | | 3–4 < Taq ^[10] | |
| Ratio of unique sequences to all filtered reads [%] | 98.93 | 99.08 | 98.96 | 99.00 |
| B dTTP, illetve TAdUTP jelenlétében amplifikált könyvtárak nukleotid összetétele | | | | |
| | Vent(exo-) | | KOD XL | |
| | – | + | – | + |
| TAdUTP | – | + | – | + |
| A [%] | 27.10 | 22.50 | 25.00 | 22.30 |
| T [%] | 27.20 | 22.10 | 25.30 | 22.20 |
| G [%] | 22.70 | 27.80 | 24.50 | 27.90 |
| C [%] | 23.00 | 27.60 | 25.10 | 27.70 |

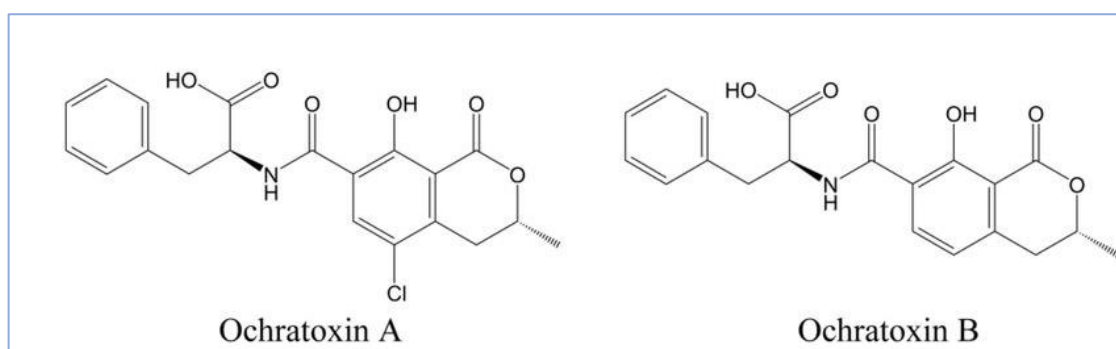
6.4. táblázat A polimerizáció hűségének vizsgálat HTS-sel.

(A) A polimerizáció hűségének változása TAdUTP hozzáadására Vent(exo-) és KOD-XL esetében. (B) Az amplifikált könyvtár nukleotidösszetételének változása TAdUTP hozzáadására Vent(exo-) és KOD-XL esetében [248].

3. Diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelekciója és alkalmazása

3.1. Kismolekulára szelektív aptamerek

Első SELEX kísérletünk az akkori munkahelyem profiljának megfelelően egy élelmiszer-diagnosztikailag kiemelten fontos mikotoxin detektálását lehetővé tevő aptamerek szelekciójára irányult. Az ochratoxin A (*N*-[(3*R*)-(5-kloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-izokromanil)karbonil]-l-fenilalanin) (OTA) egy olyan 403,81 Da tömegű molekula, melyet az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség több faja is termel (6.24. ábra) [254]. Az OTA felfedezése óta folyó intenzív toxikológiai kutatásoknak köszönhetően ismert, hogy a molekulának többek között teratogén, immunszuppresszív, neurotoxikus és karcinogén hatása van, és az is leírták, hogy az OTA-kitettségek minden vizsgált állatfajban nefrotoxicitást okoz [255]. Az OTA sokrétű károsító hatása már alacsony dózisonál jelentkezhet, így a megengedhető napi OTA-bevitel felső határa 5 ng/testsúly kg, ennek megfelelően az élelmiszerek megengedett OTA-szintje szigorúan szabályozott. Az OTA-koncentráció meghatározására hagyományosan vékonyréteg kromatográfiát, illetve nagynyomású folyadékkromatográfiát alkalmaznak. E nagy tapasztalatot és dedikált laboratóriumot igénylő metódikák alternatívájaként az utóbbi időben megjelentek a különböző OTA-specifikus ellenanyagokon alapuló, kompetitív immunokémiai eljárások is, azonban ezek nagyrésze élelmiszer-diagnosztikai célokra nem engedélyezett [256]. Munkánkkal azt vizsgáltuk, hogy izolálhatók-e OTA-szelektív oligonukleotidok, és mennyiben használhatók az OTA detektálására [257].



6.24. ábra Az ochratoxin A (OTA) és B (OTB) szerkezete.

A SELEX-et megelőzően célmolekulánkat, az OTA-t karbodiimides aktiválást követően karboxil csoportján keresztül a primer aminocsoporttal rendelkező EAH Sepharose 4B ágyhoz kapcsoltuk. Az OTA hordozójaként egy olyan ágyat választottunk, amelyen az aminocsoport egy 11 atomos távtartón keresztül rögzül, minek eredményeként a kisméretű célmolekula megfelelő távolságra van a gyöngy felületétől, így a szelekció során az oligonukleotid-célmolekula komplex kialakulását az ágy szterikusán várhatóan nem gátolja.

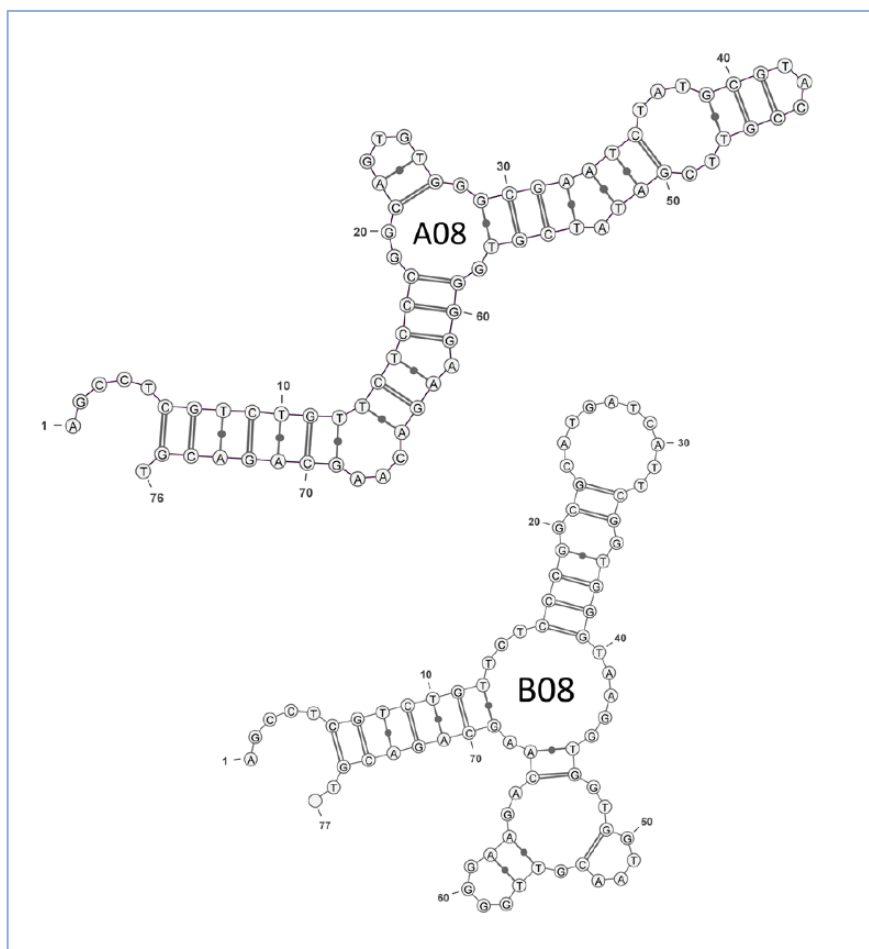
Az OTA-szelektív aptamereket 1 nanomol, elméletileg 10^{14} különböző szekvenciával rendelkező 76 nukleotid hosszúságú oligonukleotidból álló könyvtárból izoláltuk. A 15 ciklusból álló SELEX során – növelendő a célmolekulához nagyobb

affinitással kötődő oligonukleotidok populációját – folyamatosan csökkentettük az OTA-borított ágy mennyiségét. A szefarózhoz kapcsolódó oligonukleotidokat a 4., 8. és 12. ciklust követő negatív szelekció beiktatásával igyekeztünk eltávolítani. Ezeknél a lépéseknél az oligonukleotidokat EAH Sepharose 4B-vel inkubáltuk, és a felülúszókat vittük tovább a SELEX következő ciklusába. Az OTA-burkolt ágyakhoz kapcsolódó oligonukleotidokat alkalikus oldattal eluáltuk, majd a sótalanító oszloppal történő puffercserét követően a kiindulási könyvtárnak megfelelő jelöletlen szensz, illetve biotinilált antiszensz primer hozzáadásával PCR-rel amplifikáltuk. A kétszálú DNS-termékeket sztreptavidinborított mikrotiter lemezen immobilizáltuk, a következő SELEX ciklusba továbbviendő egyszálú oligonukleotidokat pedig alkalikus kezeléssel mostuk le a lemezről. A szelekció lezárulása után az amplifikált oligonukleotidokat klónozó vektorba illesztettük, és az inszertek nukleinsav-szekvenciáját meghatároztattuk.

A szekvenálási eredményeken alapuló *in silico* analízis igazolta, hogy a szelekció során több tekintetben is dúszult a kiindulási könyvtár. Egyrészt a guanozinban gazdag oligonukleotidok váltak dominánssá, másrészt az A08 és B08 kóddal jelölt aptamerek több kópiában is megjelentek. A guanozinban gazdag szekvenciák az aptamerekben gyakran előforduló G-quadruplex jelenlétére utalhatnak, az ilyen struktúrák prediktálására alkalmazható QGRS Mapper alkalmazás a két leggyakrabban előforduló oligonukleotid esetében azonban nem igazolta vissza ezt a feltételezést [258]. A B08 esetében a program egy nagyon alacsony értékszámúval rendelkező, ezért kis valószínűséggel kialakuló G-quadruplexet azonosított, míg A08 jelű aptamerben egyáltalán nem talált ilyen másodlagos szerkezetet. Megjegyzendő, hogy a program maximálisan 45 nukleotid hosszúságú egységekben keresi a G-quadruplexet, így jelenlétük az *in silico* analízis eredménye ellenére sem volt kizárható a nevezett 76 nukleotidból álló aptamerek esetében. Annak érdekében, hogy kísérletes bizonyítékok is rendelkezésünkre álljanak a G-quadruplex hiányra, illetve esetleges meglétére vonatkozóan, ezeknek a struktúráknak egy sajátos optikai tulajdonságát használtuk ki. A hiperkromicitás, azaz dsDNS 260 nm-en mért abszorbanciájának denaturáció hatására bekövetkező növekedése egy régóta ismert jelenség. A G-quadruplex megbontása során egy ezzel éppen ellentétes változás figyelhető meg. Amennyiben a G-quadruplex szerkezettel rendelkező DNS optikai denzitását 295 nm-en mérjük, a hőmérsékletemelkedés csökkenő fényelnyeléssel, hipokromacitással párosul [259]. A jelenséget kihasználva vizsgáltuk az A08 és B08 aptamerek szerkezetét, és a hőmérséklettel együtt emelkedő abszorbanciaérték megerősítette a QGRS Mapper által jóslott G-quadruplex-hiányt (nem bemutatott adat).

A Watson-Crick bázispárosodási szabályt követő térbeli szerkezetek esetleges kialakulását prediktálandó egy másik, interneten elérhető alkalmazást hívtunk segítségül. Az mfold szerver a szerkezet kialakulása során bekövetkező szabadentalpia-változások figyelembe vételével rangsorolja a szóba jöhető másodlagos szerkezeteket [260]. Az alkalmazás alapján mindkét aptamer esetében egy több szárból és hurokból álló szerkezet kialakulása járt legnagyobb szabadentalpia-változással, és a két jóslott struktúra közötti hasonlóság annyiban kimerült, hogy az egyik szár kialakításában részt vett 7-7, az oligonukleotid-könyvtár 5' és 3' végén található rögzített nukleotid (6.25. ábra). Az A08

és B08 nagyfokú nukleinsav-szekvencia és térszerkezeti eltérései arra utalnak, hogy az OTA-hoz teljesen különböző szerkezetű aptamerek kötődhetnek.



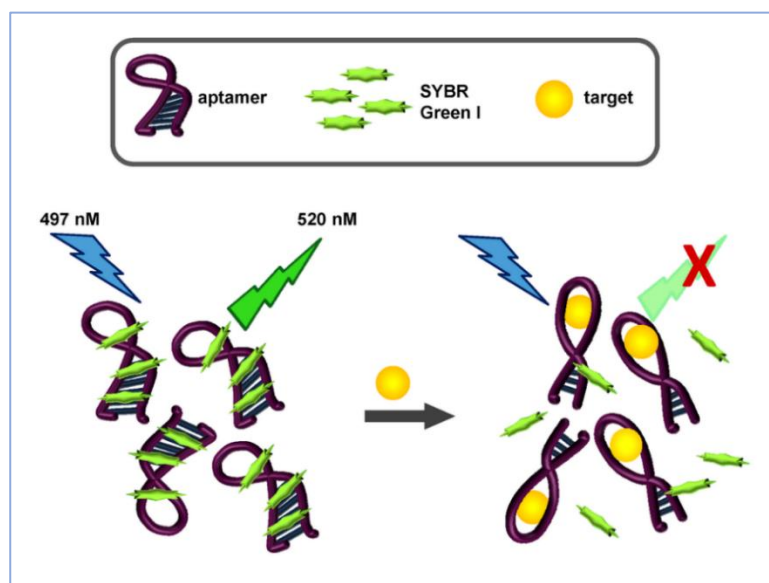
6.25. ábra Az OTA-szelektív aptamerek jóssolt másodlagos szerkezete [257].

Az A08 és B08 aptamerek további vizsgálataihoz kapcsolódó mérések túlnyomó része a kanadai együttműködő partnerünk laboratóriumában került kivitelezésre. Első lépésként izokratikus elúcióval meghatároztuk az aptamer-OTA komplexek disszociációs állandóját. Ennek során az OTA a fentiekkel megegyező eljárással, EDC-aktiválást követően került kapcsolásra az aminocsoporttal rendelkező mágnesezhető DynaMag-2 gyöngyre. A mágnesezhető gyöngy alkalmazása két szempontból is előnyös: egyrészt az alkalmazandó kistérfogatú ág elválasztása mágneses szeparálással jelentősen könnyebben kivitelezhető, másrészt a szelekció és K_D meghatározás során alkalmazott eltérő immobilizációs felület csökkenti annak az esélyét, hogy a gyöngy és az oligonukleotid közötti esetleges kölcsönhatás fals értékek meghatározásához vezessen. A kölcsönhatás-vizsgálathoz az OTA-burkolt mágneses gyöngyöket változó koncentrációjú 5' végen fluoreszcenciával jelölt aptamerrel inkubáltuk egy órán át, és az OTA-hoz kötődött aptamereket három mosási lépést követően 90 °C-os hőkezeléssel eluáltuk. Az eluátum fluoreszcenciaintenzítését megmértük, és a kapott adatokból 1:1 ligand:receptor sztöchiometriával számolva az A08 és B08 aptamerekre rendre 290 ± 150 és 110 ± 50 nM-os K_D értékeket kaptunk. A magas, 50% körüli szórási értékek ezzel a metodikai megközelítéssel, és különösen kismolekulák esetében nem szokatlanok [261].

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKESELÉSÜK

A K_D értékek nagyságrendi értéke esetünkben elegendő információt nyújtott, így más pontosabb, de költségesebb, illetve nehezebben kivitelezhető módszerrel ez az adat nem került meghatározásra.

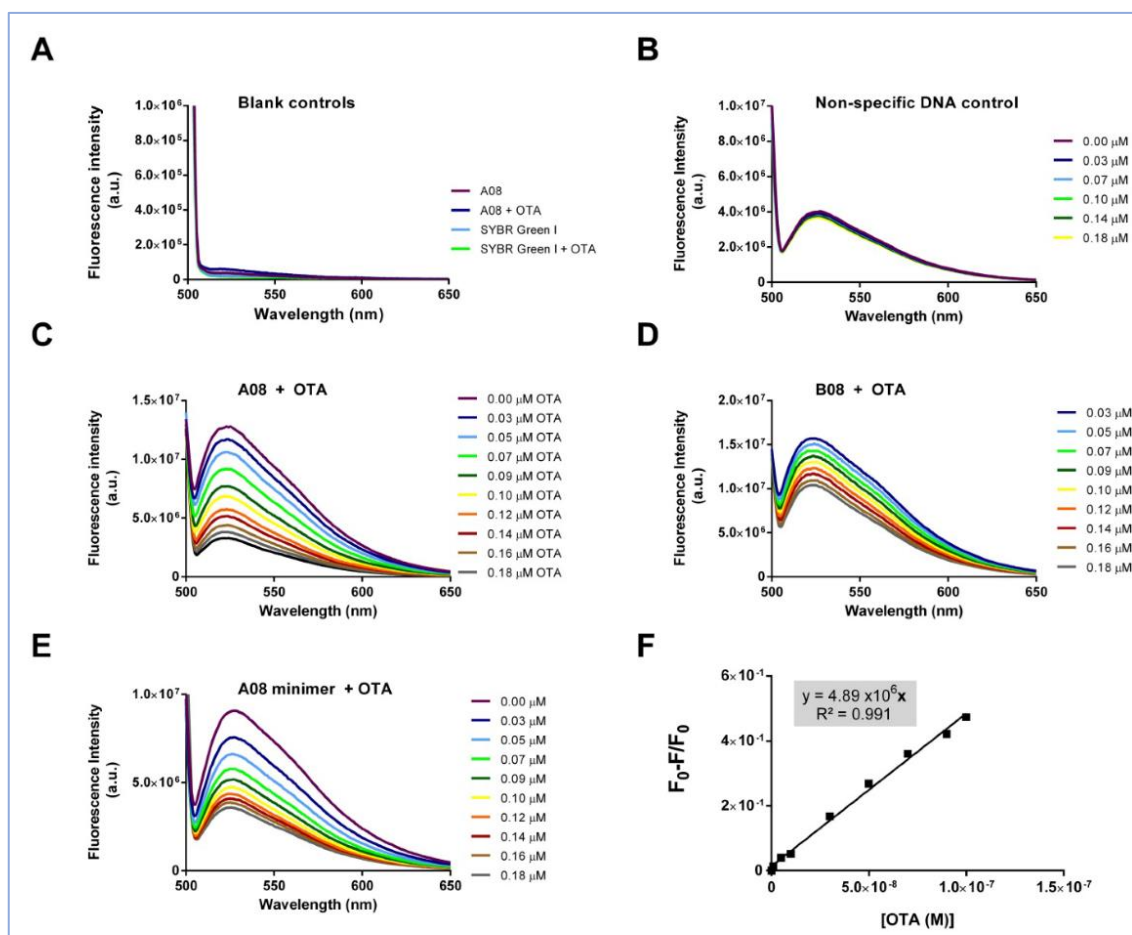
Az aptamereink gyakorlati alkalmazására egy olyan korábban már közölt, rendkívül egyszerű elrendezést kívántunk tesztelni, mely alapját az általánosan használt, dsDNS-be történő interkalálódásakor fluoreszcenssé váló festék, a SG biztosítja [262]. Az aptamerek célmolekulájukkal való kapcsolódásuk nyomán gyakran szerkezeti változáson mennek keresztül, illetve a célmolekula közvetlenül is versenghet az SG-kötőhelyért, így csökkenhet a DNS-sel komplexet képző SG mennyisége, és ezzel párhuzamosan változhat a detektálható fluoreszcens jel intenzitása (6.26. ábra).



6.26. ábra Aptamer-célmolekula kötés SG alapú detektálásának elvi alapja [257].

Első lépésként megvizsgáltuk, hogy az elegybe kerülő komponensek, úm. OTA, SG, aptamer külön-külön, illetve az OTA és SG együtt milyen mértékű fluoreszcens jelet generálnak, és igazoltuk, hogy egyik esetében sem detektálható fluoreszcencia a számunkra releváns 500-600 nm-es tartományban (6.27. ábra). Az A08 aptamert és SG-t tartalmazó oldat mérése során a várakozásoknak megfelelően magas fluoreszcencia volt látható, és a jel az OTA-koncentráció növelésével csökkenő tendenciát mutatott (6.27. ábra). Érdekes módon a disszociációs állandója alapján jobb paraméterekkel rendelkező B08 aptamer kevésbé érzékenyen reagált az OTA-koncentráció változására, a fluoreszcenciaintenzitás változása mintegy másfélszeres volt szemben az A08-nál látott öt-hatszoros jelcsökkenéssel (6.27. ábra). A két mérési eredmény olyan értelemben nem mond ellent egymásnak, hogy elképzelhető, hogy a B08 OTA kötése kisebb szerkezetváltozással jár együtt, mint az A08 esetében, így kevésbé jelentősen változik a SG-kötés mértéke. A mérés szelektivitását igazolta, hogy a kontrollként használt, OTA-hoz nem kötődő oligonukleotid esetében az SG jelenlétében mérhető fluoreszcencia nem változott az OTA hatására (6.27. ábra). Az aptamerek kurtítása, azaz a primer régiók eltávolítása rövidebb, költséghatékonyabb módon előállítható oligonukleotidokat eredményez, azonban a csonkolás az aptamer

funkcionalitását mind negatív, mind pozitív irányba megváltoztathatja. A mérések alapján kijelenthető, hogy az OTA hozzáadására érzékenyebben reagáló A08 aptamer rövidített változata (A08mini) az eredeti, teljes hosszúságúhoz hasonló fluoreszcenciaintenzitásváltozást mutatott az OTA-koncentráció függvényében (6.27. ábra). A kurtított aptamerrel kivitelezett mérések adatai az OTA-t nem tartalmazó vak mintával történő normalizálással is ábrázolásra kerültek, és ezek alapján az eljárás 9-100 nM tartományban használhatónak bizonyult az OTA koncentrációjának meghatározására (6.27. ábra).



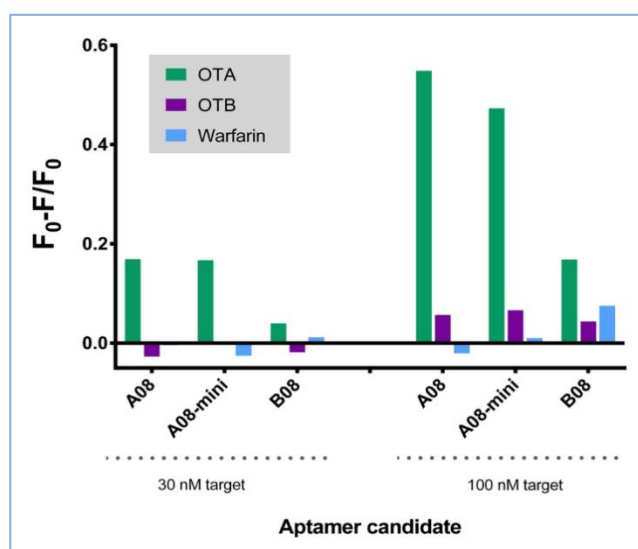
6.27. ábra OTA-koncentráció meghatározása a szelektált aptamerek és SG alkalmazásával.

Mérések során alkalmazott komponensek fluoreszcenciaintenzitása. (A) Az OTA-hoz nem kötődő kontroll aptamer (B), A08 (C) B08 (D) csonkolt A08 (E) és SG tartalmú elegy fluoreszcenciaváltozása az OTA koncentrációjának függvényében. (F) A csonkolt A08 aptamer lineáris méréstartományának meghatározása ($y = 4,89 \times 10^5 x$; $R^2 = 0,991$) [257].

A bemutatott kísérletek igazolták, hogy a szelektált oligonukleotidok nagy affinitással kötődnek célmolekulájukhoz, arra azonban nem adnak választ, hogy az aptamerekkel szemben támasztott másik kritériumnak, a magas szelektivitásnak mennyiben felelnek meg. A kérdés tisztázására OTA mellett ochratoxin B (OTB), illetve a célmolekulához szerkezetileg nagyon hasonló warfarin hozzáadásával is megvizsgáltuk a fluoreszcenciaváltozást. Az A08, A08mini és B08 aptamerek egyaránt egyértelmű OTA-

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

preferenciát mutattak, ezekben a mintákban látható a legnagyobb fluoreszcenciaváltozás (6.28. ábra). A 100 nM-os warfarin-, illetve OTB-koncentrációknál az is megfigyelhető, hogy a nagyobb affinitással rendelkező, de az OTA-koncentrációmérések során gyengébben teljesítő B08 aptamer szelektivitás tekintetében is rosszabbul teljesít, ugyanis az OTA adására bekövetkező jelintenzitás-változás csak kétszer-háromszor magasabb a warfarinnál és OTB-nél látottaknál. Az A08 aptamer mindkét változata sokkal egyértelműbben tesz különbséget a vizsgált kismolekulák között, a warfarinhoz képest harminc-negyvenszeres, míg az OTB-hez képest hatszoros-tízszerezes intenzitásváltozás volt detektálható. A hatszoros-tízszerezes különbség talán nem tűnik jelentősnek, de figyelembe véve a molekulák szerkezetét – a warfarinnál a fenilalanin helyett fenil csoport található, az OTB pedig egyetlen klóratomban különbözik az OTA-tól – kijelenthető, hogy az A08 aptamer alacsony K_D -je magas szelektivitással is párosul.



6.28. ábra Az aptamerek szelektivitásának vizsgálata [257].

Munkánk kezdetekor még nem voltak elérhetőek OTA-szelektív aptamerek, eredményeink közzétételét megelőzően azonban már másik két csoport is leírt hasonló affinitási és szelektivitási paraméterekkel rendelkező aptamereket [263][264]. Munkacsoportunk a közlemény megjelenése óta nem foglalkozik mikotoxinokkal, azonban az A08 aptamer több publikáció tanúsága szerint is alkalmazásra került. Egy mikrotermoforézis-mérésen alapuló összehasonlító tanulmány megerősítette a fentebb ismertetett K_D értékeket, és azt is demonstrálta, hogy az itt bemutatott A08 aptamer disszociációs konstansa mintegy fele a másik laboratóriumban szelektált aptamereknél látott adatoknak [265]. Ezeknél az eredményeknél még fontosabb, hogy az A08 aptamer alkalmazhatóságát két különböző metodikai megközelítéssel is igazolták. Az első esetben mikrofluidikai csatornában hoztak létre egy szendvics elrendezésű OTA-t mérő rendszert az A08 aptamer segítségével [266]. A második megközelítésben *lateral flow assay*-ben alkalmazásra kerülő arany nanorészecskéket módosítottak ugyanezzel az aptamerrel [267]. Egy további kutatócsoport a méréseink szerint kevésbé hatékony B08 aptamer felhasználásával grafén alapú szteganografikus eljárást fejlesztett mikotoxinok biofilmből történő kimutatására [268].

3.2. Vírus szelektív aptamerek

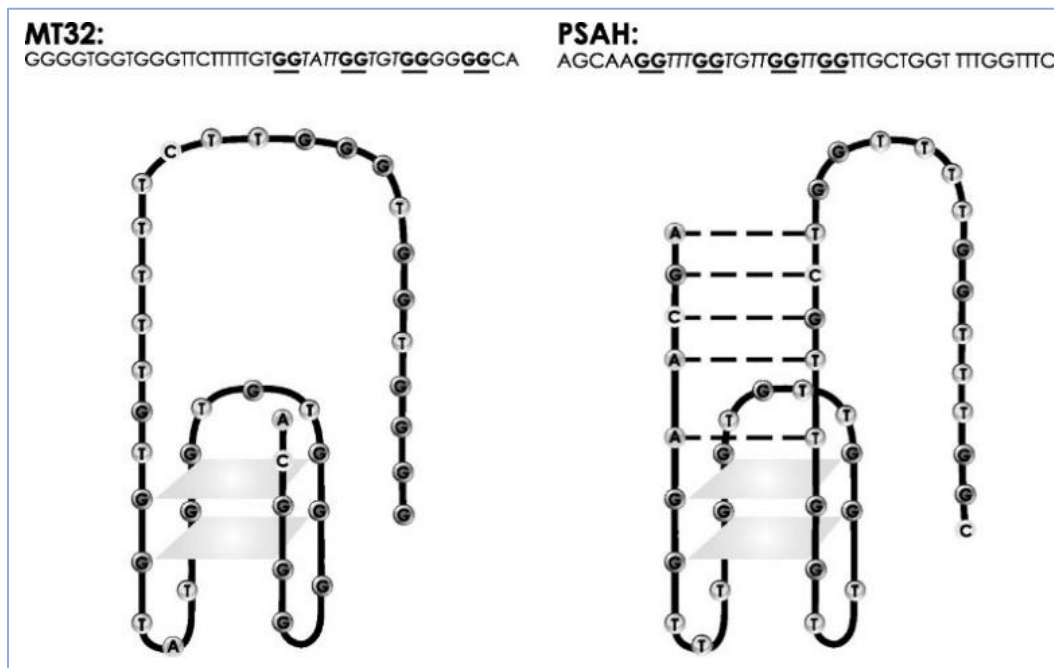
3.2.1. Alma törzsgödrosödés vírus

A vírusok aptamerekkel történő azonosítására irányuló kutatásaink kezdetén egy humán patogénitással nem rendelkező, könnyen hozzáférhető növényi vírust, nevezetesen az alma törzsgödrosödés vírust (Apple stem pitting virus, ASPV) választottuk kísérleteink alanyául. Az ASPV az egyszálú pozitív RNS-vírusokat magába foglaló *Foveavirus* nemzetség tagja, elektronmikroszkóp alatt 15 nm széles és 800 nm hosszú filamentum formájában figyelhető meg. Az egész világon elterjedt ASPV fertőzés tünetei változatosak, a xylem gödrosödésétől, az epinasztián át, a levélerek sárgulásáig terjednek [269]. A különböző ASPV törzsek genomja nagyfokú heterogenitást mutat, amely megnehezíti a vírus nukleinsav alapú kimutatását, így az RT-PCR mellett a kapszidfehérjékre szelektív monoklonális ellenanyagokon nyugvó ELISA-k is megjelentek, mint ASPV-detekciós rendszerek [270] [271] [272].

Az ASPV-specifikus aptamerek szelekciója során a vírus egyetlen kapszidfehérjéjének két törzsből származó variánsait használtuk célmolekulaként. A két fehérje, úm. MT32 és PSA-H aminosav-szekvencia tekintetében 81%-os homológiát mutat. Mindkét fehérjét bakteriális fehérjetermelő rendszer alkalmazásával szintetizáltuk, melyhez első lépésként a His₆ címkével rendelkező pDEST17 vektorba illesztettük a kódoló szekvenciákat. A vektorral transzformált BL21(DE3)pLysS sejtek indukcióját követően Ni-kelet affinitáskromatográfiával izoláltuk a fehérjéket, a tisztítás sikerességét pedig PAGE-vel és western blot tál ellenőriztük [273].

Az MT32 és PSA-HA specifikus aptamerek előállítására irányuló SELEX nagyrészt megegyezett az OTA-nál látottakkal, így itt csak a lényegi eltéréseket részletezem. A 15 ciklusból álló folyamat során a Ni-agarózon immobilizált fehérjék szolgáltak célmolekulaként, és a mintegy 10¹⁴ különböző szekvenciát tartalmazó könyvtár oligonukleotidjainak nem specifikus kötődését BSA és dIdC hozzáadásával igyekeztünk megakadályozni. Az egymás után következő SELEX ciklusokban az alkalmazott fehérje mennyiségének, illetve az inkubáció idejének fokozatos csökkentésével növeltük a szelekciós nyomást. Az aptamerek MT32- és PSA-H-szelektivitását a 3., 6., 9., és 12. ciklust követő kontraszelekciós lépések beiktatásával kívántuk növelni, melynek során a másik fehérjével burkolt Ni-agaróz ággal inkubáltuk az oligonukleotid-könyvtárat, és az elegy felülúszóját vittük tovább a következő SELEX ciklusba. A szelekció lezárultával mindkét fehérjére izolált oligonukleotidból 20-20 reprezentatív szekvenciáját határozottunk meg.

A kapott szekvenciák analízise még az OTA-nál látottaknál is egyértelműbben igazolta a szelekció nyomán bekövetkezett szekvenciadúsulást, ugyanis az MT32-re szelektált oligonukleotidok fele azonos volt, míg a PSA-H esetében 9 rendelkezett megegyező nukleinsav-szekvenciával. A sok aptamerre jellemző guanozingadagság mindkét legnagyobb kópiaszámban reprezentált oligonukleotidban megfigyelhető volt, és a QGRS Mapper alapján 4-4 guanozin mindkét aptamer esetében egy stabil G-quadruplex kialakításában vesz részt (6.29. ábra). További szekvenciális vagy szerkezeti hasonlóságokat a két ASPV szelektív aptamer nem mutatott.

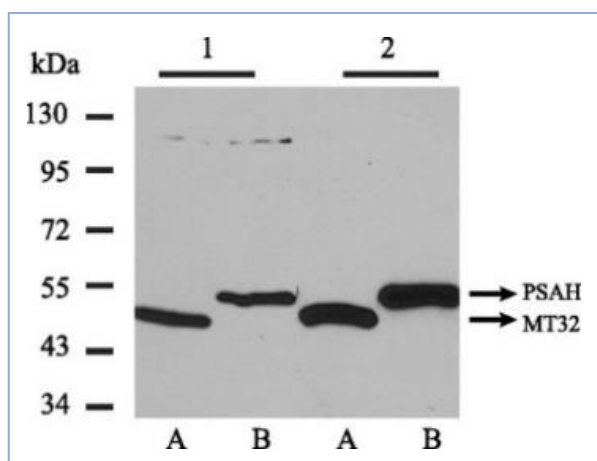


6.29. ábra A legnagyobb kópiaszámú MT32- és PSA-H-szelektív aptamerek jósolt másodlagos szerkezete [273].

A két, legnagyobb kópiában előforduló aptamer fehérjekötésének kinetikai paramétereit a BME, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékének Gyurcsányi E. Róbert által vezetett kutatócsoportja határozta meg SPR segítségével. A mérésekhez az aptamerek kurtított változatait a 3' végen elhelyezkedő HS-(CH₂)₆-TTTT módosítással szintetizáltattuk meg. A módosításon található tiolcsoport lehetővé tette az aptamerek SPR csip arany felületére történő immobilizálását, míg a 6 szénatomból és 4 timinből álló távtartó biztosította az aptamerek és a csip felülete közötti megfelelő távolságot, így módon lehetőséget teremtve az aptamer-fehérje komplex megfelelő térszerkezetének kialakulására. A K_D érték meghatározásához a rekombináns fehérjéket változó koncentrációban adtuk az aptamerekkel módosított csipekhez. A mérési eredmények alapján számított értékek a következőképpen alakultak: PSA-H aptamer PSA-H fehérjével 8 nM, MT32 fehérjével 290 nM; MT32 aptamer MT32 fehérjével 55 nM, PSA-H fehérjével 83 nM. Az adatok szerint mindkét szelekció a célfehérjéjükhöz nagy affinitással kötődő oligonukleotidokat eredményezett, a vizsgált MT32 aptamer azonban a beiktatott kontraszelekciós lépések ellenére sem képes differenciálni a két kapszidfehérje-variáns között. Ezekből az adatokból levonható lehetne az a következtetés, hogy ilyen magas fokú homológiával rendelkező fehérjéket nem lehet megkülönböztetni aptamerekkel, de ennél valószínűbb magyarázat, hogy nem vizsgáltunk kellő számú aptamert. Amint ezt már a dolgozat megelőző részében jeleztem, és a későbbiekben bemutatott saját kísérletes adataink is illusztrálni fogják, a legjobb paraméterekkel rendelkező aptamerek azonosításához nem elegendő egyetlen, a legnagyobb kópia számban megjelenő aptamer vizsgálata. Ezen munkánk során további oligonukleotidokat nem ellenőriztünk, mert elsődleges célunk mindkét vírustörzs detektálására alkalmas aptamerek izolálása

volt, és ennek a feltételnek jelen esetben két aptamer részletesebb vizsgálatával is eleget tudtunk tenni.

További kísérleteinkkel az aptamerek gyakorlati alkalmazhatóságát tanulmányoztuk. Elsőként western blot analízisben használtuk mindkét aptamert, melyhez a rekombináns MT32-t, illetve PSA-H-t túltermelő baktérium sejtek teljes fehérjekivonatát választottuk el SDS-PAGE-vel, majd a szeparált fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán fehérjementes blokkoló pufferrel (Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer) történő kezelése után 3' végen biotinilált aptamerrel történő inkubáció következett, majd a mosási lépéseket követően a fehérjékhez kötődő aptamereket torma peroxidázzal jelölt extravidin hozzáadásával és kemilumineszcenciával tettük láthatóvá. A röntgenfilm előhívása után látott mintázat, annyiban megerősítette az aptamerek szelektivitásának tényét, hogy aptamereink a baktérium sejtekben jelenlévő több ezer fehérje mellett kizárólag a vírus-kapszidfehérjéket jelölték (6.30. ábra). Más tekintetben a PSA-H aptamer SPR-nél látott diszkriminatív képessége nem volt megfigyelhető, azaz mindkét aptamer mindkét fehérjével közel azonos erősgű jelet produkált. Az ellentmondásra magyarázatul szolgálhat a két metodika karakteres különbsége; az SPR-ben natív térszerkezettel rendelkező fehérje-aptamer kölcsönhatást vizsgáltunk, míg a western blot során a fehérjék denaturálódnak, ami megváltoztathatja az aptamer-fehérje kapcsolat jellegét. A diszkrepanciát az is indokolhatja, hogy a membránra transzferált kapszidfehérjék koncentrációja olyan magas volt, hogy a nanomólos disszociációs állandókkal rendelkező aptamerek ilyen körülmények között nem tudtak differenciálni a két fehérje között. Elképzelhető, hogy a PSA-H aptamer western bloton is alkalmas a két kapszidfehérje szelektív azonosítására, az ehhez szükséges optimalizációs kísérleteket azonban a fent részletezett okok miatt nem végeztük el.



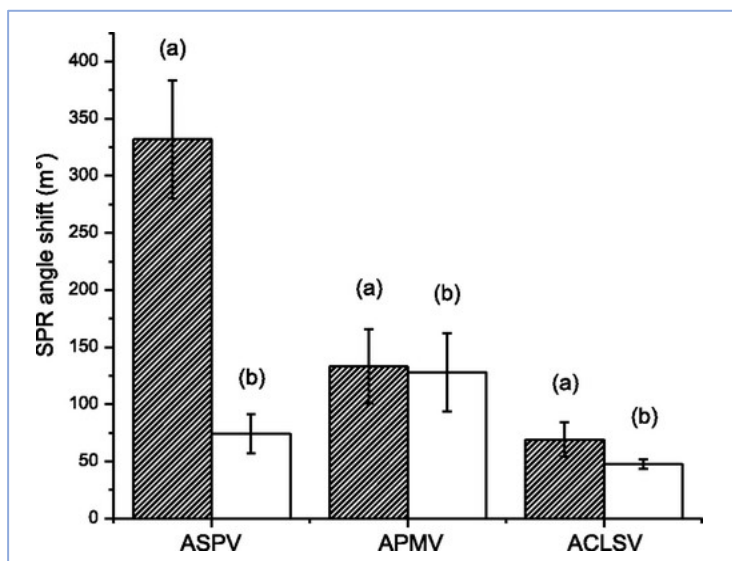
6.30. ábra Bakteriális totál fehérjekivonat western blot analízise aptamerekkel.

MT32 (A) és PSA-H (B) fehérjéket túltermelő bakteriális fehérjekivonatok vizsgálata biotinnal jelölt MT32 (1) és PSA-H (2) aptamerekkel [273].

Az eddig ismertett eredmények bizonyítják, hogy a SELEX sikeres volt, vagyis nagy affinitású, szelektív aptamereket eredményezett. A gyakorlati szempontból legizgalmasabb kérdést azonban ezek az eredmények nyitva hagyták, arra nem válaszoltak, hogy az aptamereink mennyiben alkalmasak intakt vírusok detektálásra. A kérdésre lengyel kooperációs partnerünk által rendelkezésünkre bocsátott, illetve kereskedelmi forgalomból beszerzett, különböző vírusokkal, úm. ASPV-vel, alma mozaik

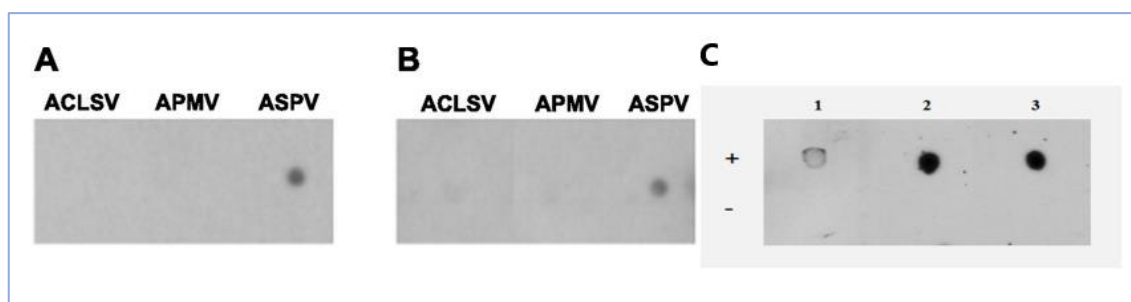
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

vírussal (AMV) és alma klorotikus levélfoltosság vírussal (ACLSV) fertőzött növényi minták segítségével kerestük a választ. Első megközelítésben a már leírt módon kiviteleztük az SPR méréseket, annyi különbséggel, hogy a fehérjék helyett a vírusfertőzött növényi kivonatokot áramoltattuk a csip felületén. A csipen a mindkét vírustörzs kapszidfehérjéjét felismerő MT32 aptamer, illetve referenciaként oligoT került immobilizálásra. A 6.31. ábra jól mutatja, hogy az aptamerrel módosított csip jelentős szögeltolódást mutatott a referenciaponthoz képest, amennyiben ASPV-tartalmú oldattal került kapcsolatba, míg az AMV- és ACLSV-fertőzött növényi kivonatok alkalmazásakor a referenciaponthoz hasonló változásokat figyelhettünk meg. Ezek az adatok nem csak azt bizonyítják, hogy az aptamer szelektíven képes felismerni az ASPV-t, de azt is, hogy olyan komplex mátrixban is megőrzi funkcionalitását, mint a teljes növényi kivonat.



6.31. ábra ASPV, AMV és ACLSV fertőzött növényi kivonatok SPR analízise. MT32 aptamerrel (a), illetve oligoT-vel módosított SPR felületeken különböző vírusokat tartalmazó növényi fehérjekivonatok hatására detektálható rezonanciaszög-változás. A hibásávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [273].

Az SPR-es vizsgálatok igazolták az MT32 aptamer intakt vírusok detektálására történő alkalmazhatóságát, a módszer használata azonban komoly műszerezettséget és szakértelmet igényel, ezért egy általános felszereltségű laboratóriumban nem használható víruskimutatásra. Ezeket a hátrányokat kiküszöbölendő a rendkívül egyszerűen kivitelezhető és minimális eszközigényű dot blot eljárást vizsgáltuk, mint lehetséges ASPV-fertőzésdetektáló rendszert. A háromféle vírusfertőzött növényi kivonatot nitrocellulóz membránra cseppentettük, a további lépéseket pedig a western blotnál leírtakkal azonos módon végeztük. Az eredmények mind az MT32, mind pedig a PSA-H aptamerrel jelölt membránok esetében egyértelműek voltak, az AMV és ACLSV minták esetében nem láttunk jelet, míg az ASPV fertőzött kivonatok jól azonosítható pontokként jelentek meg (6.32. ábra). Egy további kísérletünkkel az aptamerek és ellenanyagok alkalmazhatóságának összevetéséhez az aptamerek mellett egy ASPV-specifikus monoklonális antitesttel is megvizsgáltuk az ASPV-mintával cseppentett membránt, és az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az aptamerek az alkalmazott ellenanyagnál nagyságrendekkel érzékenyebben detektálják a vírust (6.32. ábra).

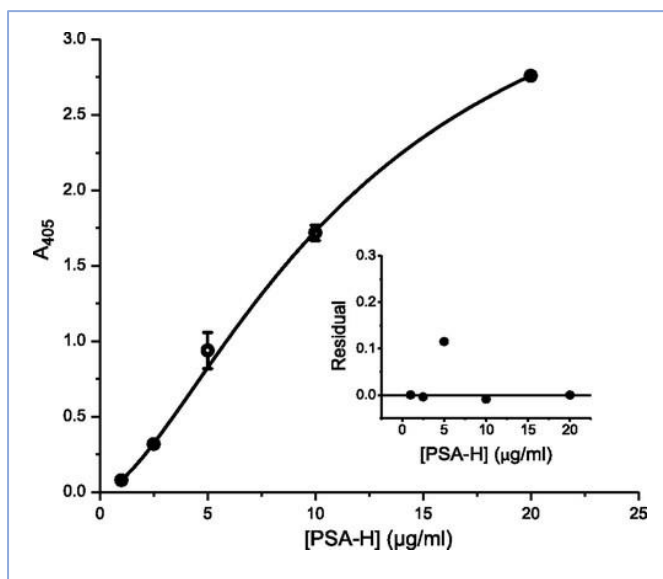


6.32. ábra ASPV-, AMV- és ACLSV-fertőzött növényi kivonatok dot blot analízise aptamerekkel, illetve ellenanyaggal.

A jelölt vírus tartalmazó mintákkal cseppentett membránok vizsgálata MT32 (A) PSA-H (B) aptamerekkel. ASPV mintával cseppentett membrán (C) vizsgálata ellenanyaggal (1), MT32 (2) és PSA-H (3) aptamerekkel [273].

Kísérleteink utolsó stádiumában a diagnosztikai eljárások leginkább elterjedt módszerét, az ELISA-t kívántuk aptamerekre konvertálni. Ezirányú vizsgálatainkat a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) mérésére kifejlesztett ellenanyag-aptamer hibrid rendszer az ún. ELONA (enzyme-linked oligonucleotide assay) inspirálta [274]. A jelzett közleményben bemutatott rendszerben befogó receptorként a mikrotiter lemezre rögzített ellenanyag szolgált, a megkötött VEGF-et pedig egy, a fehérjére szelektált aptamerrel detektálták. Mi ezzel szemben egy teljesen aptamereken alapuló ELONA kifejlesztését tűztük ki célként.

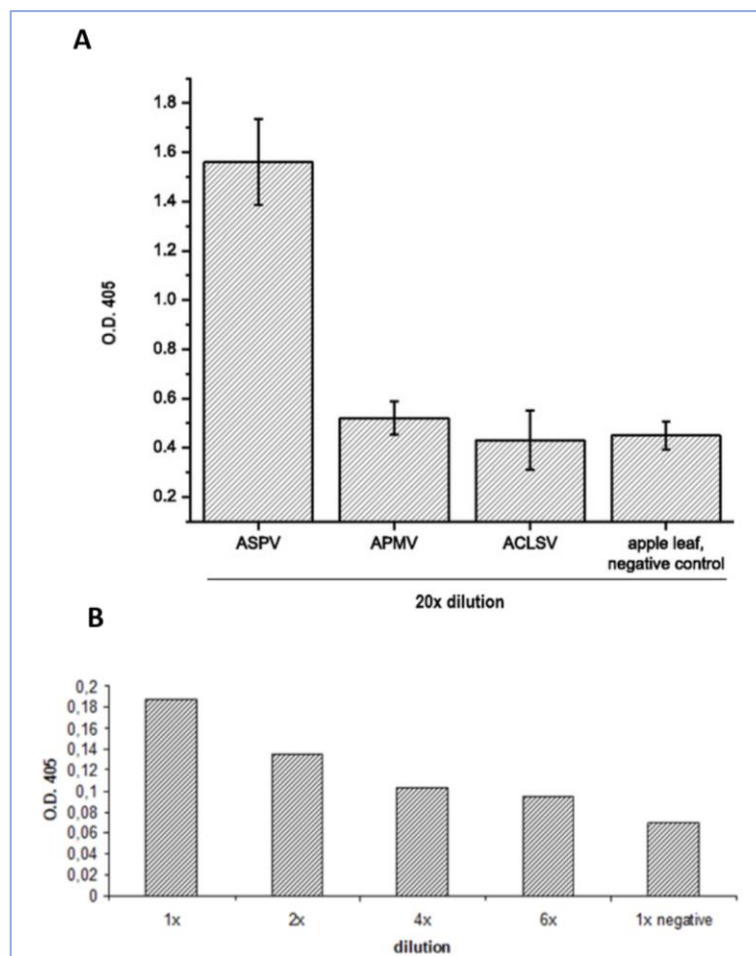
Amint azt a korábbi eredményeink igazolták, a PSA-H aptamer szelektivitást mutat a PSA-H fehérjére, ezzel szemben az MT32 jelű aptamer gyakorlatilag mindkét kapszidfehérje-változatot egyforma erősséggel köti. Valószínűsíthető tehát, hogy a PSA-H aptamer a kapszidfehérje variábilis aminosavaival alakít ki kölcsönhatás, az MT32 pedig a fehérjék megegyező régiójával lép kapcsolatba, ami azt is jelenti, hogy a két aptamer akár egyszerre is kötődhet a fehérjéhez. E feltételezésből kiindulva egy olyan aptamer szendvics (double oligonucleotide sandwich ELONA, DOS-ELONA) elrendezést állítottunk össze, ahol az 5' végén tiolmódosított MT32 aptamert egy maleimidmódosított mikrotiter lemezen immobilizáltuk, az 5' végén biotinilált PSA-H aptamert pedig detektáló molekulaként használtuk. Az MT32 aptamerrel borított kamrákat fehérjementes blokkoló pufferrel telítettük, majd a PSA-H fehérjét változó mennyiségben tartalmazó, teljes bakteriális fehérjekivonatot adtunk hozzájuk. A mosási lépések után a PSA-H aptamerek kerültek a kamrákba, majd az ismételt mosásokat követően alkalikus foszfátazzal konjugált extravidin hozzáadásával tettük detektálhatóvá a vírusfehérjéhez kötődött aptamereket. A nem kapcsolódó alkalikus foszfátáz eltávolítása után p-nitrofenol szubsztrát került a kamrákba, a keletkezett terméket pedig 405 nm-en fotometriával detektáltuk. Az ily módon összeállított rendszer 100 ng/ml koncentrációig lineárisan detektálta a PSA-H kapszidfehérjét (6.33. ábra).



6.33. ábra PSA-H koncentrációjának meghatározása teljes bakteriális sejtkivonatban DOS-ELONA-val.

A mérések három párhuzamossal kerültek kivitelezésre, az ábrázolt abszorbancia értékekből a PSA-H-mentes bakteriális fehérjekivonattal mért érték kivonásra került. A hibasávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik. Az inzerten a maradékok grafikonja látható [273].

Más vírusokhoz hasonlóan az ASPV burka is több ezer azonos fehérjéből áll össze megteremtve az elvi lehetőségét a vírus egyetlen aptamerrel szendvics elrendezésben történő azonosítására. A hipotézis gyakorlati igazolását a fent részletezett DOS-ELONA logikáját követve különböző vírusokkal fertőzött növényi fehérjekivonatok segítségével igazoltuk. A korábban alkalmazott mikrotiter lemez növényi fehérjekivonattal magas háttérrel adott, ezért 5' végen foszforilált oligonukleotidok immobilizálására alkalmas lemezt (Nunc™ NucleoLink™) használtunk. A mindkét kapszidfehérjét felismerő MT32-módosított aptamert 1-metilimidazol és 1-[3 (dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid-metiljodid jelenlétében egy éjszakán át kapcsoltuk a lemezhez. Az aptamerrel borított lemez telítéséhez marha szérum albumint és dIdC-t tartalmazó puffert használtuk, majd ASPV-vel, AMV-vel és ACLSV-vel fertőzött növények 20-szoros hígítású (10 µg) fehérjekivonatait adtuk a kamrákba. A továbbiakban a fenti DOS-ELONA-nal leírtak szerint jártunk el, attól annyiban eltérve, hogy detektáló aptamerként a biotinilált MT32 került alkalmazásra. A fotometriás mérések AMV- és ACLSV-tartalmú mintáknál a kontroll, vírusmentes kivonattal megegyező abszorbanciát mutattak, míg ASPV-fertőzött minta esetében mintegy háromszoros nagyságú jelet figyelhetünk meg (6.34. ábra). Csakúgy, mint a dot blot esetében, ennél megközelítésnél is összehasonlítottuk az ellenanyag-, illetve aptameralapú vírusdetektálás érzékenységét. Egy kereskedelmi forgalomban elérhető ASPV DAS-ELISA (Bioreba) készlet segítségével végzett víruskimutatás érzékenysége töredékének adódott a DOS-ELONA-ánál megfigyeltnek, ugyanis a hatszoros hígítású növényi fehérjekivonat már csak a háttérnek megfelelő abszorbancia értékkel rendelkezett (6.34. ábra).



6.34. ábra Vírusfertőzött növényi fehérjekivonatok vizsgálata DOS-ELONA-val (A), illetve DAS-ELISA-val (B). A DOS-ELONA mérések egységesen 20x, míg az ELISA mérések a jelzett hígítású mintákkal kerültek kivitelezésre. A hibasávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [273].

Az ASPV-szelektív aptamerek előállítására, illetve alkalmazására irányuló vizsgálataink több szempontból is úttörők voltak. Egyrészt ezek voltak az első növényi vírusra specifikus aptamerek, de ennél fontosabb, hogy segítségükkel több, korábban nem ismert vírusdetekciós eljárást fejlesztettünk ki. Közleményünk megjelenése előtt nem írtak le vírus kimutatására alkalmas DOS-ELONA eljárást, és a dot blot, illetve SPR metodikákon alapuló vírusdetektálási módszerekre vonatkozó adatok sem voltak elérhetőek. Munkánkkal bizonyítottuk, hogy ezek az új módszerek nem csak helyettesíthetők, de érzékenységben akár felül is múlhatják az antitesteken nyugvó víruskimutatási metodikákat. Megjegyzendő, hogy eredményeinkből ilyen tekintetben nem vonható le általánosítás, mivel az érzékenység egyik fontos összetevője az ellenanyag, illetve az aptamer célmolekula iránti affinitása, ilyen adatok pedig az ASPV antitestre vonatkozóan nem álltak rendelkezésünkre. Mindenesetre a bemutatott eredmények jól igazolják, hogy az aptamerek potenciális receptormolekulái lehetnek a vírusdiagnosztikai eljárásoknak. Ezt bizonyítja, hogy a fentebb ismertetett aptamereket alkalmazták ASPV-fertőzés DOS-ELONA-alapú rutinszerű kimutatására, ASPV-detektálásra alkalmas molekuláris lenyomatú hidrogél létrehozására, illetve SPR-rel történő vírusazonosításra [271],[275],[276].

3.2.2. Légúti óriássejtes vírus

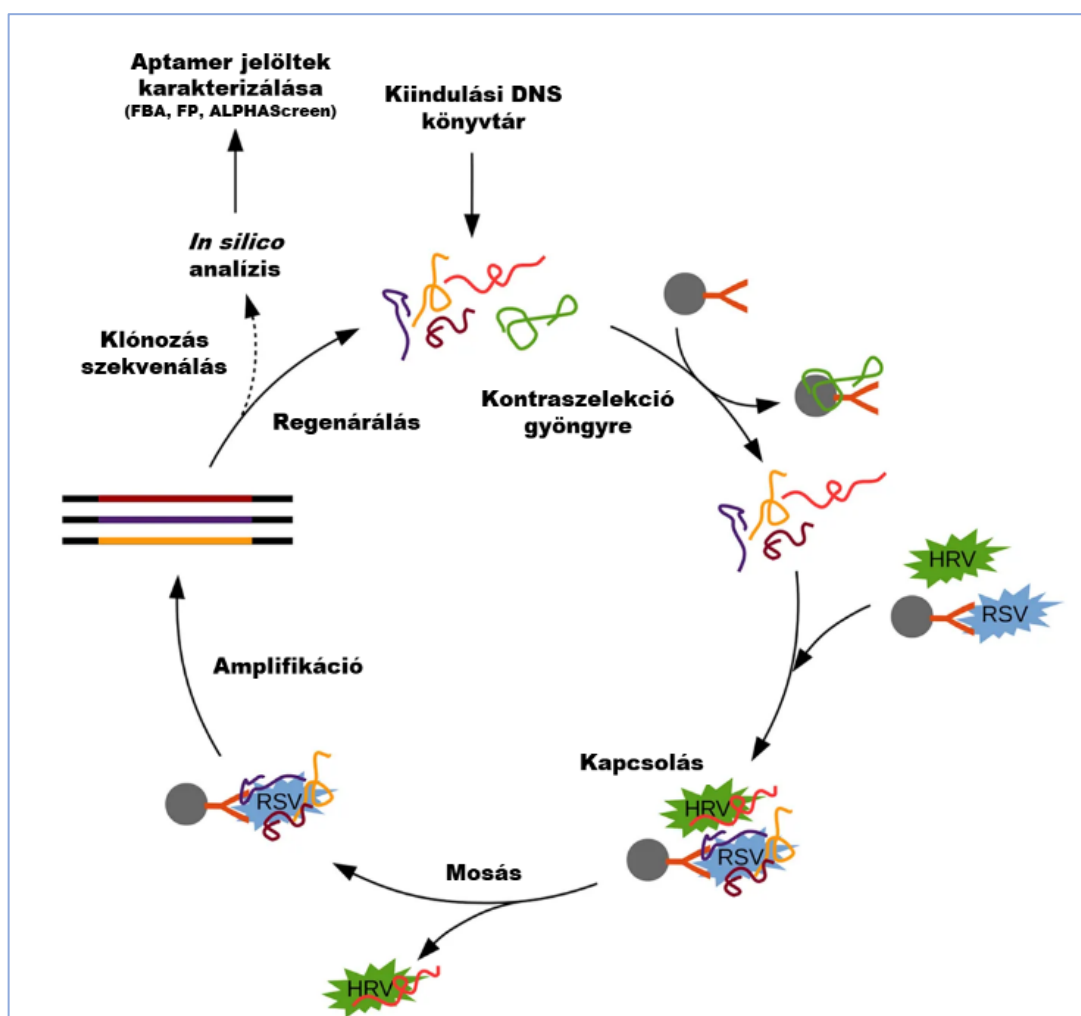
Humán patogén vírusokkal kapcsolatos vizsgálódásaink a Melinda és Bill Gates alapítvány támogatásával vették kezdetüket, céljuk pedig egy a poliovírus detektálására alkalmas, aptamer alapú rendszer kifejlesztése volt. Az időközben szigorított szabályozások már a poliovírus inaktivált formájának használatát sem engedélyezték a kijelölt laboratóriumukon kívül, így ez a projekt félbemaradt, és a született részeredményeket nem ismertettem.

Ezen előzmények után érdeklődésünk egy napjainkban is általánosan előforduló és könnyebben elérhető vírus, nevezetesen a légúti óriássejtes vírus (Respiratory Syncytial Virus, RSV) felé fordult. Az egyszálú negatív RNS-sel rendelkező RSV egy, a *Paramyxoviridae* családba tartozó pneumovírus, melynek átmérője 150 nm, de filamentáris formája akár több μm -es nagyságot is elérhet. Korábban csimpánznátha-kórokozó néven volt ismert, majd a fertőzött sejtekből kialakuló jellegzetes syncytiumok alapján RSV-nek keresztelték át [277]. A vírus örökítőanyaga összesen 11 fehérjét kódol, melyek közül három a plazmamebrán-eredetű lipidburok, az ún. peplon kialakításában vesz részt. A három fehérje közül a fúziós fehérje (F) a vírusburok és a gazdasejt membránjának összeolvadását iniciálja, a nagymértékben O-glikozilált glikoprotein (G) pedig a vírus a gazdasejthez való kapcsolódását segíti elő, az SH fehérje szerepe pedig egyelőre nem tisztázott [278].

A fertőzés leginkább a kisgyermekek kitétek, kétéves korukig legtöbbször enyhe, náthaszerű tünetekkel átesnek a betegségen, de néhány százalékuknál az RSV fertőzés súlyossá válik, akár végzetes is lehet. A RSV rendkívül fertőzőképes, minek következtében a pediátriai osztályok leggyakrabban előforduló nozokomiális fertőzése [279]. A kisgyermekek fertőzöttsége mellett az idős és immunszuppresszált páciensek alsó légúti megbetegedésének hátterében is gyakran a diagnosztizálatlan RSV-fertőzés áll [280] [281]. A jelenleg alkalmazott RSV-diagnosztikai tesztek tulajdonképp a vírusgenom RT-PCR-alapú, illetve a vírus-burokfehérjék immunokémiai alapú kimutatását jelentik [282].

Amint az ASPV esetében látható volt vírusszelektív aptamerek a vírust alkotó fehérje célmolekulaként történő alkalmazásával is előállíthatók. Ez a megközelítés a peplonnal rendelkező vírusok esetében azonban kevésbé célravezető, ugyanis a vírus felszínén megjelenő fehérjék a lipidmembránban helyezkednek el és jellemzően kiterjedten glikoziláltak, így a heterológ rendszerben előállított fehérje valószínűsíthetően nem megfelelően reprezentálja a natív vírus-burokfehérjét, minek eredményeként a fehérjére kivitelezett SELEX sok esetben nem eredményez intakt vírust felismerő aptamert [283]. Ezen megfontolásokat szem előtt tartva az RSV-specifikus aptamerek szelekciója során inaktivált vírust alkalmaztunk. Holland együttműködő partnerünk (Radboud University, Medical Center, Nijmegen) a korábban leírt protokolljuk alkalmazásával előállította, majd β -propiolaktonnal kezelte a preparátumot, így az RSV tisztított és inaktivált formában jutott el a laboratóriumunkba. Az RSV immobilizálásához a passzív vakcinálásra használt, F proteint felismerő, Palivizumab néven forgalmazott monoklonális ellenanyagot dimetil-pimelimidát hozzáadásával kovalensen kötöttük egy mágnesezhető Protein G ágyra, majd az ily módon előkészített gyöngyhöz adtuk az RSV-

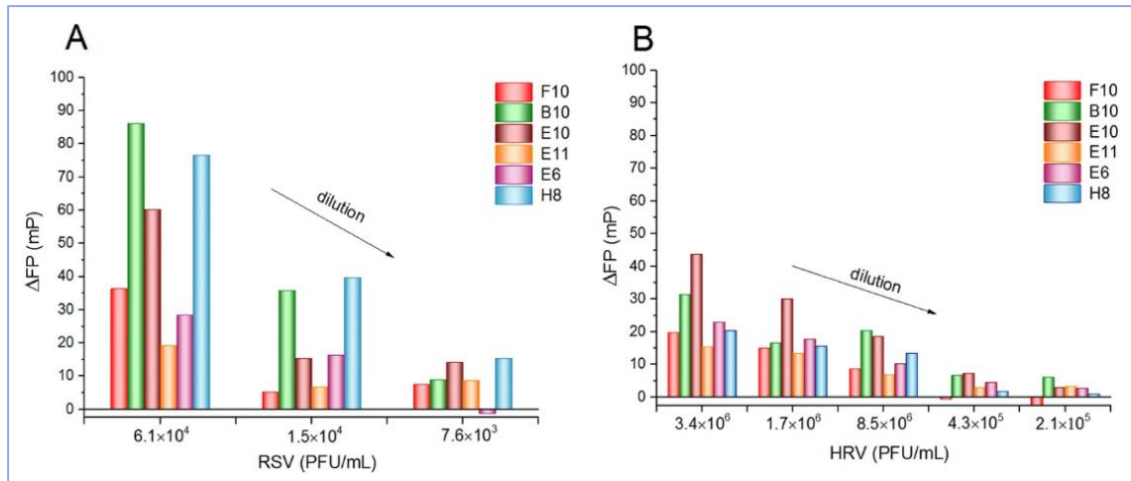
preparátumot [284]. A SELEX során két kontraszelekción lépést iktattunk be, melyek közül elsőként a szelekciót megelőzően, az antitesttel módosított gyönggyel inkubáltuk a kiindulási aptamerkönyvtárat, és a felülűszót vittük tovább, hogy eltávolítsuk az ellenanyaghoz kapcsolódó oligonukleotidokat. A második kontraszelekciónál az RSV-vel leggyakrabban koinfektáló vírushoz, a humán rhinovírushoz (HRV) kötődő oligonukleotidoktól kívántunk megszabadulni, ennek érdekében az első szelekciós lépésben inaktivált HRV-vel egészítettük ki a szelekciós puffert. A négy ciklusból álló SELEX egymást követő fázisaiban az inkubációs idő és RSV-koncentráció csökkentésével, illetve a dextranszulfátos mosási lépés beiktatásával folyamatosan növeltük a szelekciós nyomást (6.35. ábra). A SELEX-et követően 96 baktérium kolóniában határoztuk meg az oligonukleotidok szekvenciáját. A szekvenciák *in silico* analízise 2 dupla kópiában jelen lévő oligonukleotidot eredményezett (B5, F6, illetve D10, D12) a motívumkereséssel pedig 3 olyan oligonukleotid párt sikerült azonosítani, amelyek rendre 9 (H8, E6), 11 (E11, E10) és 12 (B10, F10) nukleotidból álló homológ régióval rendelkeztek (Függelék 1. táblázat). További tanulmányaink ezekre, illetve egy véletlenszerűen kiválasztott, egyetlen kópiában jelenlévő aptamerre korlátozódtak.



6.35. ábra RSV-specifikus aptamerek szelekciójának sémája [284].

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az aptamerek a különböző módszerekben és elrendezésekben különböző hatékonysággal működhetnek, ezért a szelektált oligonukleotidokat három eltérő kísérleti megközelítéssel vizsgáltuk, hogy a legszélesebb körben alkalmazható aptamerjelölteket tudjuk azonosítani. Elsőként azt szeretettük volna tisztázni, hogy a közös motívum mennyiben határozza meg a szelektált oligonukleotidok víruskötő-képességét, vagyis a szelektált aptamerek mennyiben kurtíthatók. Ennek a kérdésnek gyakorlati szempontból is kiemelt jelentősége van, mivel általánoságban kijelenthető, hogy a rövidebb aptamerek rugalmasabban alkalmazható receptorok, és természetesen költséghatékonyabban szintetizálhatók. A BME laboratóriumában fluoreszcencia polarizációval (FP) kivitelezett méréseinkhez az 5' végükön FAM-jelölt aptamereinket azonos koncentrációban kevertük a változó mennyiségű RSV-vel, illetve HRV-vel, és egy órás inkubációt követően mértük a polarizációváltozást. A kapott adatok alapján B10, E10, H8 jelű aptamerek kötődnek a legerősebben az RSV-hez, azonban a B10, E10 aptamerek HRV-tartalmú mintákban is viszonylag nagy polarizációváltozás figyelhető meg, így a H8 jelű tűnik a legkedvezőbb paraméterekkel rendelkező aptamernek (6.36. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy a három, RSV-hez leginkább kötődő aptamer közül egyik sem rendelkezik azonos szekvenciamotívummal, továbbá az azonos motívummal rendelkező oligonukleotid-párok közül minden esetben csak az egyik mutat erős kölcsönhatást a kérdéses vírussal. Ezek alapján megállapítható, hogy a vizsgált oligonukleotidok esetében a motívumot adó nukleinsav-szekvencia nem elégséges az erős aptamer-HRV kölcsönhatás kialakításához, így ezek az aptamerek funkcióvesztés nélkül nem kurtíthatók.



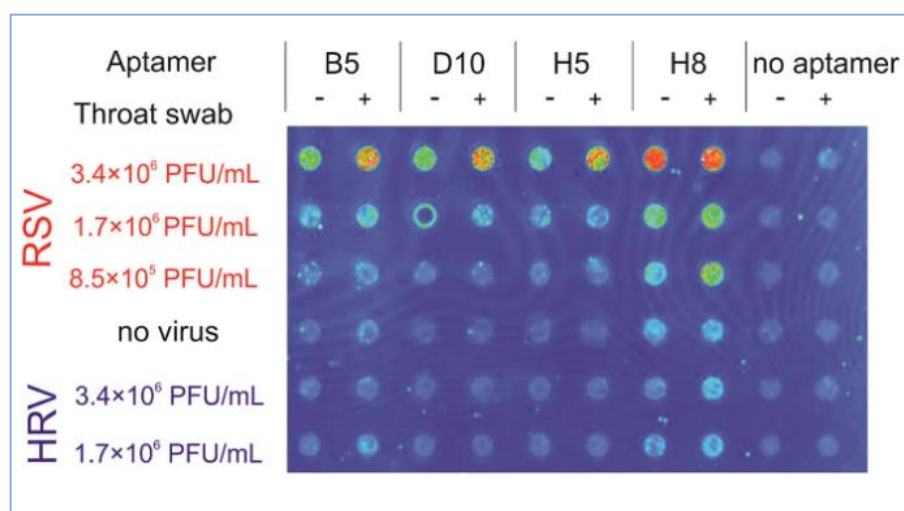
6.36. ábra A szelektált aptamerek vizsgálata fluoreszcencia polarizációval.

A polarizáció szögváltozása eltérő mennyiségű RSV (A) és HRV (B) hozzáadására [284]. Megjegyzendő, a HRV koncentrációja mintegy két nagyságrenddel magasabb az RSV-nél látottaknak.

A következő megközelítésként a membránkötés-vizsgálattal (filter binding assay) ellenőriztük az előbbieken legjobb víruskötőként azonosított H8 jelű aptamert, illetve a két kópiában előforduló egy-egy reprezentánsát (B5, D10), valamint az egy példányban jelenlévők közül egy véletlenszerűen kiválasztottat (H5). Az 5' végén FAM-mal jelölt ssDNS-ek előállításához 5' végen FAM-, illetve biotinmódosított szensz, illetve antiszensz primerekkel amplifikáltuk a megfelelő vektorokat hordozó baktériumokból származó

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

kolónia PCR termékeit, majd a létrejött dsDNS-eket sztreptavidinnel borított mágnes ágyon immobilizáltuk, végül a fluoreszcensen jelölt ssDNS-t alkalikus oldattal eluáltuk. A FAM-jelölt oligonukleotidokat RSV-t, illetve HRV-t változó mennyiségben tartalmazó PBS és garatkenettel kiegészített PBS mátrixokkal inkubáltuk. Az elegyek nitrocellulóz membránra történő csöppentését, illetve a membrán mosását követően, fluoreszcens géleolvasóval mértük az egyes pontok intenzitását (6.37. ábra). A mérési eredmények azt jelezték, hogy mindegyik aptamer szelektíven felismeri az RSV-t, és az FP-nél látottakhoz hasonlóan a H8 jelű kötődik legerősebben a kérdéses vírushoz. Külön kiemelendő, hogy a vizsgált aptamerek mindegyike a garatkenettel kiegészített mintákban is megőrzi szelektivitását.

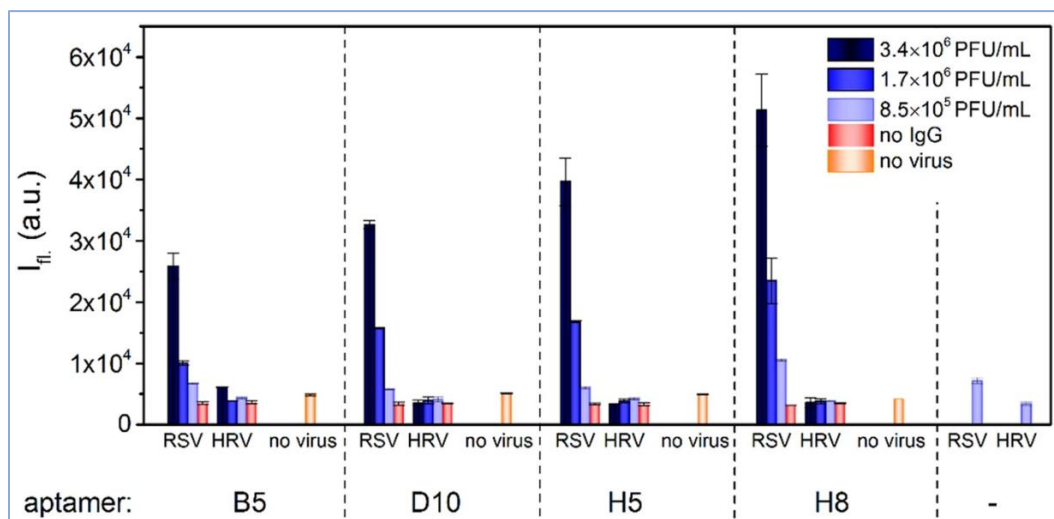


6.37. ábra Az aptamerek vizsgálata membránkötéssel.

Az RSV-t, illetve HRV-t változó mennyiségben tartalmazó minták a (+) jelölés esetében garatkenettel voltak kiegészítve [284].

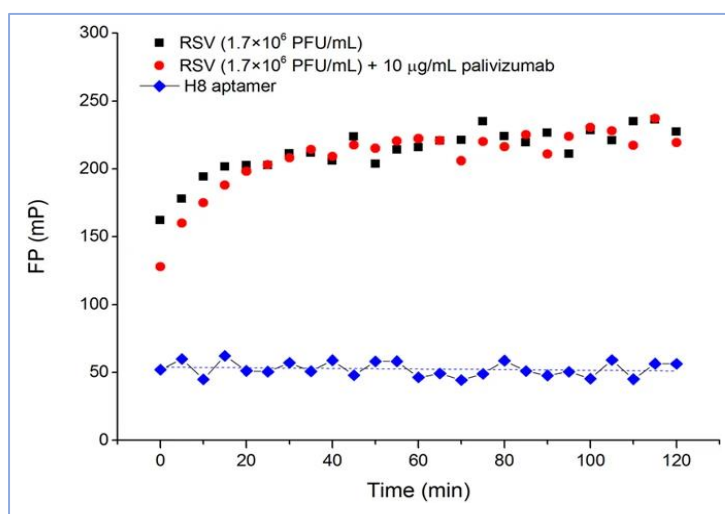
Harmadik kísérleti elrendezésünk az ALPHA volt, amellyel a membránkötés vizsgálatánál látottakat kívántuk megerősíteni. Az első feladat ennél az eljárásnál is a jelölt aptamerek előállítása volt, de ebben az esetben 5' végen biotinnal módosított oligonukleotidok szükségeltettek, ezért az amplifikációt 5' biotinált szensz és 5' foszfát antiszensz primerekkel hajtottuk végre. Az antiszensz szál 5' foszforilációját kihasználva λ exonukleázal leemésztettük az aptamerrel komplementer DNS-szálat, így rendelkezésünkre állt a biotinilált aptamer. Az aptamereket és a Palivizumab antitestet állandó koncentrációban adtuk változó mennyiségű RSV-t, illetve HRV-t tartalmazó mintákhoz, majd először az ellenanyagot kötő protein A akceptor, később az aptamert kötő sztreptavidin donor gyöngyök hozzáadásával tettük teljessé az elegyeinket. A kapott lumineszcenciaértékek összhangban voltak membránkötésnél látottakkal, mind a négy tanulmányozott aptamer differenciál a két vírus között, az RSV-hez pedig a H8 jelű kötődik legerősebben (6.38. ábra).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



6.38. ábra Az aptamerek vizsgálata ALPHA módszerrel. A hibasávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [284].

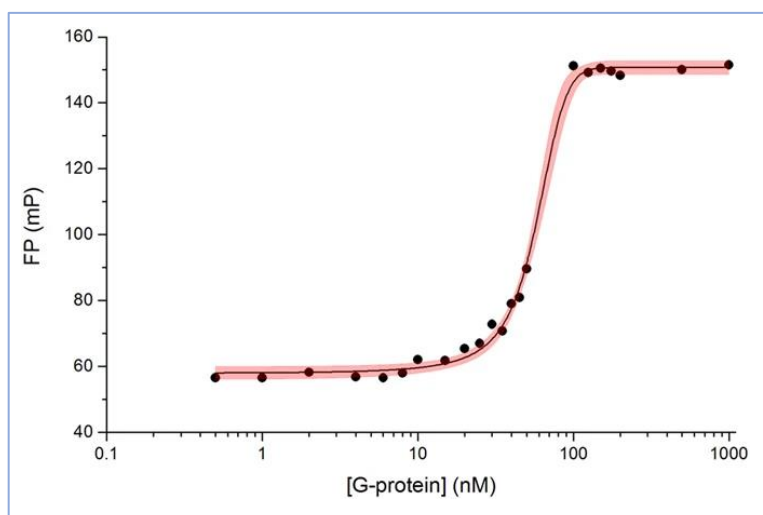
További kísérleteink a legígéretesebben működő aptamer részletesebb vizsgálatára irányultak. A peplon kialakításában szerepet játszó fehérjék közül kettő, úm. az F és a G magas kópiaszámban található meg a vírus felszínén, így a H8 aptamer legnagyobb valószínűséggel e fehérjék valamelyikét ismeri fel, és az is elképzelhető, hogy a H8 aptamer és a szelekció során a vírus immobilizálására használt Palvizumab ellenanyag az F protein ugyanazon epitópjához kötődik. A Palvizumab-RSV kölcsönhatást részletesen feltárták, így tudható, hogy az antitest az F fehérje egy konformációs epitópjához kötődik [25]. A kérdés tisztázásához az FP-t hívtuk segítségül, és egy aptamer-ellenanyag kompetíciós kísérletet állítottunk össze. Az Alexa Fluor 488 festékkel jelölt aptamer RSV-vel történő összekeverése a várakozásoknak megfelelően szignifikáns FP-változást eredményezett, és ezt a változást a két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban adott Palvizumab sem változtatta érdemben, jelezve hogy az aptamer és az ellenanyag különböző epitópokat ismernek fel (6.39. ábra).



6.39. ábra A H8 aptamer Palvizumab közötti kompetíció vizsgálata fluoreszcencia polarizációval [284].

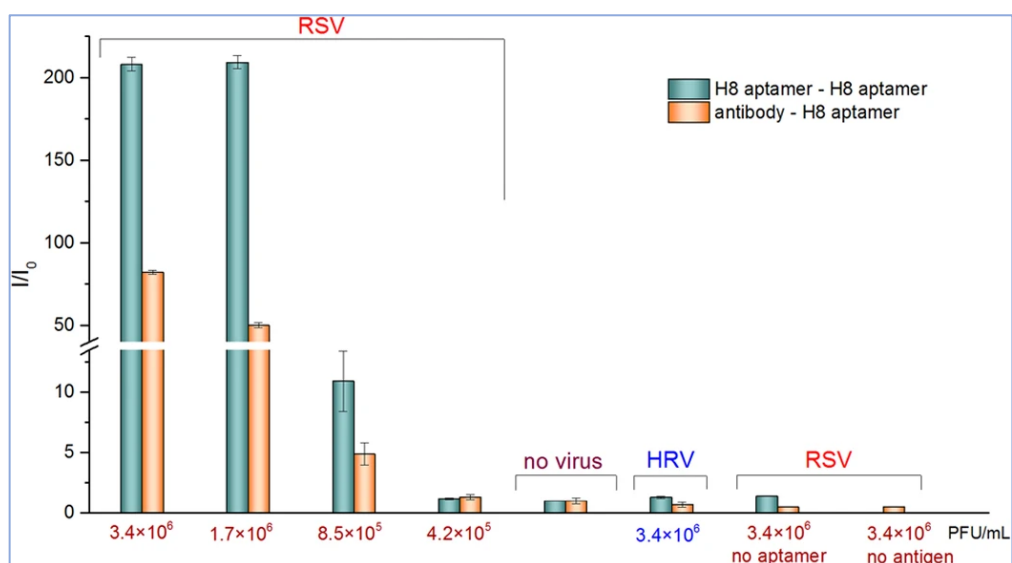
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Ezt követően megvizsgáltuk, a H8 aptamer G fehérjéhez történő kötődését. Kísérleteinkhez kereskedelmi forgalomból beszereztünk egy His₆-jelölt, emlős sejtben túltermelt, ily módon glikozilált G fehérjét, és annak alkalmazásával a már jelzett módon, változó fehérjekoncentrációval végeztük el az FP-méréseket. A polarizációváltozás már 10 nM-os fehérjekoncentrációnál detektálható volt, és az 1:1 arányú kötéssel számított disszociációs állandó 30 nM-nak adódott, igazolva a H8 aptamer G protein iránti szelektivitását és nagy affinitását (6.40. ábra).



6.40. ábra H8 aptamer G protein kölcsönhatás vizsgálata fluoreszcencia polarizációval [284].

Végül a H8 aptamer diagnosztikai relevanciáját is megvizsgáltuk. A betegek orrváladékában átlagosan $1,5 \times 10^6$ kolóniaformáló egységgel ekvivalens RSV található, így ennek megfelelő víruskoncentráció tartományban lévő minták AlphaScreen méréseit állítottunk össze kétféle elrendezésben [285].

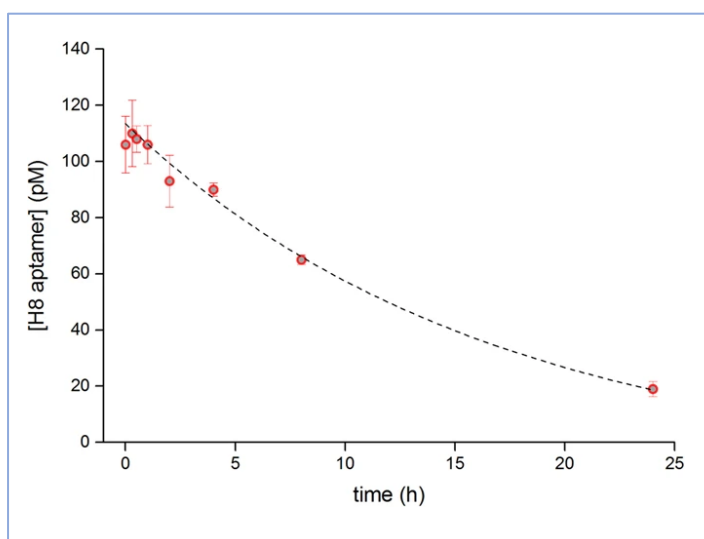


6.41. ábra RSV detektálása ALPHA módszerrel klinikailag releváns víruskoncentrációknál. A grafikonon a vírusmentes mintához viszonyított lumineszcencianövekedés került feltüntetésre [284].

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

Az első esetben a különböző RSV- és HRV-koncentrációval rendelkező, hígított garatkenet-mintákhoz a már bemutatott módon adtuk a biotinilált H8 aptamert és a Palvizamubot, majd a protein A akceptor és sztreptavidin donor gyöngyöt. A második kísérleti rendszerünket antitest nélkülözésével állítottuk össze: a H8 aptamert sztreptavidin donor, illetve akceptor gyönggyel előinkubáltuk, majd a gyöngyök ezt követően kerültek a fentiekkel megegyező mintákba. A lumineszcenciamérések a mindkét elrendezésben a HRV-tartalmú mintáknál szignifikánsan magasabb jelet adtak a diagnosztikailag releváns RSV-koncentrációknál (6.41. ábra). A H8 aptamer alkalmazhatóságát tovább erősítette az tény, hogy a tisztán aptameralapú mintákban látott lumineszcenciaintenzitás mintegy kétszerese volt az aptamer-ellenanyag hibrid rendszerekben detektáltnak (6.41. ábra).

Az eddig ismertetett eredmények igazolták, hogy teljes vírusra kivitelezett SELEX olyan aptamert eredményezett, amely valós minták RSV-analízisére is jól alkalmazható, gyakorlati alkalmazhatóságának azonban komoly akadálya lehet az oligonukleotid esetleges degradációja. E lehetőség vizsgálatára valós idejű PCR-t állítottunk össze az aptamer rögzített régiójának megfelelő primerekkel és SG interkaláló festéket tartalmazó reakcióeleggyel. A PCR templátjaként a változó ideig szobahőmérsékleten garatkenetben tárolt aptamer szolgált. Ismert aptamerkoncentrációjú reakcióelegyek küszöbértékeinek meghatározásával kalibrációs egyenest készítettünk, melynek segítségével a különböző ideig garatkenetben indukált aptamerek koncentrációját határoztuk meg (6.42. ábra). A számítási eredmények alapján az aptamerdegradáció az első órában elhanyagolható, és két óra után is mindössze 10% volt a lebomlott aptamerek aránya. Jelentősebb mértékű degradációt csak sokórás garatkenetben történő tárolást követően figyeltünk meg, és egy nap után az aptamerek döntő része lebomlott, csak mintegy 30%-uk maradt meg intakt formában. Figyelembe véve a diagnosztikai eljárások átalagos időigényét, az aptamerek ilyen időintervallumban történő degradációja várhatóan nem korlátozza gyakorlati felhasználásukat.



6.42. ábra H8 aptamter stabilitásának vizsgálata garatkenetben valós idejű PCR alkalmazásával [284]. A hibásávok három mérésből származó hibát jelölik.

Kísérleteink tehát igazolták, hogy a teljes vírusra kivitelezett SELEX megfelelő kontraszelekciós lépések beiktatásával és szelekciós körülmények megválasztásával gyakorlati jelentőségű aptamerek szelektálásához vezethet. Kiemelendő, hogy megfigyeléseink alapján az egyes aptamerjelöltek egyedi, többoldalú funkcionális karakterizálása elengedhetetlen része a diagnosztikában is alkalmazható aptamerek azonosításának. Eredményeinkkel demonstráltuk, hogy az ilyen kritériumokkal kiválasztott aptamer klinikailag releváns víruskoncentrációknál és mátrixban jól alkalmazható az RSV kimutatására. Együttműködő partnerünk a BME-n egy újabb eljárással is igazolta a szelektált aptamerek gyakorlati jelentőségét: módszerfejlesztésük során a fluoreszcensen jelölt H8 aptamert nanorészecske nyomkövető analízisben (nanoparticle tracking analysis) használtak, és munkájuk az RSV részecskék számának és méretének meghatározására egyaránt alkalmas eljárást eredményezett [286].

3.3. Kardiális troponin I-re szelektív spiegelmerek

3.3.1. Spiegelmerek szelekciója a cTnI N-terminális epitópjára

Kutatócsoportunk egy ipari partnerrel, az E77 Kft-vel folytatott együttműködés keretében egy olyan multiparaméteres mikrofluidikai rendszer kifejlesztését tűzte ki célul, amely több kardiovaszkuláris biomarker együttes mérésére alkalmas. A projektben kettős szerepet töltünk be, ugyanis a vizsgált biomarker fehérjék megfelelő mennyiségben és minőségben történő előállításával mellett a kardiovaszkuláris diagnosztikában alkalmazható aptamerek szelekcióját is mi végezzük. NT-proBNP-re (N-terminális pro B-típusú natriuretikus peptid), CRP-re (C-reaktív protein), valamint cTnI-re (kardiális troponin I) szelektív, szendvics típusú vizsgálatokra alkalmas aptamer-, illetve spiegelmerpárok szelekcióját végezzük, azonban e munkák eredményeinek döntő része az esetleges szabadalmaztatás miatt nem kerül közlésre, így csak a cTnI-re vonatkozó adatokat tárgyalom a továbbiakban.

Habár az RSV aptamert bemutató fejezetben láthattuk, hogy az aptamerek féléletideje még biológiai eredetű mintákban is akár sok óra lehet, egy aptamerre vonatkozó mérési eredményekből általános következtetést nem lehet levonni. Minden egyes aptamer más-más nukleinsav-szekvenciával és másodlagos szerkezettel rendelkezik, ennek megfelelően a biológiai eredetű mintákban nagy mennyiségben jelenlévő, változatos nukleázokkal szembeni rezisztenciájuk is eltérő lehet. Mindemellett az alábbiakban ismertetésre kerülő munkák kronológiailag megelőzték az aptamerek nukleázrezisztenciájának vizsgálatára irányuló méréseinket, így e kísérletek kivitelezésekor abból az általánosan elfogadott nézetből indultunk ki, hogy az aptamerek biológiai eredetű mintákban rövid időintervallumon belül degradálódnak.

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

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

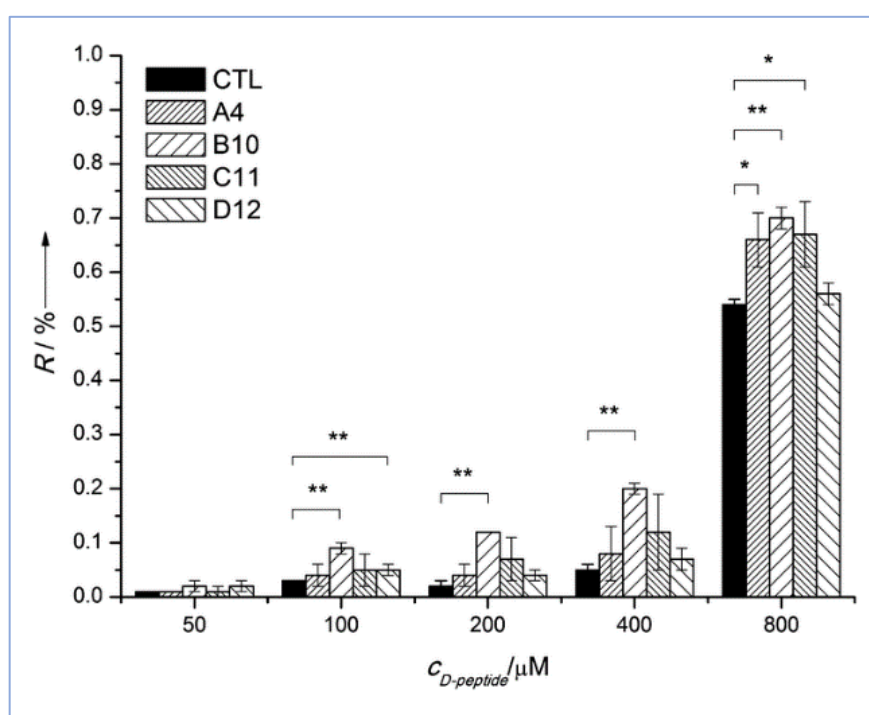
spiegelmerek szelekciójához, a teljes fehérje enantiomer szintézisét kiiktatandó, a korábban leírt doménmegközelítést alkalmaztuk [195].

A cTnl spiegelmerszelekciónk célja szendvics elrendezésben is működő spiegelmerpár létrehozása volt, így első megközelítésben a fehérjén két, térben távoli, cTnl-re specifikus eptitópot kerestünk csökkentendő annak a valószínűségét, hogy a két spiegelmer együttes bekötődése sztérikusan gátolt legyen. Ennek a feltételnek megfelelően az első peptidmotívumot a célfehérje N-terminálisának közelében kívántuk azonosítani. Amennyiben a keringésben megjelenő cTnl felismerésére alkalmas spiegelmerek szelekciója a cél, további fontos szempontokat is figyelembe kell venni a megfelelő epitóp kiválasztása során, ugyanis a cTnl poszttranszlációosan módosul, a keringésben kölcsönhat a heparinnal, valamint a troponin komplex másik két fehérjéjével, mindemellett a szívizom sejtekből kikerülve nagyon gyorsan degradálódik, így a fehérjén egy olyan eptitópot kell találni, amely ezek egyikében sem érintett [287]. Mindezen elvárásoknak a fehérje 28-36 pozíciójában elhelyezkedő aminosavak feleltek meg, és az általuk alkotott oligopeptid N-terminális végére az immobilizáláshoz egy extra ciszteintadtunk, így a CdAdYdAdTdEdPdHdAdK szekvenciájú D-enantiomer peptidet szintetizáltatuk. A spiegelmerszelekcióhoz a peptidet a cisztein tiolcsoportján keresztül autoreaktív, bróm-acetillel borított mágneses gyöngyöz kapcsoltuk, majd a szabadon maradt aktív csoportok blokkolásához feleslegben adott ciszteinnel inkubáltuk a gyöngyöket [288].

Az alkalmazott, 9 ciklusból álló SELEX eljárást az eddig ismertettekhez hasonlóan végeztük, amennyiben az egymást követő lépésekben folyamatosan csökkentettük az alkalmazott, fehérjével módosított gyöngy mennyiségét és az inkubációs időt, illetve növeltük a mosások erősségét. A gyöngyöz kötődő oligonukleotidokat két negatív szelekciós lépés beiktatásával távolítottuk el, a következő SELEX ciklusba továbbvitt ssDNS-eket pedig a PCR-t követően alkalikus denaturálással állítottuk elő. A SELEX végén 85 baktériumkolóniából határoztuk meg a vektorba inszertálódott oligonukleotid szekvenciáját. A kapott eredmények alapján 1 nukleinsav-szekvencia 32 vektorban volt jelen, másik 6 duplikátumként volt megtalálható, a maradék 41 pedig egyedi oligonukleotidokat képviselt (Függelék 2. táblázat).

Amint az a korábbiakban már többször látható volt a SELEX nyomán kapott oligonukleotidok egyedi vizsgálata elengedhetetlen a legkedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezők azonosításához, és ebben a tekintetben a spiegelmer- és aptamerszelekció nem különbözik egymástól. A szükséges szűrési lépés a spiegelmereknél elméletileg két megközelítéssel kivitelezhető, úm. minden egyes vizsgálandó spiegelmert megszintetizálunk és az L-aminosavakból álló, végső célmolekulával karakterizáljuk a kölcsönhatásokat, illetve a D-aminosavakból felépülő, a szelekció során használt peptidok és L-dezoxiribóz tartalmú oligonukleotidok tanulmányozásával azonosítjuk a legígéretesebb jelölteket. Habár az első lehetőség tűnhet az egyszerűbb eljárásnak egy általános molekuláris biológiai laboratóriumban, anyagi vonzata miatt nem kivitelezhető, mivel a spiegelmerek szintetizáltatásának a költsége mintegy hússzorosa az aptamerekének. Ennek figyelembevételével egy új SPR-en alapuló szűrési módszer kifejlesztése mellett döntöttünk. Eljárásunkhoz az oligonukleotidokat PCR-rel állítottuk elő oly módon, hogy a kolónia PCR termék szolgált templátként, a könyvtárral kompatibilis

primerek közül pedig a szensz az 5' végén biotinjelölést kapott. Az amplifikált kettőszálú terméket ExtrAvidin-borított SPR-csipre cseppentettük, és annak felületén alkalikus kezeléssel egyszálúsítottuk. Az ily módon előállt oligonukleotiddal borított csip felett változó koncentrációban áramoltattuk a szelekció során alkalmazott D-peptidet, és követtük a törésmutató szögének változásait. A módszer teszteléséhez 4 reprezentatív oligonukleotidot választottunk, a legnagyobb kópiaszámban jelenlévőt (A4), egy duplikátumként azonosítottat (C11), és kettő egyetlen kópiában képviseltet (B10 és D12). Az SPR eredményei megerősítették azokat a korábbi megfigyeléseket, hogy a legnagyobb példányszámban előforduló aptamerek nem szükségszerűen azonosak a legkedvezőbb tulajdonsággal rendelkezőkkel, az A4 jelű oligonukleotid a második leggyengébben teljesítő volt a vizsgált 4 közül, míg a legnagyobb affinitással az egyik egyetlen kópiában azonosított jelölt, a B10 rendelkezett (6.43. ábra).



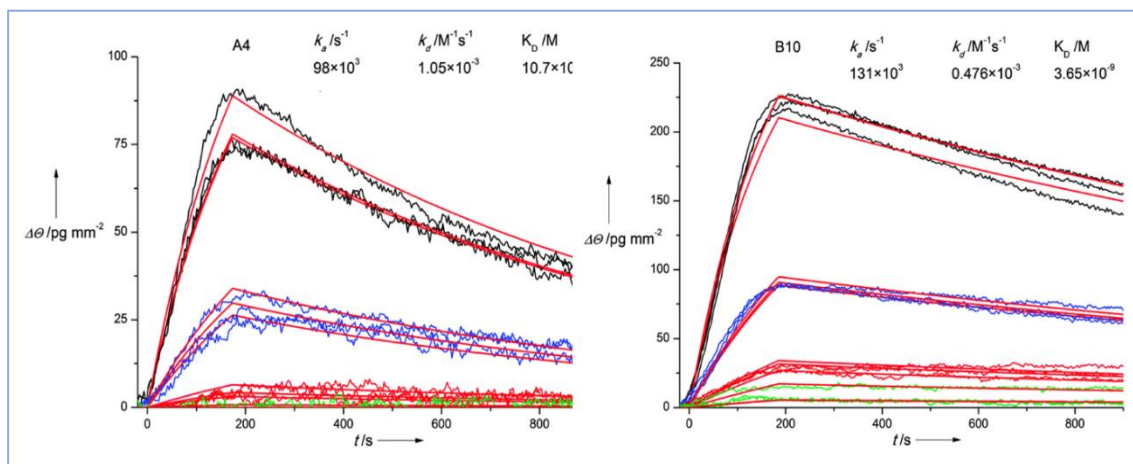
6.43. ábra *cTnI* D-peptid és a szelektált L-oligonukleotidok közötti kölcsönhatás vizsgálata SPR alkalmazásával.

* ($P < 0,05$) és ** ($P < 0,01$) értékek a kontroll oligonukleotidhoz viszonyított jelentős törésszög-változásra utalnak. A hibásávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [288].

A szűréssel kapott eredményeink alapján a legnagyobb kópiaszámban előforduló és a legígéretesebb jelöltek D-dezoxiribóz nukleotidokból való szintetizáltatása mellett döntöttünk. Az oligonukleotidok 5' végére három szénatomon és tetraetilén-glikol (TEG) távtartón keresztül egy tiol csoportot kapcsolattunk, melyen keresztül a létrejött spieglmerek az SPR-csip aranyfelületére kötöttük. A spieglmerek immobilizálását a csip fehérjementes blokkoló pufferrel és 11- merkaptoundecil-tetraetilén-glikollal (HS-TEG) történő telítése, majd nitrogéngázos szárítása követte. Az ily módon előkészített csip felületén 3 percig különböző koncentrációban *cTnI*-t tartalmazó szelekciós puffert,

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

ezt követően pedig 11 percig a szelektíós puffert áramoltattuk. A kapott asszociációs és disszociációs sebességekből kiszámítottuk a spiegelmer-fehérje disszociációs állandóját, melyek az A4 és B10 esetében rendre 10,7 és 3,5 nM-nak adódtak (6.44. ábra). B10 spiegelmer nagyobb affinitása alátámasztja a szűrésnél látott adatokat igazolva a kidolgozott módszer alkalmazhatóságát.



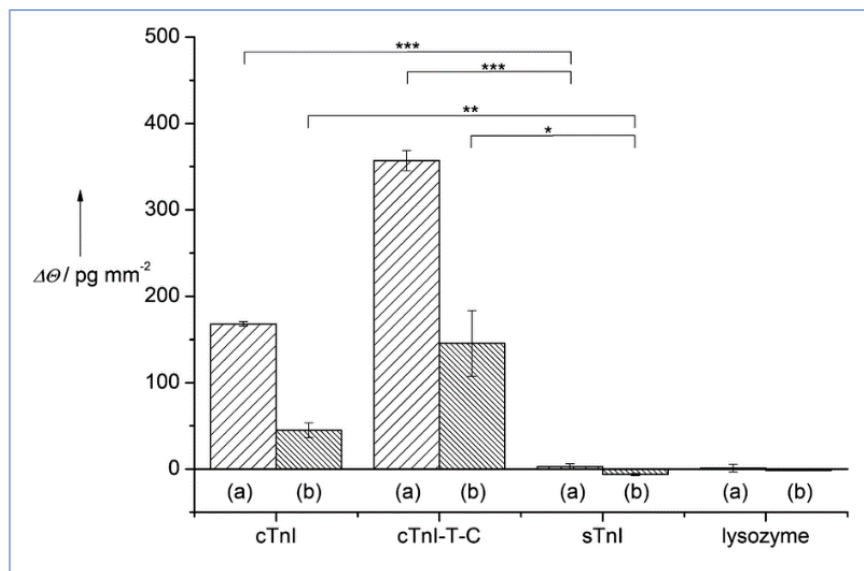
6.44. ábra Spiegelmer-cTnI komplexek K_D értékének meghatározása során kapott SPR görbék.

A csip felületén 125, 250, 500 and 1000 ng/ml cTnI koncentrációjú oldatok kerültek áramoltatásra. Az alkalmazott koncentrációk alulról felfelé növekednek a grafikonon [288].

Miután bizonyítottuk, hogy a spiegelmek nagy affinitással kötődnek célfehérjéjükhöz, megvizsgáltuk, mennyire szelektív a kialakult kölcsönhatás. A cTnI egy erősen bázikus fehérje ($pI=9,87$), ennek megfelelően fiziológiás körülmények között pozitívan töltött. Ezzel a töltéssel szemben áll a spiegelmek foszfodiészter kötéseiből fakadó negatív töltöttség, így nem volt kizárható, hogy az SPR mérésekkel meghatározott alacsony disszociációs állandó a nem szelektív ionos kölcsönhatásnak köszönhető. A kérdés megválaszolására egy hasonlóan magas pI értékkel rendelkező fehérje, a lizozim spiegelmerrel való kölcsönhatását vizsgáltuk meg. Mivel a lizozim hozzáadására nem tapasztaltunk törésmutató-változást a spiegelmekkel borított csip felületén, kijelenthettük, hogy a kölcsönhatás kialakításához nem elegendő a partnerek ellentétes töltése (6.45. ábra). A spiegelmer szelektivitásának tanulmányozásával egy további lépést tettünk, leellenőriztük, hogy a cTnI-vel több mint 50% aminosav-szekvencia-homológiát mutató sTnI mennyiben tud kötődni spiegelmereinkhez. Az SPR mérések azt igazolták, hogy sem a nagyobb affinitású, sem a nagy kópiaszámú spiegelmer nem lép kapcsolatba az sTnI-vel, bizonyítva magas szelektivitásukat (6.45. ábra).

A szelektivitásvizsgálatokat követően megmértük, mennyiben alkalmasak a spiegelmek szívizomsejtek léziója nyomán keringésben megjelenő hármis troponin komplex detektálására. A megfigyelt SPR törésszög-változások egyértelműen azt jelezték, hogy a spiegelmek a monomer cTnI mellett a troponin mérések sztenderdjeként használt I-T-C komplexet (Hytest) is megkötik a csip felületén (6.45. ábra). A komplex mintáknál látható magasabb törésmutató-változás minden bizonnyal az I-T-C

monomerhez viszonyított nagyobb molekulatömeg következtében alakult ki, ugyanis az SPR törésmutatójának változása a bekötött molekula tömegével párhuzamosan növekszik, így a kötés erősségére ebben a kísérleti elrendezésben nem vonható le következtetés.

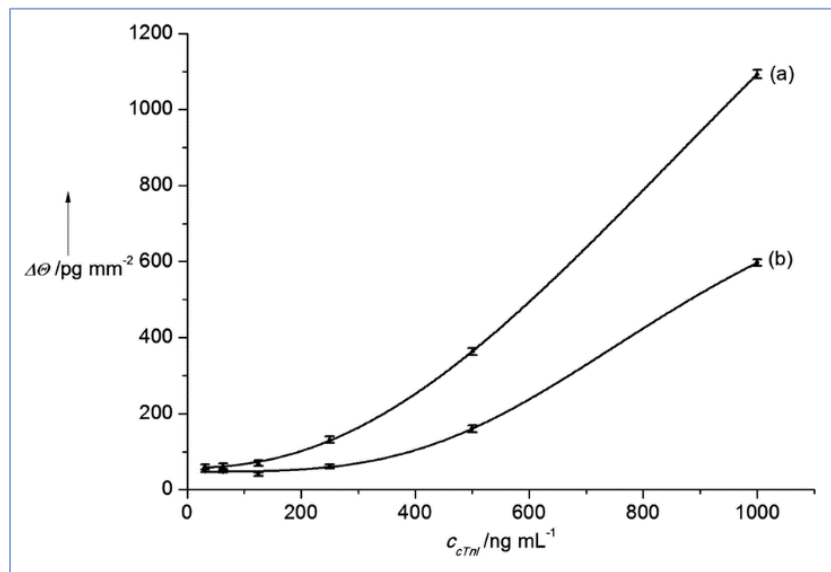


6.45. ábra A spiegelmer szelektivitásának vizsgálata SPR alkalmazásával.

* ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) és *** ($P < 0,0005$). A hibaszávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [288].

Az előzőekben bemutatott kísérletek igazolták, hogy az A4 és B10 spiegelmerek differenciálni tudnak a troponin I izoformák között, azonban arra nem adnak választ, hogy a feltételezett alkalmazásuk mátrixában, a vérben is megőrzik-e szelektivitásukat. A vérszérum fehérjekoncentrációjának kb. 95%-át a 12 legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérje adja, és ezek koncentrációja 5 nagyságrenddel is magasabb lehet a diagnosztikailag releváns cTnI koncentrációnál, így ezen fehérjékkel akár egy magas K_D értékű kölcsönhatás is végzetes lehet a spiegelmer diagnosztikai alkalmazásának tekintetében [289]. Mindezen tényezők figyelembevételével, úgy döntöttünk, vérszérumban is értékeljük a spiegelmer cTnI-szelektivitását. A kísérlet során tízszeresen hígított szérumhoz adtunk ismert koncentrációjú cTnI fehérjét, és ezzel az oldattal végeztük el az SPR méréseket. (Az ennél kisebb hígítású vérszérum az SPR mérésekben spiegelmer nélkül is rendkívül nagy háttérrel ad.) Az eredmények elvárásaink szerint alakultak, és összhangban voltak korábbi méréseink adataival. Mindkét spiegelmer a cTnI-koncentráció függvényében mutatott törésmutató-változást, és a B10 jelű már alacsonyabb koncentrációnál is detektálható változást mutatott (6.46. ábra).

A spiegelmer alkalmazhatóságára irányuló további vizsgálataink során a stabilitásukra kerestük a választ, ezért a spiegelmerrel módosított csipeket megszáritottuk és fél évig hűtőben tároltuk, illetve négyszer regeneráltuk alkalikus mosással. A spiegelmer környezeti és kémiai behatások elleni rezisztenciáját jól bizonyította, hogy sem a hosszú tárolási idő, sem a többszöri regenerálási ciklus nem vezetett a csipek alacsonyabb szenzitivitásához (nem bemutatott adat).



6.46. ábra A spieglerek kalibrációs egyenese.

Az illesztéshez a Hill egyenlet 1:1 kölcsönhatás sztöchiometriát feltételezve került felhasználásra. A hibaszávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [288].

Összeségében ezek az eredmények bizonyították, hogy a SELEX-ben használt építóp racionális tervezésével és a spieglernerjeltek szűrésével fiziológias eredetű mintákban is jól alkalmazható spieglereket lehet szelektálni. Mindamelllett, hogy kidolgoztunk egy eljárást a doménalapú spieglerszelekcióra, és ennek segítségével elsőként sikerült diagnosztikai potenciállal rendelkező spieglereket azonosítani, kiemelendő, hogy paramétereik alapján a spieglerek a cTnI diagnosztikában jelenleg alkalmazott ellenanyagoknál kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkeznek. Egyrészt egy kiterjedt vizsgálat szerint az alkalmazott antitestek K_D értéke 74 nM–2,6 μM tartományba esik, mely számok legalább egy nagyságrenddel nagyobbak a spieglereinknél megállapítottaknál [290]. Másrészt az adott biomarker szelektív azonosítását általánosságban két ellenanyag segítségével, szendvics elrendezésben biztosítják, míg SPR méréseink alapján egyetlen spieglerek is elegendő lehet a cTnI vérszérumban történő detektálására. Ezek a megfigyelések és megfontolások arra bátorítottak minket, hogy a spieglerek felhasználásával további cTnI-detekciós eljárásokat fejlesszünk ki.

3.3.2. Kardiális troponin I mérése spieglerek-antitest szendvics rendszerrel

A fentiekben bemutatott eredmények alapján a cTnI szelektív azonosítása akár vérszérumban is kivitelezhető egyetlen spieglerekkel, azonban napjaink diagnosztikai rendszereitől a szelektivitás mellett az érzékenység is elvárt követelmény. Ezen második feltételnek a szendvics elrendezésű rendszerek alkalmazásával lehet eleget tenni, ahol az első biomarkerre szelektív receptor befogóként működik, míg a második, a detektorként funkcionáló antitest fluoreszcens vagy kemilumineszcens festékkel, illetve enzimmel jelölt, így több nagyságrendnyi jelerősítést tesz lehetővé [291]. Szendvics

rendszerek előnyeit szem előtt tartva megvizsgáltuk, hogy a B10 spiegelmer mennyiben alkalmazható ebben a típusú elrendezésben [231].

| I-T-C ng/ml | | cTnI ng/ml | |
|-------------|-------|------------|------|
| Számított | Mért | Számított | Mért |
| 1 | 0,5 | 1 | 0,06 |
| 2 | 1,02 | 5 | 0,27 |
| 4 | 2,12 | 10 | 0,42 |
| 8 | 4,35 | 20 | 1,00 |
| 16 | 9,3 | 30 | 1,71 |
| 32 | 21,02 | 40 | 2,26 |
| 64 | 41,74 | 50 | 3,22 |

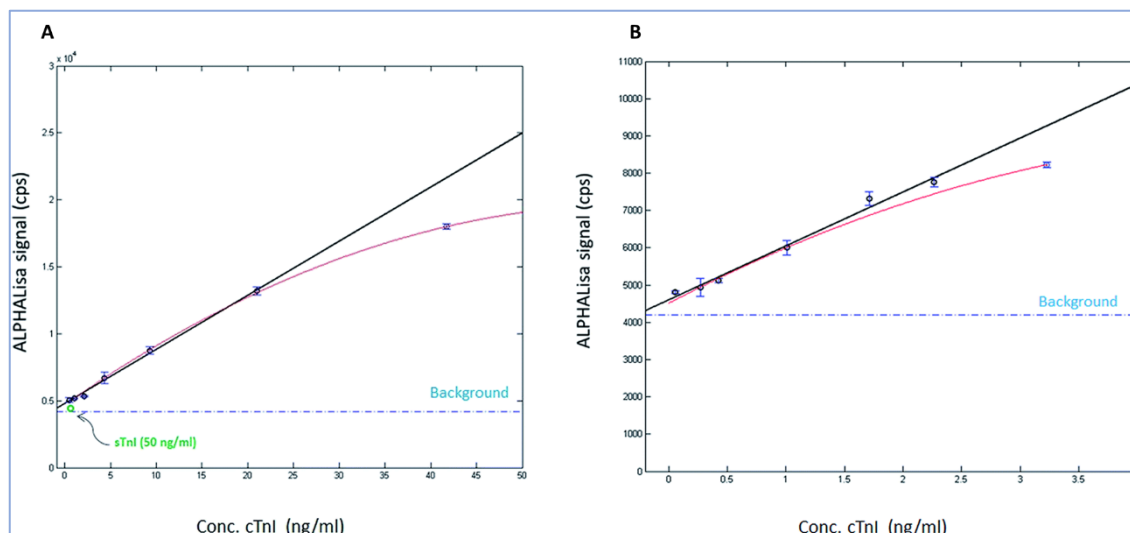
6.5. táblázat A számított és mért cTnI-, illetve I-T-C-koncentrációk közötti különbségek [231].

A cTnI-ről jól dokumentált, hogy amellett, hogy a keringésbe kerülve gyorsan degradálódik, hajlamos az üveg és műanyag felületekre tapadni, így a valós és a számított cTnI-koncentráció között jelentős eltérések lehetnek [292]. Annak vizsgálatára, hogy ez a megfigyelés mennyire befolyásolhatja mérési eredményeinket meghatároztuk cTnI-mérések általánosan használt kalibrátorával az I-T-C komplexszel kiegészített, eredendően cTnI-mentes vérszérumokban mérhető troponinkoncentrációkat. Ennek során a tízszeres hígítású troponinmentes szérumokat adott mennyiségű I-T-C komplexszel egészítettük ki, a méréseket pedig az ARCHITECT STAT Troponin-I készlettel egyetemünk Transzplantációs és Sebészeti Klinika Laboratóriumában végeztük el. A kapott adatok azt jelezték, hogy a mért koncentrációk hozzávetőlegesen a számított érték felének adódtak (6.5. táblázat). Amennyiben a fenti kísérletet az *in vitro* transzlációval előállított cTnI monomer hozzáadásával valósítottuk meg, még szignifikánsabb eltérések láthattunk a várt és mért fehérjekoncentrációnál: a két érték között mintegy hússzoros különbség volt a számított érték javára (6.5. táblázat). Az eredmények részletesebb értékelésével láthatóvá válik, hogy a növekvő cTnI-koncentrációval a várt és a mért értékek közötti különbség csökkenő tendenciát mutat. Ezt a jelenséget jól magyarázhatja a cTnI műanyag felületekhez való kötődése, ugyanis egy bizonyos koncentrációnál a felület telítődhet, így az nem csökkenti tovább a troponin koncentrációját. Megjegyzendő, hogy hasonló eredményre vezethet a cTnI degradációjáért felelős enzimek telítése is, így a fehérje lebomlása is szerepet játszhat a két érték közötti különbség kialakulásában. Végül azt is meg kell említeni, hogy ezek az eredmények általánosságban illusztrálják a cTnI diagnosztika egyik limitáló tényezőjét. Nevezetesen a különböző gyártók által forgalmazott diagnosztikai készletek eltérő cTnI sztenderdekkel, más-más módon kalibrálják készülékeiket, így a diagnosztikában mért eredmények sokkal inkább a relatív, mint az abszolút cTnI-koncentrációról nyújtanak információt, következésképpen az eltérő berendezéseken kapott adatok nem konvertálhatók egymásba.

Amint az látható volt, a B10 spiegelmer a cTnI N-terminálisának közelében elhelyezkedő aminosav-motívumra szelektív, így a sztérikus gátlást elkerülendő egy C-terminális közeli epitópra szelektív ellenanyagot kerestünk a spiegelmer-antitest szendvics összeállításához. Habár a leírások szerint 10% körüli keresztreaktivitást mutat a sTnI-vel, választásunk a cTnI 169–178 epitópjára generált monoklonális ellenanyagra (Mab 267) esett, mivel a fehérje ezen része az I-T-C hármásban is a komplexben felszínén elérhető formában van jelen. Kísérleteinkhez a korábban már ismertett ALPHA kimondottan vérplazmában, illetve szérumban történő mérésekre kifejlesztett változatát alkalmaztuk. Az ún. AlphaLISA akceptor gyöngyeiben a policiklusos aromás rubrént európiumkelát helyettesíti, így az emissziós spektrum egy szűk 605-625 nanométeres tartományba esik, és kevésbé interferál a hemoglobin 500-600 nm közötti abszorpciós maximumaival.

Mivel méréseinket troponinmentes vérszérumban kívántuk kivitelezni, kísérleteink során tekintetbe kellett vennünk a mátrixban nagy mennyiségben jelenlévő endogén antitesteket is. Az ALPHA alapvetően egy homogén rendszer, a méréshez szükséges minden komponens egyszerre jelen van az elegyben, tervezett mérésünk azonban ebben az elrendezésben közvetlenül nem volt kivitelezhető, ugyanis a troponin I-re szelektív ellenanyaghoz képest a szérum endogén immunglobulinjai több nagyságrendnyi feleslegben voltak jelen, így az AlphaLISA Protein A donor gyöngyéhez csak elenyésző mennyiségben kapcsolódhatott a mérés szempontjából releváns szelektív antitest. Az endogén és szelektív antitestek közötti kompetíciót kizárandó a mérési elegyhez adásukat megelőzően a monoklonális ellenanyagot dimetil-pimelimidát segítségével kovalensen kapcsoltuk a Protein A donor gyöngyökhöz. Az antitesttel módosított gyöngyöket és a biotinjelölt spiegelmert ismert mennyiségű I-T-C komplexet, illetve sTnI fehérjét tartalmazó hígított vérszérumhoz adtuk (az SPR mérésnél látottakhoz hasonlóan, ebben a rendszerben sem alkalmazható a hígítás nélküli szérum), majd egyórás inkubáció után az elegyet kiegészítettük sztreptavidin donor gyöngyökkel. Az újabb egyórás inkubációt követő lumineszcenciamérés során kapott adatok alacsony sztenderd szórással rendelkeztek, és a detektált jelek intenzitása a ng/ml tartományban jó linearitást mutatott az I-T-C-koncentrációval, míg az 50 ng/ml sTnI-koncentrációjú mintában a háttérnek megfelelő jel volt látható (6.47. ábra). A monomer fehérje mérhetőségének meghatározásához azonos módon valósítottuk meg a kísérletet, de a komplex helyett *in vitro* transzlációval termelt cTnI-t adtuk a hígított vérszérumhoz. A mérési eredmények a komplexnél megfigyeltékhez hasonlóan alakultak, azonban a fehérjekoncentráció és a lumineszcenciaérték kisebb mérési tartományban mutatott linearitást (6.47. ábra).

A spiegelmer-antitest elrendezésünkkel demonstráltuk, hogy az N-terminális epitópra szelektált spiegelmer megfelelően kiválasztott ellenanyaggal jól alkalmazható szendvics típusú mérési rendszerekben. Habár a bemutatott rendszer szelektivitása megfelelő, vérszérumban is alkalmazható, és a közeli homológ vázizom troponinnal sem mutat keresztreaktivitást, érzékenysége messze elmarad a napjainkban rutinszerűen alkalmazott cTnI-koncentrációt meghatározó készletekétől. Mivel az alkalmazott AlphaLISA diagnosztikai célokra nem validálható, várható közvetlen gyakorlati jelentősége csekély, nem folytattunk további, a detekciós határ csökkentésére irányuló vizsgálatokat.



6.47. ábra Az AlphaLISA lumineszcens jelének változása az I-T-C (A), illetve cTnI (B) koncentrációjának függvényében.

Az I-T-C koncentráció cTnI-re konvertált módon feltüntetve. $R^2=0,994$, illetve $0,985$.

A hibasávok három mintából származó mérés sztenderd hibáját jelölik [231].

3.3.3. Kardiális troponin I mérése spiegelmer-spiegelmer szendvics rendszerrel

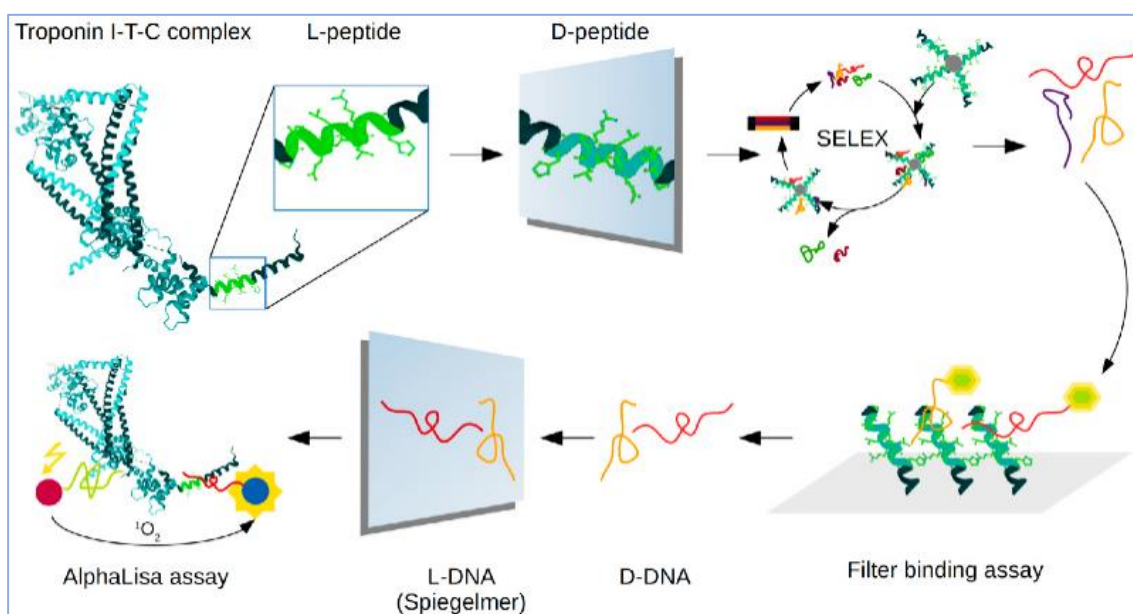
A megelőző fejezetekben látható volt, hogy sikeresen generáltuk olyan spiegelmert, amely önmagában és szendvics elrendezésben is alkalmas a cTnI vérszérumban történő kimutatására, a szendvics egyik tagjaként azonban egy monoklonális ellenanyag szolgált. Mivel a spiegelmer szelekcióval kapcsolatos kísérleteink célkitűzése az ellenanyagok alkalmazásából fakadó hátrányok teljes kiküszöbölése volt, a cTnI N-terminálisára szelektív spiegelmer izolálását követően hozzálátunk egy ezzel kompatibilis, a fehérje C-terminálisát felismerő spiegelmer szelekciójához [293].

A megfelelő, C-terminálishoz közeli epitóp kiválasztása során a korábbi spiegelmerszelekcióknál részletezett megfontolásokat követük, és a fehérje 161–169 pozíciójában elhelyezkedő peptidet szintetizáltattuk meg D-aminosavakból egy C-terminális extra ciszteinnel (dRdAdKdEdSdLdDdLdRdAC), mely lehetővé tette a peptid mágneses bróm-acetil gyöngyre történő kapcsolását. A 7 lépésből álló SELEX-et megelőzően a peptid immobilizálására használt, ciszteinnel blokkolt gyönggyel inkubáltuk a kiindulási oligonukleotid-könyvtárat, az 5. lépést követően pedig egy kontraszelektációs lépést iktatunk be, melynek során cianursavval borított gyöngyhöz kapcsolt vérszérum-fehérjékkal kevertük össze a dúsított könyvtárat, hogy eltávolítsuk a gyönggyel, illetve a szérum abundáns fehérjéivel kölcsönható oligonukleotidokat. A SELEX utolsó ciklusával kapott oligonukleotidokat Zero Blunt TOPO vektorba inszertáltuk, majd az inszertek nukleinsav-szekvenciáját Sanger szekvenálással meghatároztattuk. A 96 szekvenálásra elküldött mintából 91 adott értékelhető eredményt, és ezek közül mindössze 2 volt jelen duplikátumként, az összes többit egyetlen baktériumtelep reprezentálta, minek alapján megállapíthatjuk, hogy a könyvtár dúsulása nem volt olyan

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

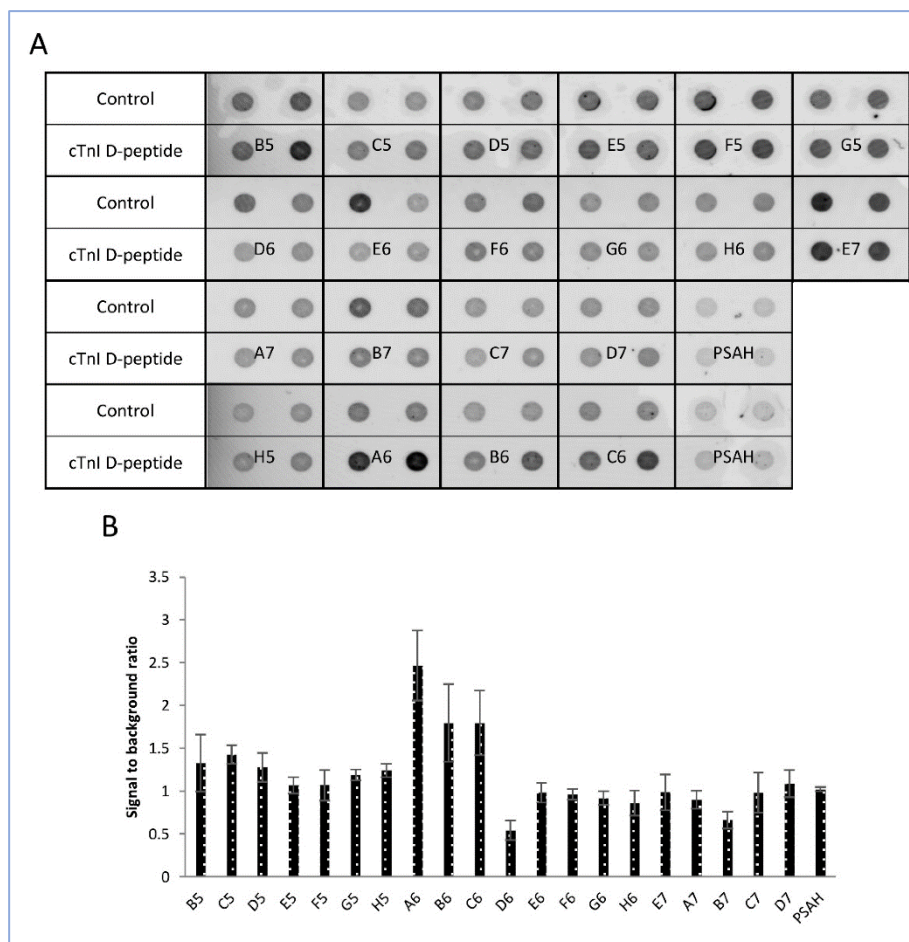
mértékű, mint a korábban kivitelezett spieglemerselekciónál (nem ismertett szekvenciák).

Habár az N-terminális epitópra szelektív spieglemerjelöltek szűrésére kidolgozott eljárásunkat sikeresen alkalmaztuk a legjobb jelöltek azonosítására, a spieglemerselekciónál elérhetőségét, illetve hatékonyságát az SPR-nél költséghatékonyabb és nagyobb áteresztőképességű módszer kifejlesztésével kívántuk tovább növelni. Újabb eljárásunk a membrán- és gyöngykötési (bead bound assay) vizsgálat kombinációjának tekinthető. Röviden annyiban foglalható össze, hogy a selekciónál használt D-peptiddel módosított mágneses gyöngyöt Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt D-oligonukleotiddal inkubáltuk, majd a mosási lépéseket követően a mágneses gyöngyöt nitrocellulóz membránra transzferáltuk, és az újabb mosási lépések után detektáltuk a fluoreszcens jelet (6.48. ábra).



6.48. ábra A spieglemer selekciójának és a jelöltek szűrésének folyamatábrája [293].

A szükséges jelölt oligonukleotidokat a korábbiakban látott módon, fluoreszcens szenz és biotinjelölt antiszensz primerekkel amplifikáltuk a kolónia PCR-termékekből, majd alkalikus kezeléssel szabadultunk meg a sztreptavidin ágyra kapcsolt antiszensz DNS-száltól. A membránon látható fluoreszcens jelek alapján minden oligonukleotid erősebben kötődik a peptidmódosított gyöngyhöz, mint a kontrollként használt PSAH aptamer, azonban számos oligonukleotid – a negatív selekción ellenére is – közel azonos, illetve nagyobb erősséggel önmagához a gyöngyhöz is kapcsolódott (6.49. ábra). A denzitometriás adatok kiértékelésével számszerűsítettük is a látottakat, és ezek szerint az A6, B6 és C6 jelű oligonukleotidok tűntek a legjobb jelölteknek (6.49. ábra).



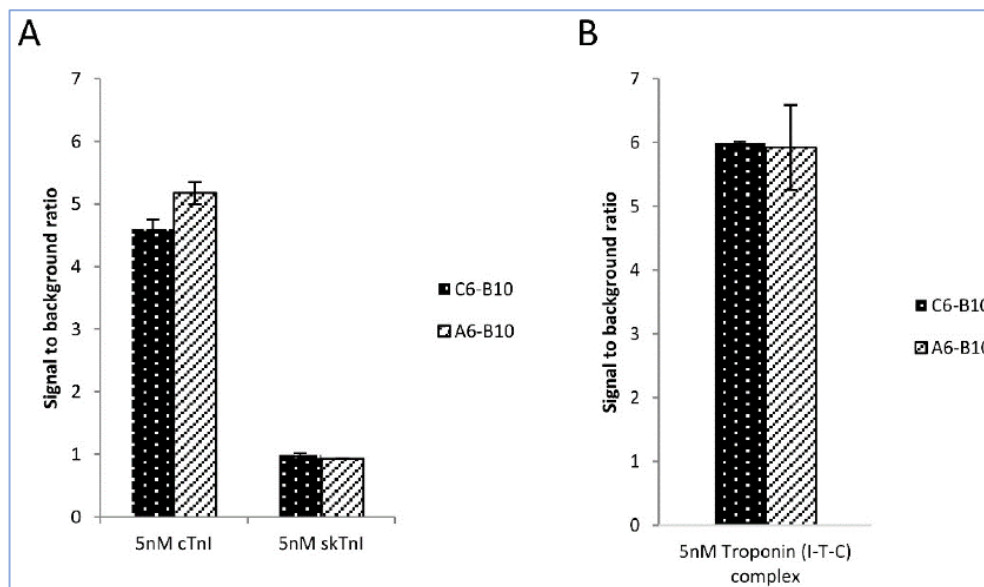
6.49. ábra Az D-oligonukleotidok szűrése membránkötés vizsgálattal.

(A) A membránon detektált fluoreszcens jelek és annak (B) denzitometriás kiértékelése. A hibasávok két pont sztenderd hibáját jelölik [293].

A denzitometriás eredmények figyelembevételével az A6 és C6 jelölteket L-dezoxiribonukleotidokból, az 5' végükön biotinnal megszintetizáltattuk, így a további kísérleteinket már spieglerekkel végeztük (Függelék 3. táblázat). A célkitűzésünknek megfelelően legelőször a spieglerek szendvics típusú elrendezésben való alkalmazhatóságát vizsgáltuk meg. A méréseink során a legjobban teljesítő N-terminális epitópra szelektált spieglert, a B10-est állítottuk a párba az újonnan szintetizáltakkal. A hígított humán plazmához 5 nM végkoncentráció eléréséhez elegendő *in vitro* transzlációval előállított váz, illetve szívizom specifikus troponin I-t adtunk, majd az elegyet kiegészítettük a B10 spieglernel. Egyórás inkubáció után hozzáadtuk a rendszerhez a szterptavidinnel borított AlphaLISA gyöngyöket, majd a megelőzően már sztreptavidin donor gyöngyöz kapcsolt A6, illetve C6 spieglereket. A végső inkubációs idő leteltével megmért lumineszcenciaintenzitások azt jelezték, hogy az A6-B10 és C6-B10 párok egyaránt szelektíven ismerik fel a cTnI-t. A háttérhez viszonyított intenzitásnövekedés az A6-B10 elrendezésnél mintegy négy és félszeres, míg a másik párosnál öt és félszeres volt, amennyiben cTnI került az elegybe (6.50. ábra). Ezzel szemben a sTnI hozzáadására egyik esetben sem nem nőtt meg lumineszcens jel, a mért értékek gyakorlatilag megegyeztek a troponinmentes plazmánál látottakkal (6.50. ábra). Ezt a kísérletet I-T-C komplexszel is elvégeztük, annyiban eltérve a leírtaktól, hogy a

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTEKELÉSÜK

mintákhoz a spiegelmerekkel előinkubált szterptavidin donor és akceptor gyöngyöket adtunk egy lépésben, hogy egyszerűsítsük a mérési protokollt. A mérések hasonló eredményt mutattak mindkét spiegelmerpárnánál, a kontrollhoz viszonyítva hozzávetőlegesen hatszorosára nőtt a lumineszcencia érték, jelezve, hogy spiegelmer szendvicsek a cTnl-nek mind a monomer, mind a komplex formáját szelektíven detektálják (6.50. ábra).



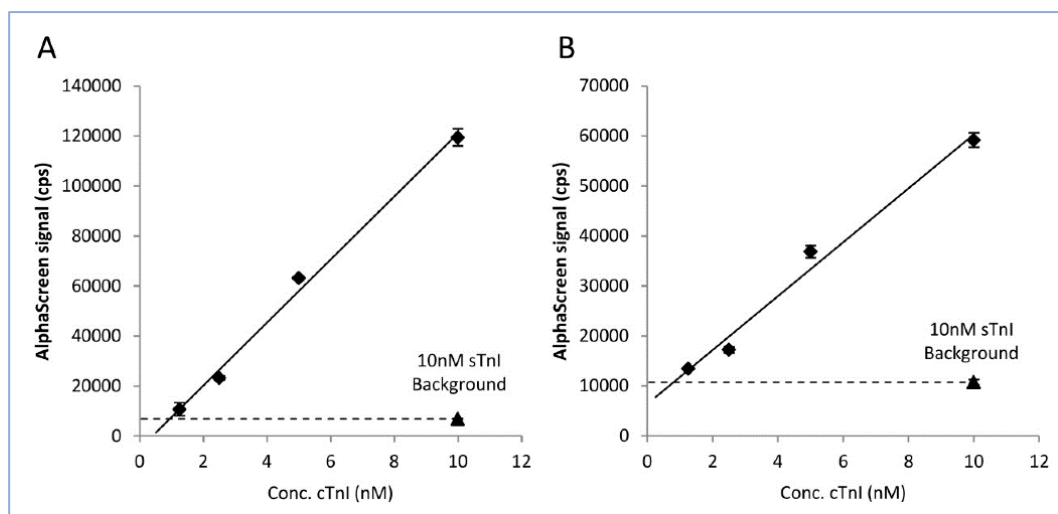
6.50. ábra cTnl és I-T-C szelektív kimutatása spiegelmer szendviccsel.

A troponinmentes szérumhoz viszonyított lumineszcencianövekedés cTnl és sTnl monomer- (A) és I-T-C- (B) tartalmú mintákban A hibasávok három mérés sztenderd hibáját jelölik [293].

Miután a cTnl C-terminálisára szelektált spiegelmer alkalmazhatóságát igazoltuk, részletesebb karakterizálásukba kezdtünk, melynek keretében BME-s együttműködő partnerünk meghatározta a spiegelmer-troponin komplexek disszociációs állandóját. A mérések kivitelezéséhez az extravidinnel borított csipre csöppentették az A6 és C6 spiegelmereket, majd a felülete felett változó koncentrációban áramoltatták az I-T-C komplexet (nem bemutatott adat). A kísérleti eredményekből számított adatok alapján mindkét spiegelmer K_D értéke a nanomol alatti tartományba esett, az A6 és C6 esetében rendre ~ 540 és ~ 305 pM-nak adódott. Ezek az értékek még alacsonyabbak, mint a B10 esetében mértek, de megjegyzendő, hogy az ott látott disszociációs állandó meghatározása során cTnl monomer került alkalmazásra, így a két különböző epitóra szelektált spiegelmerek célfehérjék iránti affinitása ezen adatok alapján nem összevethető. Mindenesetre az megállapítható, hogy a második spiegelmerszelekción is kiemelkedő affinitással rendelkező spiegelmereket eredményezett.

Miután bizonyítottuk a spiegelmer szelektivitását, igazoltuk szendvics rendszerben való alkalmazhatóságukat, és meghatároztuk a spiegelmer-célfehérje disszociációs állandóját, azt is megvizsgáltuk, mennyiben alkalmas a spiegelmer szendvics a cTnl koncentrációjának meghatározására. Kísérleti elrendezésünk megegyezett a cTnl monomer detektálásakor ismertetettel, és méréseinket az *in vitro*

transzlációval termelt, rekombináns cTnI-vel szelekciós pufferben és hígított szérumban egyaránt kiviteleztük. A kapott lumineszcenciaintenzitás adatok 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 (6.51. ábra).



6.51. ábra AlphaLISA szendvics lumineszcencia intenzitásának változása a cTnI koncentrációjának függvényében szelekciós pufferben (A), illetve hígított szérumban (B).

$R^2 = 0,9945$, illetve $0,9843$ értéknek adódott (A), illetve (B) esetében. A hibaszávok három mérés sztochasztikus hibáját jelölik [293].

A dolgozat legutóbbi három fejezetének eredményei igazolták, hogy a spiegelmerekre tekinthetünk úgy, mint potenciális diagnosztikai receptorokra. Bemutattuk, hogy a célfehérje racionálisan megválasztott epitópjára kivitelezett SELEX a fehérjét szelektíven felismerő spiegelmereket eredményezhet. Kidolgoztunk két eljárást, melyek segítségével költséghatékonyan és gyorsan azonosíthatók a legkedvezőbb paraméterekkel rendelkező spiegelmerekek, és amint a meghatározott K_D értékek igazolják, az ily módon szelektált spiegelmerekek célmolekulájuk iránt nagyobb affinitást mutatnak, mint a rutinszerűen alkalmazott antitestek. Végül bizonyítottuk, hogy a spiegelmerpárok szendvics elrendezésben a diagnosztika egyik legkomplexebb mátrixában, a vérérszérumban is alkalmazhatók a cTnI koncentrációjának meghatározására. Habár a koncentrációmeghatározás szelektivitás tekintetében megfelelt az elvárásoknak – lévén a legközelebbi fehérje homológgal, az sTnI-vel a háttérnek megfelelő lumineszcencia jelet adott – érzékenységében több nagyságrenddel elmaradt a napjaink cTnI diagnosztikájában elfogadhatótól. Ugyanezzel a problémával szembesültünk az antitest-spiegelmer elrendezésnél is, és az elért detekciós limit mindkét esetben hasonlóan alakult. A cTnI viszonylag magas kimutathatósági határára két magyarázat is szolgálhat. Egyrészt, a homogén rendszerek általánoságban kevésbé érzékenyek, mint a mosási lépések beiktatásával kivitelezett mérési eljárások, mivel a mosások során szignifikánsan csökkenthető a háttér. Ennek a magyarázatnak azonban ellentmond az a tény, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető, a cTnI-koncentráció meghatározására alkalmas AlphaLISA készlet kimutatási határa $4,7 \text{ pg/ml}$ (Human cardiac Troponin I Kit, Perkin

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Elmer). Mindemelett a Siemens által forgalmazott, diagnosztikai alkalmazásra is jóváhagyott, az ALPHA-val tulajdonképpen megegyező rendszeren (Luminescent oxygen channeling assay (LOCI)) elért érzékenység is a néhány pg/ml-es tartományba esik (Dimension EXL és Dimension Vista Cardiac Troponin I Assay). Ezeket az érzékenységeket minden bizonnyal hosszas és költséges optimalizálással sikerült megvalósítani, ugyanis ismert, hogy a homogén rendszerek rendkívül érzékenyek a puffer összetételére, a receptorok és gyöngyök koncentrációjára, sőt mi több az egyes komponensek hozzáadásának sorrendjére is [294]. E 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 alapkutatással foglalkozó laboratórium keretein, és hacsak nem nyilvánulnak meg egy gyakorlatban is rutinszerűen alkalmazott rendszerben, akkor a fejlesztésre fordított idő és költségek nem állnak arányban a hasznossággal.

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

7. Összefoglalás

Az aptamerek első leírása idestova harminc éve jelent meg, a bennük rejlő lehetőségek gyakorlatban történő kiaknázása azonban még kezdeti stádiumában van. Világszerte mindössze mintegy tucatnyi biotechnológia vállalat foglalkozik az aptamerek szelekciójával és fejlesztésével, a kereskedelmi forgalomban elérhető, aptamereken alapuló diagnosztikai rendszerek száma ennél is alacsonyabb, klinikai alkalmazásig pedig mindössze egyetlen aptamer jutott el napjainkig. Mindezen tények azt a benyomást kelthetik, hogy az aptamerek felfedezésének csak elméleti jelentősége van, közvetlen gyakorlatban történő felhasználásuk nem várható, vizsgálatuk és alkalmazásuk a kutatólaboratóriumok falain belül marad.

Tény, hogy az aptamerekkel kapcsolatos publikációk száma exponenciálisan nő, és az elmúlt tíz évben rendszeresen évente több mint ezer, e tématerülettel foglalkozó közlemény jelenik meg; ugyanakkor ezzel összevetve valóban elenyészőnek tűnik a diagnosztikában, illetve terápiában alkalmazott aptamerek száma, ami azonban csalóka képet adhat gyakorlati jelentőségükre vonatkozóan. Jelenleg, többségében különböző tumorer, illetve hemosztázis-zavarok kezelésére kifejlesztett hét aptamer és három spiegelmer van különböző klinikai fázisban. Megjegyzendő, hogy mindkét, hármás fázisú vizsgálatba került aptamer szelekcióját és *in vitro*, valamint *in vivo* hatásvizsgálatát hozzávetőlegesen húsz éve végezték el. Ez a kétévtizedes, gyógyszerjelöltől-klinikai fázisig terjedő átfutási idő mintegy kétszerese a monoklonális ellenanyagból kiinduló gyógyszerfejlesztésnél szokásosnak. A jelentős különbség egyik legfontosabb tényezője minden bizonnyal az aptameralapú gyógyszerek fejlesztésére kidolgozott protokollok, analitikai módszerek hiánya, így joggal feltételezhető, hogy az aptamerek gyógyászati alkalmazásának elterjedésével együtt szignifikánsan csökken az ilyen típusú terápiás szerek előállításának ideje.

Az aptamerek diagnosztikai alkalmazása felemás képet mutat, ugyanis a piacon csak néhány teszt érhető el, de ezek egyike, a SomaLogic csipje több mint hétezer fehérje koncentrációjának együttes meghatározására alkalmas. Ez utóbbi platform jól illusztrálja az aptamereken alapuló diagnosztika potenciálját, ugyanakkor a vállalat üzletpolitikájának következtében némiképp hátráltathatja is az ilyen irányú fejlesztéseket. Amint korábban olvashattuk, a SomaLogic sem a csipen található, fehérjékre szelektív aptamereket, sem a platformot nem teszi elérhetővé, kizárólag a hozzá eljuttatott mintákat analizálja, majd az eredményeket értékeli. Ez a hatalmas technológiai fölény elriaszthatja az aptamer-alapú diagnosztikai fejlesztéseken dolgozó versenytársak potenciális befektetőit.

Az aptamerek elterjedtebb alkalmazását nem csak a piaci körülmények hátráltatják, további tényezőként megemlítendő a nem megfelelő körültekintéssel kivitelezett aptamer szelekciós és -karakterizációs kísérletek nyomán született közlemények, valamint az aptamerek ellenanyaganalógnaként történő alkalmazása. Habár folyamatosan csökkenő számban, de mind a mai napig jelennek meg olyan publikációk, amelyekben az aptamerek ideális pufferekben történő szelekcióját és hasonló körülmények között, egyetlen módszerrel kivitelezett karakterizálását ismertetik. Ez a fajta

megközelítés gyakorlati jelentőséggel csak igen ritkán bíró aptamereket eredményez, ugyanis az oligonukleotidok térszerkezete érzékeny az oldat összetételére, így nem meglepő, hogy az ily módon szelektált aptamerek általában a gyakorlati felhasználásuk során funkciójukat veszítik. Feltételezhető, hogy számos kutatót és fejlesztőt az ily módon előállított aptamerekkel kapott kiábrándító eredmények fordítottak el az aptamerekkel kapcsolatos munkáktól.

Az aptamerek annyiban hasonlíthatók az ellenanyagokhoz, hogy azokkal összevethető – sok esetben még jobb – szelektivitást és affinitást mutatnak célmolekulájuk iránt, ezzel azonban a két molekula közötti hasonlóságok ki is merültek. Az aptamerek alkalmazása során rendkívül fontos szem előtt tartani, hogy az ellenanyagokat használó rendszerek nem konvertálhatók aptamer-alapúakká az ellenanyagok egyszerű aptamerrel történő helyettesítésével. A két receptor molekula teljesen más kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, így az ellenanyagokat használó metodikák felhasználása során gyűjtött tapasztalatok legjobb esetben is csak iránymutatók lehetnek, de valójában az aptamereken nyugvó rendszerek teljesen új, az ellenanyagoknál alkalmazottaktól gyökeresen eltérő módszerek fejlesztését igénylik.

Kutatócsoportunk munkájával elsősorban az aptamerek szelekciója és karakterizálása során felmerülő nehézségekre kívánt megoldást 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 aptamer szelekció esetében nem kézenfekvő feladat eleget tenni. Az eukarióta fehérjék előállítása az általánosságban használt prokarióta rendszerekben gyakran rendkívül körülményesen, vagy egyáltalán nem megvalósítható. Erre a problémára kínál megoldást a búzacsíra fehérjekivonaton nyugvó *in vitro* translációs rendszer, ugyanis alkalmazásával az aptamerek szelekciójához szükséges µg-os nagyságrendű fehérjemennyiségek gyorsan, egyszerűen és költséghatékonyan állíthatók elő. Az első *in vitro* translációs 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 aptamer szelekciós kísérleteink fehérjeigényét biztosítottuk – számos fehérje funkciójának felderítéséhez is hozzájárultunk.

Az aptamerek szelekcióját és karakterizálását közvetlenül segítő fejlesztéseink a DNS egyszálúsítására, 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 egyszálú 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 aptamer szelekció sikerét szignifikánsan növeli az aminosavszerű oldalláncokkal rendelkező, módosított nukleotidok alkalmazása, mely megfigyelés fényében laboratóriumunkban egy indol-csoporttal 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 által a vírus fertőzőképességére kifejtett hatást vizsgáljuk együttműködő partnereinkkel.

A metodikai fejlesztésekkel párhuzamosan változatos célmolekulákra szelektáltunk aptamereket, és bizonyítottuk, hogy a megfelelő körültekintéssel 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 helyettesíthetők, 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 spiegelmerok is alkalmasak voltak a célfehérjék véréplazma-tartalmú oldatban történő kimutatására. Megjegyzendő, hogy a spiegelmereken alapuló mérési elrendezéseink kimutatási határai nagyságrendekkel elmaradtak a klinikai gyakorlatban alkalmazott tesztekhez láthatóknál, a viszonylag alacsony érzékenység azonban valószínűsíthetően nem a spiegelmerok inherens tulajdonságaiból adódik. Az izolált spiegelmerok szelektivitása kiemelkedő, a közeli homológ sTnI-vel sem mutatnak keresztreaktivitást, disszociációs konstansunk pedig szignifikánsan alacsonyabb a diagnosztikai tesztekben alkalmazott ellenanyagokénál. Ezek az eredmények alátámasztják azt a korábbiakban tárgyalt metodológiai nehézséget, miszerint az aptamereken alapuló mérési rendszerek hosszas, egyedi optimalizálást igényelnek, és ennek idő- és költségigénye alap kutatással 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.

8. Referenciák

1. Stretton, A.O.W. The first sequence: Fred Sanger and insulin. *Genetics* **2002**, *162*, 527–532.
2. Kendrew, J.C.; Bodo, G.; Dintzis, H.M.; Parrish, R.G.; Wyckoff, H.; Phillips, D.C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **1958**, *181*, 662–666.
3. Fischer, E.; Fischer, E. Die Chemie der Proteine und ihre Beziehungen zur Biologie. In *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine II (1907–1919)*; Springer Berlin Heidelberg, **1923**; pp. 1–21.
4. Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
5. Gutte, B.; Merrifield, R.B. The synthesis of ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1922–1941.
6. Nishiuchi, Y.; Inui, T.; Nishio, H.; Bódi, J.; Kimura, T.; Tsuji, F.I.; Sakakibara, S. Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 13549–13554.
7. Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Boyer, H.W.; Helling, R.B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 3240–3244.
8. Gileadi, O. Recombinant protein expression in E. coli : A historical perspective. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2017; Vol. 1586, pp. 3–10.
9. Sørensen, H.P.; Mortensen, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. *J. Biotechnol.* **2005**, *115*, 113–128.
10. Kane, J.F.; Hartley, D.L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* **1988**, *6*, 95–101.
11. Strandberg, L.; Enfors, S.O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*.
12. Ramón, A.; Señorale-Pose, M.; Marín, M. Inclusion bodies: not that bad.... *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 56.
13. Baeshen, N.A.; Baeshen, M.N.; Sheikh, A.; Bora, R.S.; Ahmed, M.M.M.; Ramadan, H.A.I.; Saini, K.S.; Redwan, E.M. Cell factories for insulin production. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*.
14. Middelberg, A.P.J. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 2002, *20*, 437–443.
15. Chow, M.K.M.; Amin, A.A.; Fulton, K.F.; Whisstock, J.C.; Buckle, A.M.; Bottomley, S.P. REFOLD: An analytical database of protein refolding methods. *Protein Expr. Purif.* **2006**, *46*, 166–171.
16. Itakura, K.; Hirose, T.; Crea, R.; Riggs, A.D.; Heyneker, H.L.; Bolivar, F.; Boyer, H.W. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science (80)*. **1977**, *198*, 1056–1063.
17. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol. cloning a Lab. manual.* **1989**.
18. LaVallie, E.R.; DiBlasio, E.A.; Kovacic, S.; Grant, K.L.; Schendel, P.F.; McCoy, J.M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Bio/Technology* **1993**, *11*, 187–193.
19. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 523–533.
20. Smith, D.B.; Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in

- Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **1988**, *67*, 31–40.
21. Maina, C. V.; Riggs, P.D.; Grandea, A.G.; Slatko, B.E.; Moran, L.S.; Tagliamonte, J.A.; McReynolds, L.A.; Chu, di G. An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **1988**, *74*, 365–373.
 22. Kimple, M.E.; Brill, A.L.; Pasker, R.L. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2013**, *73*, 9.9.1-9.9.23.
 23. LILIUS, G.; PERSSON, M.; BÜLOW, L.; MOSBACH, K. Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached polyhistidine affinity tails. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *198*, 499–504.
 24. Smith\$ §, M.C.; Furman\$, T.C.; Ingoliaq, T.D.; Pidgeony, C. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Chelating Peptide-immobilized Metal Ion Affinity Chromatography A NEW CONCEPT IN AFFINITY CHROMATOGRAPHY FOR RECOMBINANT PROTEINS**; **1988**; Vol. 263;.
 25. McLellan, J.S.; Chen, M.; Leung, S.; Graepel, K.W.; Du, X.; Yang, Y.; Zhou, T.; Baxa, U.; Yasuda, E.; Beaumont, T.; et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science* **2013**, *340*, 1113–7.
 26. Cronan JE Jr. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J Biol Chem.* **1990**, *18*, 10327-10333.
 27. Ashraf, S.S.; Benson, R.E.; Payne, E.S.; Halbleib, C.M.; Grøn, H. A novel multi-affinity tag system to produce high levels of soluble and biotinylated proteins in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* **2004**, *33*, 238–245.
 28. Kay, B.K.; Thai, S.; Volgina, V. V. High-throughput biotinylation of proteins. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *498*, 185–198.
 29. TG, S.; A, S. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* **1993**, *6*.
 30. Schmidt, T.G.M.; Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1528–1535.
 31. Hopp, T.P.; Prickett, K.S.; Price, V.L.; Libby, R.T.; March, C.J.; Cerretti, D.P.; Urdal, D.L.; Conlon, P.J. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* **1988**, *6*, 1204–1210.
 32. Kolodziej, P.A.; Young, R.A. Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzymol.* **1991**, *194*, 508–519.
 33. Schembri, L.; Dalibart, R.; Tomasello, F.; Legembre, P.; Ichas, F.; De Giorgi, F. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 107–108.
 34. Balbás, P.; Lorence, A. *Recombinant Gene Expression Third Edition*; **2004**; Vol. 824; ISBN 1592597742.
 35. Savitsky, P.; Bray, J.; Cooper, C.D.O.; Marsden, B.D.; Mahajan, P.; Burgess-Brown, N.A.; Gileadi, O. High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 3–13.
 36. LITTLEFIELD, J.W.; KELLER, E.B.; GROSS, J.; ZAMECNIK, P.C. Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* **1955**.
 37. Nirenberg, M.; Caskey, T.; Marshall, R.; Brimacombe, R.; Kellogg, D.; Doctor, B.; Hatfield, D.; Levin, J.; Rottman, F.; Pestka, S.; et al. The RNA code and protein synthesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1966**, *31*, 11–24.
 38. BYRNE, R.; LEVIN, J.G.; BLADEN, H.A.; NIRENBERG, M.W. THE IN VITRO FORMATION OF A DNA-RIBOSOME COMPLEX. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States* **1964**.

39. Roberts, B.E.; Paterson, B.M. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**.
40. PELHAM, H.R.B.; JACKSON, R.J. An Efficient mRNA-Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *67*, 247–256.
41. Alexandrov, K.W.A.J. *Cell-Free Protein Synthesis, Methods and Protocols*; 2014; ISBN 9781627037815.
42. Liu, D. V.; Zawada, J.F.; Swartz, J.R. Streamlining Escherichia Coli S30 Extract Preparation for Economical Cell-Free Protein Synthesis. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *21*, 460–465.
43. Ramachandiran, V.; Kramer, G.; Hardesty, B. Expression of different coding sequences in cell-free bacterial and eukaryotic systems indicates translational pausing on Escherichia coli ribosomes. *FEBS Lett.* **2000**, *482*, 185–188.
44. Endo, Y.; Sawasaki, T. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 373–380.
45. Taylor, B.E.; Irvin, J.D. Depurination of plant ribosomes by pokeweed antiviral protein. *FEBS Lett.* **1990**, *273*, 144–146.
46. BRUMMER, J.; THOLE, H.; KLOPPSTECH, K. Hordothionins inhibit protein synthesis at the level of initiation in the wheat-germ system. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 425–433.
47. Madin, K.; Sawasaki, T.; Ogasawara, T.; Endo, Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 559–564.
48. Preiss, T. The End in Sight: Poly(A), Translation and mRNA Stability in Eukaryotes. **2013**.
49. Sawasaki, T.; Ogasawara, T.; Morishita, R.; Endo, Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14652–14657.
50. Kim, T.W.; Oh, I.S.; Keum, J.W.; Kwon, Y.C.; Byun, J.Y.; Lee, K.H.; Choi, C.Y.; Kim, D.M. Prolonged cell-free protein synthesis using dual energy sources: Combined use of creatine phosphate and glucose for the efficient supply of ATP and retarded accumulation of phosphate. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 1510–1515.
51. Spirin, A.S.; Baranov, V.I.; Ryabova, L.A.; Ovodov, S.Y.; Alakhov, Y.B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science (80-)*. **1988**, *242*, 1162–1164.
52. Kim, D.M.; Choi, C.Y. A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*, 645–649.
53. Mészáros, T. Fehérjeszintézis kémcsőben, avagy az in vito transzláció alkalmazási lehetőségei. *A növények molekuláris biológiájától a zöld biotechnológiáig: Dudits Dénes akadémikus 70. születésnapjára*; Fehér, A., Ed.; Akadémiai Kiadó: Budapest, **2014**; pp. 154–167.
54. Sawasaki, T.; Hasegawa, Y.; Morishita, R.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Endo, Y. Genome-scale, biochemical annotation method based on the wheat germ cell-free protein synthesis system. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1549–1555.
55. Goshima, N.; Kawamura, Y.; Fukumoto, A.; Miura, A.; Honma, R.; Satoh, R.; Wakamatsu, A.; Yamamoto, J.I.; Kimura, K.; Nishikawa, T.; et al. Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 1011–1017.
56. Sepetiene, R.; Sidlauskiene, R.; Patamsyte, V. Plasma for Laboratory Diagnostics. In *Plasma Medicine - Concepts and Clinical Applications*; InTech, **2018**.
57. Anderson, N.L.; Anderson, N.G. The Human Plasma Proteome HISTORY, CHARACTER, AND DIAGNOSTIC PROSPECTS*. **2002**.
58. Raoufinia, R.; Mota, A.; Nozari, S.; Aghebati Maleki, L.; Balkani, S.; Abdolalizadeh, J. A

- methodological approach for purification and characterization of human serum albumin. *J. Immunoass. Immunochem.* **2016**, *37*, 623–635.
59. Hughes, G.J.; Frutiger, S.; Paquet, N.; Ravier, F.; Pasquali, C.; Sanchez, J. -C; James, R.; Tissot, J. -D; Bjellqvist, B.; Hochstrasser, D.F. Plasma protein map: An update by microsequencing. *Electrophoresis* **1992**, *13*, 707–714.
60. Crutchfield, C.A.; Thomas, S.N.; Sokoll, L.J.; Chan, D.W. Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clin. Proteomics* **2016**, *13*, 1.
61. Schwenk, J.M.; Omenn, G.S.; Sun, Z.; Campbell, D.S.; Baker, M.S.; Overall, C.M.; Aebersold, R.; Moritz, R.L.; Deutsch, E.W. The Human Plasma Proteome Draft of 2017: Building on the Human Plasma PeptideAtlas from Mass Spectrometry and Complementary Assays. *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 4299–4310.
62. Gonzalez-Quintela, A.; Alende, R.; Gude, F.; Campos, J.; Rey, J.; Meijide, L.M.; Fernandez-Merino, C.; Vidal, C. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *151*, 42–50.
63. Sacher, R. *Widmann's clinical interpretation of laboratory tests.*; Ed. 11. /.; F.A. Davis: Philadelphia, **2000**; ISBN 9780803602700.
64. Gianazza, E.; Miller, I.; Palazzolo, L.; Parravicini, C.; Eberini, I. With or without you - Proteomics with or without major plasma/serum proteins. *J. Proteomics* **2016**, *140*, 62–80.
65. Antal Szabó, B.V. *Bevezetés a laboratóriumi medicinába*; 2e ed.; Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft., **2015**; ISBN 978-963-331-336-7.
66. Haasenritter, J.; Stanze, D.; Widera, G.; Wilimzig, C.; Hani, M.A.; Sönnichsen, A.C.; Bösner, S.; Rochon, J.; Donner-Banzhoff, N. Does the patient with chest pain have a coronary heart disease? Diagnostic value of single symptoms and signs - A meta-analysis. *Croat. Med. J.* **2012**, *53*, 432–441.
67. Rapaport, E.; Bernard, R.; Corday, E. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation* **1979**, *59*, 607–609.
68. Hajar, R. Evolution of myocardial infarction and its biomarkers: A historical perspective. *Hear. Views* **2016**, *17*, 167.
69. Ladenson, J.H. A personal history of markers of myocyte injury [myocardial infarction]. *Clin. Chim. Acta* **2007**, *381*, 3–8.
70. Lee, T.H.; Goldman, L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction: Recommendations based on a quantitative analysis. *Ann. Intern. Med.* **1986**, *105*, 221–233.
71. Roberts, R.; Henry, P.D.; Witteveen, S.A.G.J.; Sobel, B.E. Quantification of serum creatine phosphokinase isoenzyme activity. *Am. J. Cardiol.* **1974**, *33*, 650–654.
72. Ferguson, J.L.; Beckett, G.J.; Stoddart, M.; Walker, S.W.; Fox, K.A.A. Myocardial infarction redefined: The new ACC/ESC definition, based on cardiac troponin, increases the apparent incidence of infarction. *Heart* **2002**, *88*, 343–347.
73. Danese, E.; Montagnana, M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann. Transl. Med.* **2016**, *4*, 194.
74. Szeitner, Z. Szívizom eredetű troponin I detektálása nukleázrezisztens oligomerekkel, Semmelweis University: Budapest, **2018**.
75. Katus, H.A.; Remppis, A.; Looser, S.; Hallermeier, K.; Scheffold, T.; Kübler, W. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1989**, *21*, 1349–1353.

76. Antman, E.; Bassand, J.P.; Klein, W.; Ohman, M.; Lopez Sendon, J.L.; Rydén, L.; Simoons, M.; Tendera, M.; Chaitman, B.R.; Clemmensen, P.; et al. Myocardial infarction redefined - A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2000**, *36*, 959–969.
77. Farah, C.S.; Reinach, F.C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* **1995**, *9*, 755–767.
78. Sheng, J.J.; Jin, J.P. TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure-function relationships. *Gene* **2016**, *576*, 385–394.
79. Aldous, S.J.; Florkowski, C.M.; Crozier, I.G.; Elliott, J.; George, P.; Lainchbury, J.G.; Mackay, R.J.; Than, M. Comparison of high sensitivity and contemporary troponin assays for the early detection of acute myocardial infarction in the emergency department. *Ann. Clin. Biochem.* **2011**, *48*, 241–248.
80. Babuin, L.; Jaffe, A.S. Troponin: The biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* **2005**, *173*, 1191–1202.
81. Rittoo, D.; Jones, A.; Lecky, B.; Neithercut, D. Elevation of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, in patients with neuromuscular diseases: Implications for the diagnosis of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 2411–2420.
82. Freda, B.J.; Tang, W.H.W.; Van Lente, F.; Peacock, W.F.; Francis, G.S. Cardiac troponins in renal insufficiency: review and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *40*, 2065–71.
83. Eriksson, S.; Wittfooth, S.; Pettersson, K. Present and future biochemical markers for detection of acute coronary syndrome. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2006**, *43*, 427–495.
84. Katrukha, I.A. Human cardiac troponin complex. structure and functions. *Biochem.* **2013**, *78*, 1447–1465.
85. Mair, Johannes What is new on cardiac troponin degradation? *J. Lab. Precis. Med.* **2017**, *2*.
86. Wijnker, P.J.M.; Murphy, A.M.; Stienen, G.J.M.; van der Velden, J. Troponin I phosphorylation in human myocardium in health and disease. *Netherlands Hear. J.* **2014**, *22*, 463–469.
87. Stiegler, H.; Fischer, Y.; Vazquez-Jimenez, J.F.; Graf, J.; Filzmaier, K.; Fausten, B.; Janssens, U.; Gressner, A.M.; Kunz, D. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1338–1344.
88. King, E.J.; Delory, G.E. Acid and alkaline phosphatases in their relation to malignant disease. *Postgrad. Med. J.* **1948**, *24*, 299–306.
89. LaDue, J.S.; Wróblewski, F.; Karmen, A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science (80-.)*. **1954**, *120*, 497–499.
90. Anderson, N.G. Computer interfaced fast analyzers. *Science (80-.)*. **1969**, *166*, 317–324.
91. BERSON, S.A.; YALOW, R.S.; BAUMAN, A.; ROTHSCCHILD, M.A.; NEWERLY, K. Insulin-I¹³¹ metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest.* **1956**, *35*, 170–190.
92. Nair, H.; Nokes, D.J.; Gessner, B.D.; Dherani, M.; Madhi, S.A.; Singleton, R.J.; O'Brien, K.L.; Roca, A.; Wright, P.F.; Bruce, N.; et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* **2010**, *375*, 1545–55.
93. Adigun, O.O.; Khetarpal, S. *Alpha Fetoprotein (AFP, Maternal Serum Alpha Fetoprotein, MSAFP)*; StatPearls Publishing, **2019**;
94. Bai, D.S.; Zhang, C.; Chen, P.; Jin, S.J.; Jiang, G.Q. The prognostic correlation of AFP level

- at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–9.
95. Belanger, L.; Sylvestre, C.; Dufour, D. Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta* **1973**, *48*, 15–18.
 96. Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa. *J. Immunol.* **1972**, *109*.
 97. Zhang, Y.; Zhang, R.; Yang, X.; Qi, H.; Zhang, C. Recent advances in electrogenerated chemiluminescence biosensing methods for pharmaceuticals. *J. Pharm. Anal.* **2019**, *9*, 9–19.
 98. Immunochemistry portfolio Available online: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/product-category/immunochemistry-portfolio.html?locale=global&limit=10&ps=healthcare&sortBy=relevance&listing=product&ctd=techniquesL1&ctv=Immunochemistry> (accessed on Aug 20, 2020).
 99. Ascoli, C.A.; Aggeler, B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques* **2018**, *65*, 127–136.
 100. Cotton, R.G.H.; Milstein, C. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* **1973**, *244*, 42–43.
 101. Zola, H.; Mohandas, A.P.; Krumbiegel, D. Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2013**.
 102. Kaplon, H.; Muralidharan, M.; Schneider, Z.; Reichert, J.M. Antibodies to watch in 2020. *MAbs* **2020**, *12*, 1703531.
 103. Tan, Y.H.; Liu, M.; Nolting, B.; Go, J.G.; Gervay-Hague, J.; Liu, G.Y. A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization. *ACS Nano* **2008**, *2*, 2374–2384.
 104. Le Basle, Y.; Chennell, P.; Tokhadze, N.; Astier, A.; Sautou, V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 169–190.
 105. Saeed, A.F.U.H.; Wang, R.; Ling, S.; Wang, S. Antibody engineering for pursuing a healthier future. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*.
 106. Kelley, B. Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs* **2009**, *1*, 443–452.
 107. Inmaculada Hernandez, Samuel W Bott, Anish S Patel, Collin G Wolf, Alexa R Hospodar, Shivani Sampathkumar, W.H.S. Pricing of monoclonal antibody therapies: higher if used for cancer? *Am J Manag Care.* **2018**, *24*, 109–112.
 108. Reichert, J.M.; Rosensweig, C.J.; Faden, L.B.; Dewitz, M.C. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1073–1078.
 109. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*; Ed Harlow & David Lane, Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1999**; ISBN 0-87969-543-9.
 110. Flanagan, R.J.; Jones, A.L. Fab antibody fragments: Some applications in clinical toxicology. *Drug Saf.* **2004**, *27*, 1115–1133.
 111. Larson, S.M.; Brown, J.P.; Wright, P.W. Imaging of melanoma with I-131-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* **1983**, *24*, 123–129.
 112. Barderas, R.; Benito-Peña, E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 2475–2479.
 113. Holliger, P.; Hudson, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1126–1136.
 114. Van Der Linden, R.H.J.; Frenken, L.G.J.; De Geus, B.; Harmsen, M.M.; Ruuls, R.C.; Stok, W.; De Ron, L.; Wilson, S.; Davis, P.; Verrips, C.T. Comparison of physical chemical properties of llama V(HH) antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim.*

- Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1999**, *1431*, 37–46.
115. Kaplon, H.; Reichert, J.M. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* **2019**, *11*, 219–238.
 116. Camelid Nanobodies Poised to Revolutionize Antibody Therapeutics Available online: <https://www.genengnews.com/insights/camelid-nanobodies-poised-to-revolutionize-antibody-therapeutics/> (accessed on Sep 9, **2020**).
 117. Kuhn, P.; Fühner, V.; Unkauf, T.; Moreira, G.M.S.G.; Frenzel, A.; Miethe, S.; Hust, M. Recombinant antibodies for diagnostics and therapy against pathogens and toxins generated by phage display. *Proteomics - Clin. Appl.* **2016**, *10*, 922–948.
 118. Makaraviciute, A.; Ramanaviciene, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 460–471.
 119. Zhou, H.; Zheng, M.; Chen, J.; Xie, C.; Kolatkar, A.R.; Zarubin, T.; Ye, Z.; Akella, R.; Lin, S.; Goldsmith, E.J.; et al. Determinants that control the specific interactions between TAB1 and p38alpha. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 3824–34.
 120. Ramirez, A.B.; Loch, C.M.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Wang, X.; Wayner, E.A.; Sargent, J.E.; Sibani, S.; Hainsworth, E.; Mendoza, E.A.; et al. Use of a single-chain antibody library for ovarian cancer biomarker discovery. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 1449–1460.
 121. Cummins, B.; Auckland, M.L.; Cummins, P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* **1987**, *113*, 1333–1344.
 122. Savukoski, T.; Engström, E.; Engblom, J.; Ristiniemi, N.; Wittfooth, S.; Lindahl, B.; Eggers, K.M.; Venge, P.; Pettersson, K. Troponin-Specific Autoantibody Interference in Different Cardiac Troponin I Assay Configurations. *Clin. Chem.* **2012**, *58*, 1040–1048.
 123. Jarolim, P. High sensitivity cardiac troponin assays in the clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2015**, *53*, 635–652.
 124. Arrebola, M.M.; Lillo, J.A.; Diez De Los Ríos, M.J.; Rodríguez, M.; Dayaldasani, A.; Yahyaoui, R.; Pérez, V. Analytical performance of a sensitive assay for cardiac troponin I with loci™ technology. *Clin. Biochem.* **2010**, *43*, 998–1002.
 125. Panteghini, M.; Pagani, F.; Yeo, K.T.J.; Apple, F.S.; Christenson, R.H.; Dati, F.; Mair, J.; Ravkilde, J.; Alan, H.B.W. Evaluation of Imprecision for Cardiac Troponin Assays at Low-Range Concentrations. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 327–332.
 126. Mahajan, V.S.; Jarolim, P. How to interpret elevated cardiac troponin levels. *Circulation* **2011**, *124*, 2350–2354.
 127. Apple, F.S.; Collinson, P.O. Analytical Characteristics of High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays. *Clin. Chem.* **2012**, *58*, 54–61.
 128. Bingisser, R.; Cairns, C.; Christ, M.; Hausfater, P.; Lindahl, B.; Mair, J.; Panteghini, M.; Price, C.; Venge, P. Cardiac troponin: A critical review of the case for point-of-care testing in the ED. *Am. J. Emerg. Med.* **2012**, *30*, 1639–1649.
 129. Nayak, S.; Blumenfeld, N.R.; Laksanasopin, T.; Sia, S.K. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 102–123.
 130. Available online: https://www.quidel.com/sites/default/files/ART-28501enEU_Rev-B.pdf (accessed on Sep 27, **2020**).
 131. Boeddinghaus, J.; Nestelberger, T.; Koechlin, L.; Wussler, D.; Lopez-Ayala, P.; Walter, J.E.; Troester, V.; Ratmann, P.D.; Seidel, F.; Zimmermann, T.; et al. Early Diagnosis of Myocardial Infarction With Point-of-Care High-Sensitivity Cardiac Troponin I. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *75*, 1111–1124.
 132. Storch, G.A. Diagnostic Virology. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *31*, 739–751, doi:10.1086/314015.
 133. Leland, D.S.; Ginocchio, C.C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 49–78.
 134. Vainionpää, R.; Leinikki, P. Diagnostic Techniques: Serological and Molecular Approaches.

- In *Encyclopedia of Virology*; Elsevier Ltd, **2008**; pp. 29–37 ISBN 9780123744104.
135. Hartman, M.R.; Ruiz, R.C.H.; Hamada, S.; Xu, C.; Yancey, K.G.; Yu, Y.; Han, W.; Luo, D. Point-of-care nucleic acid detection using nanotechnology. *Nanoscale* **2013**, *5*, 10141–10154.
 136. Huang, B.; Jennison, A.; Whiley, D.; McMahon, J.; Hewitson, G.; Graham, R.; De Jong, A.; Warrilow, D. Illumina sequencing of clinical samples for virus detection in a public health laboratory. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–8.
 137. O’Farrell, B. Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. In *Lateral Flow Immunoassay*; Humana Press, **2009**; pp. 1–33.
 138. Ngom, B.; Guo, Y.; Wang, X.; Bi, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1113–1135.
 139. Hassan, M.; Ansari, K.; Davood Omrani, M.-D.; Movahedi, V. *Comparative Evaluation of Immunochromatographic Rapid Diagnostic Tests (Strip and Device) and PCR Methods for Detection of Human Hepatitis B Surface Antigens*; HEPATITIS MONTHLY, **2007**; Vol. 7;.
 140. Fujimoto, T.; Okafuji, T.; Okafuji, T.; Ito, M.; Nukuzuma, S.; Chikahira, M.; Nishio, O. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5489–5492.
 141. Weitzel, T.; Reither, K.; Mockenhaupt, F.P.; Stark, K.; Ignatius, R.; Saad, E.; Seidu-Korkor, A.; Bienzle, U.; Schreier, E. Field evaluation of a rota- and adenovirus immunochromatographic assay using stool samples from children with acute diarrhea in Ghana. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2695–2697.
 142. Unkauf, T.; Miethe, S.; Fühner, V.; Schirrmann, T.; Frenzel, A.; Hust, M. Generation of recombinant antibodies against toxins and viruses by phage display for diagnostics and therapy. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC, **2016**; Vol. 917, pp. 55–76.
 143. Peng, D.P.; Hu, S.S.; Hua, Y.; Xiao, Y.C.; Li, Z.L.; Wang, X.L.; Bi, D.R. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2007**, *117*, 17–25.
 144. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–22.
 145. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **1992**, *355*, 850–852, doi:10.1038/355850a0.
 146. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510.
 147. Huppert, J.L.; Balasubramanian, S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406–413.
 148. Zeraati, M.; Langley, D.B.; Schofield, P.; Moye, A.L.; Rouet, R.; Hughes, W.E.; Bryan, T.M.; Dinger, M.E.; Christ, D. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 631–637, doi:10.1038/s41557-018-0046-3.
 149. Niu, K.; Zhang, X.; Deng, H.; Wu, F.; Ren, Y.; Xiang, H.; Zheng, S.; Liu, L.; Huang, L.; Zeng, B.; et al. BmILF and i-motif structure are involved in transcriptional regulation of BmPOUM2 in *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1710–1723.
 150. Bochman, M.L.; Paeschke, K.; Zakian, V.A. DNA secondary structures: Stability and function of G-quadruplex structures. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 770–780.
 151. Day, H.A.; Pavlou, P.; Waller, Z.A.E. I-Motif DNA: Structure, stability and targeting with

- ligands. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22*, 4407–4418, doi:10.1016/j.bmc.2014.05.047.
152. Roxo, C.; Kotkowiak, W.; Pasternak, A. G-quadruplex-forming aptamers—characteristics, applications, and perspectives. *Molecules* **2019**, *24*.
 153. Li, L.; Jiang, Y.; Cui, C.; Yang, Y.; Zhang, P.; Stewart, K.; Pan, X.; Li, X.; Yang, L.; Qiu, L.; et al. Modulating Aptamer Specificity with pH-Responsive DNA Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13335–13339.
 154. Bernat, V.; Disney, M.D. RNA Structures as Mediators of Neurological Diseases and as Drug Targets. *Neuron* **2015**, *87*, 28–46.
 155. Long, S.B.; Long, M.B.; White, R.R.; Sullenger, B.A. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA* **2008**, *14*, 2504–2512.
 156. Kinoshita, M. Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: Crucial importance of water entropy in molecular recognition. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6861–6875.
 157. Gustmann, H.; Segler, A.L.J.; Gophane, D.B.; Reuss, A.J.; Grünwald, C.; Braun, M.; Weigand, J.E.; Sigurdsson, S.T.; Wachtveitl, J. Structure guided fluorescence labeling reveals a two-step binding mechanism of neomycin to its RNA aptamer. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 15–28.
 158. Reiter, N.J.; Maher, L.J.; Butcher, S.E. DNA mimicry by a high-affinity anti-NF- κ B RNA aptamer. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1227–1236.
 159. Szeitner, Z.; András, J.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 58–65.
 160. Murphy, M.B.; Fuller, S.T.; Richardson, P.M.; Doyle, S.A. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e110.
 161. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 83–91.
 162. Jenison, R.D.; Gill, S.C.; Pardi, A.; Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (80-.)*. **1994**, *263*, 1425–1429, doi:10.1126/science.7510417.
 163. Zhuo, Z.; Yu, Y.; Wang, M.; Li, J.; Zhang, Z.; Liu, J.; Wu, X.; Lu, A.; Zhang, G.; Zhang, B. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*.
 164. Li, W.M.; Bing, T.; Wei, J.Y.; Chen, Z.Z.; Shangguan, D.H.; Fang, J. Cell-SELEX-based selection of aptamers that recognize distinct targets on metastatic colorectal cancer cells. *Biomaterials* **2014**, *35*, 6998–7007, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.112.
 165. Chen, M.; Yu, Y.; Jiang, F.; Zhou, J.; Li, Y.; Liang, C.; Dang, L.; Lu, A.; Zhang, G. Development of cell-SELEX technology and its application in cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*.
 166. Sola, M.; Menon, A.P.; Moreno, B.; Meraviglia-Crivelli, D.; Soldevilla, M.M.; Cartón-García, F.; Pastor, F. Aptamers Against Live Targets: Is In Vivo SELEX Finally Coming to the Edge? *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2020**, *21*, 192–204.
 167. Cheng, C.; Chen, Y.H.; Lennox, K.A.; Behlke, M.A.; Davidson, B.L. In vivo SELEX for identification of brain-penetrating aptamers. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2013**, *2*, e67.
 168. Mi, J.; Ray, P.; Liu, J.; Kuan, C.T.; Xu, J.; Hsu, D.; Sullenger, B.A.; White, R.R.; Clary, B.M. In Vivo Selection Against Human Colorectal Cancer Xenografts Identifies an Aptamer That Targets RNA Helicase Protein DHX9. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2016**, *5*, e315.
 169. Wang, H.; Zhang, Y.; Yang, H.; Qin, M.; Ding, X.; Liu, R.; Jiang, Y. In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2018**, *10*, 187–198.

170. Nutiu, R.; Li, Y. In vitro selection of structure-switching signaling aptamers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 1061–1065.
171. Stoltenburg, R.; Nikolaus, N.; Strehlitz, B. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J. Anal. Methods Chem.* **2012**, *2012*, 415697.
172. Zhang, Y.; Lai, B.S.; Juhas, M. Recent advances in aptamer discovery and applications. *Molecules* **2019**, *24*.
173. Boussebayle, A.; Groher, F.; Suess, B. RNA-based Capture-SELEX for the selection of small molecule-binding aptamers. *Methods* **2019**, *161*, 10–15.
174. Mendonsa, S.D.; Bowser, M.T. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5387–5392.
175. Caroli, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; Berger, B. APTANI2: Update of aptamer selection through sequence-structure analysis. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2266–2268.
176. Jing, M.; Bowser, M.T. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *686*, 9–18.
177. Gold, L.; Ayers, D.; Bertino, J.; Bock, C.; Bock, A.; Brody, E.N.; Carter, J.; Dalby, A.B.; Eaton, B.E.; Fitzwater, T.; et al. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLoS One* **2010**, *5*, e15004.
178. Dyer, K.D.; Rosenberg, H.F. The RNase a superfamily: Generation of diversity and innate host defense. *Mol. Divers.* **2006**, *10*, 585–597.
179. Voet, D.; Voet, J. *Biochemistry*; 4th ed.; J. Wiley & Sons: New York, **2011**;
180. Eder, P.S.; Devine, R.J.; Dagle, J.M.; Walder, J.A. Substrate Specificity and Kinetics of Degradation of Antisense Oligonucleotides by a 3' Exonuclease in Plasma. *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1*, 141–151.
181. Lakhin, A. V.; Tarantul, V.Z.; Gening, L. V. Aptamers: Problems, solutions and prospects. *Acta Naturae* **2013**, *5*, 34–43.
182. Ni, S.; Yao, H.; Wang, L.; Lu, J.; Jiang, F.; Lu, A.; Zhang, G. Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1683.
183. Elskens, J.P.; Elskens, J.M.; Madder, A. Chemical modification of aptamers for increased binding affinity in diagnostic applications: Current status and future prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–31.
184. Eaton, B.E.; Gold, L.; Hicke, B.J.; Janjić, N.; Jucker, F.M.; Sebesta, D.P.; Tarasow, T.M.; Willis, M.C.; Zichi, D.A. Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers. In Proceedings of the Bioorganic and Medicinal Chemistry; Bioorg Med Chem, **1997**; Vol. 5, pp. 1087–1096.
185. Ng, E.W.M.; Shima, D.T.; Calias, P.; Cunningham, E.T.; Guyer, D.R.; Adamis, A.P. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 123–132.
186. Kuwahara, M.; Nagashima, J.I.; Hasegawa, M.; Tamura, T.; Kitagata, R.; Hanawa, K.; Hososhima, S.I.; Kasamatsu, T.; Ozaki, H.; Sawai, H. Systematic characterization of 2'-deoxynucleoside- 5'-triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5383–5394.
187. Saccà, B.; Lacroix, L.; Mergny, J.L. The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1182–1192.
188. Padilla, R.; Sousa, R. Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with non-canonical ribose 2'-groups using a mutant T7 RNA polymerase (RNAP). *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1561–1563.

189. Karlsen, K.K.; Wengel, J. Locked nucleic acid and aptamers. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 366–370.
190. Klußmann, S.; Nolte, A.; Bald, R.; Erdmann, V.A.; Fürste, J.P. Mirror-image RNA that binds D-Adenosine. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1112–1115.
191. Williams, K.P.; Liu, X.H.; Schumacher, T.N.M.; Lin, H.Y.; Ausiello, D.A.; Kim, P.S.; Bartel, D.P. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11285–11290.
192. Eulberg, D.; Klussmann, S. Spiegelmers: Biostable aptamers. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 979–983.
193. Olea, C.; Weidmann, J.; Dawson, P.E.; Joyce, G.F. An L-RNA Aptamer that Binds and Inhibits RNase. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1437–1441.
194. Ruigrok, V.J.B.; Levisson, M.; Hekelaar, J.; Smidt, H.; Dijkstra, B.W.; van der Oost, J. Characterization of aptamer-protein complexes by x-ray crystallography and alternative approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 10537–10552.
195. Purschke, W.G.; Radtke, F.; Kleinjung, F.; Klussmann, S. A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B.
196. Vater, A.; Klussmann, S. Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: The evolution of Spiegelmer® therapeutics. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 147–155.
197. Hocek, M. Synthesis of base-modified 2'-deoxyribonucleoside triphosphates and their use in enzymatic synthesis of modified DNA for applications in bioanalysis and chemical biology. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9914–9921.
198. Ramaraj, T.; Angel, T.; Dratz, E.A.; Jesaitis, A.J.; Mumei, B. Antigen-antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2012**, *1824*, 520–532.
199. Gelinas, A.D.; Davies, D.R.; Janjic, N. Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *36*, 122–132, doi:10.1016/J.SBI.2016.01.009.
200. Ochsner, U.A.; Green, L.S.; Gold, L.; Janjic, N. Systematic selection of modified aptamer pairs for diagnostic sandwich assays. *Biotechniques* **2014**, *56*, 125–133.
201. HOME - SomaLogic Available online: <https://somalogic.com/> (accessed on Dec 8, **2020**).
202. Sun, B.B.; Maranville, J.C.; Peters, J.E.; Stacey, D.; Staley, J.R.; Blackshaw, J.; Burgess, S.; Jiang, T.; Paige, E.; Surendran, P.; et al. Genomic atlas of the human plasma proteome. *Nature* **2018**, *558*, 73–79.
203. Dorraj, G.S.; Rassaei, M.J.; Latifi, A.M.; Pishgoo, B.; Tavallaei, M. Selection of DNA aptamers against Human Cardiac Troponin I for colorimetric sensor based dot blot application. *J. Biotechnol.* **2015**, *208*, 80–86.
204. Jo, H.; Gu, H.; Jeon, W.; Youn, H.; Her, J.; Kim, S.K.; Lee, J.; Shin, J.H.; Ban, C. Electrochemical Aptasensor of Cardiac Troponin i for the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9869–9875.
205. Torrini, F.; Palladino, P.; Brittolli, A.; Baldoneschi, V.; Minunni, M.; Scarano, S. Characterization of troponin T binding aptamers for an innovative enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA). *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 7709–7716.
206. Surya, S.G.; Majhi, S.M.; Lahcen, A.A.; Yuvaraja, S.; Chappanda, K.N.; Salama, K.N.; Agarwal, D.K.; Chappanda, K.N. A label-free aptasensor FET based on Au nanoparticle decorated Co₃O₄ nanorods and a SWCNT layer for detection of cardiac troponin T protein. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *8*, 18–26.
207. Negahdary, M.; Behjati-Ardakani, M.; Heli, H. An electrochemical troponin T aptasensor based on the use of a macroporous gold nanostructure. *Microchim. Acta* **2019**, *186*.

208. Ara, M.N.; Hyodo, M.; Ohga, N.; Akiyama, K.; Hida, K.; Hida, Y.; Shinohara, N.; Harashima, H. Identification and expression of troponin T, a new marker on the surface of cultured tumor endothelial cells by aptamer ligand. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 825–834.
209. Wandtke, T.; Woźniak, J.; Kopiński, P. Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses* **2015**, *7*, 751–780.
210. Leija-Montoya, A.G.; Benítez-Hess, M.L.; Alvarez-Salas, L.M. Application of Nucleic Acid Aptamers to Viral Detection and Inhibition. In *Nucleic Acids - From Basic Aspects to Laboratory Tools*; InTech, **2016**.
211. Gopinath, S.C.B.; Misono, T.S.; Kawasaki, K.; Mizuno, T.; Imai, M.; Odagiri, T.; Kumar, P.K.R. An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 479–487.
212. Chen, F.; Hu, Y.; Li, D.; Chen, H.; Zhang, X.-L. CS-SELEX Generates High-Affinity ssDNA Aptamers as Molecular Probes for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *PLoS One* **2009**, *4*, e8142.
213. Zhang, Y.; Yu, Z.; Jiang, F.; Fu, P.; Shen, J.; Wu, W.; Li, J. Two DNA aptamers against avian influenza H9N2 virus prevent viral infection in cells. *PLoS One* **2015**, *10*.
214. Park, J.W.; Tatavarty, R.; Kim, D.W.; Jung, H.T.; Gu, M.B. Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2071–2073.
215. Park, J.W.; Jin Lee, S.; Choi, E.J.; Kim, J.; Song, J.Y.; Bock Gu, M. An ultra-sensitive detection of a whole virus using dual aptamers developed by immobilization-free screening. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 324–329.
216. Kim, S.H.; Lee, J.; Lee, B.H.; Song, C.S.; Gu, M.B. Specific detection of avian influenza H5N2 whole virus particles on lateral flow strips using a pair of sandwich-type aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *134*, 123–129.
217. van den Kieboom, C.H.; van der Beek, S.L.; Mészáros, T.; Gyurcsányi, R.E.; Ferwerda, G.; de Jonge, M.I. Aptasensors for viral diagnostics. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2015**, *74*, 58–67.
218. Liu, J.; Qin, Q.; Zhang, X.; Li, C.; Yu, Y.; Huang, X.; Mukama, O.; Zeng, L.; Wang, S. Development of a Novel Lateral Flow Biosensor Combined With Aptamer-Based Isolation: Application for Rapid Detection of Grouper Nervous Necrosis Virus. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 886.
219. Narayan, C.; Kwon, J.; Kim, C.; Kim, S.J.; Jang, S.K. Virus-based SELEX (viro-SELEX) allows development of aptamers targeting knotty proteins. *Analyst* **2020**, *145*, 1473–1482, doi:10.1039/c9an01943j.
220. Harashima, H.; Schnittger, A. Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria. *Plant Methods* **2012**, *8*, 23.
221. Weingartner, M.; Criqui, M.-C.; Mészáros, T.; Binarova, P.; Schmit, A.-C.; Helfer, A.; Derevier, A.; Erhardt, M.; Bögre, L.; Genschik, P. Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* **2004**, *16*, 643–657.
222. Van Leene, J.; Hollunder, J.; Eeckhout, D.; Persiau, G.; Van De Slijke, E.; Stals, H.; Van Isterdael, G.; Verkest, A.; Neiryck, S.; Buffel, Y.; et al. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*.
223. Weimer, A.K.; Biedermann, S.; Harashima, H.; Roodbarkelari, F.; Takahashi, N.; Foreman, J.; Guan, Y.; Pochon, G.; Heese, M.; Van Damme, D.; et al. The plant-specific CDKB 1-CYCB 1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **2016**, *35*, 2068–2086.
224. Bardóczy, V.; Géczi, V.; Sawasaki, T.; Endo, Y.; Mészáros, T. A set of ligation-independent

- in vitro translation vectors for eukaryotic protein production. *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*.
225. Sonkoly, B.; Bardóczy, V.; Mészáros, T. Expression and purification of active protein kinases from wheat germ extracts. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *779*, 55–63.
226. Németh, C.E.; Marcolongo, P.; Gamberucci, A.; Fulceri, R.; Benedetti, A.; Zoppi, N.; Ritelli, M.; Chiarelli, N.; Colombi, M.; Willaert, A.; et al. Glucose transporter type 10-lacking in arterial tortuosity syndrome-facilitates dehydroascorbic acid transport. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 1630–1640.
227. Kállai, B.M.; Kourová, H.; Chumová, J.; Papdi, C.; Trögelová, L.; Kofroňová, O.; Hozák, P.; Filimonenko, V.; Mészáros, T.; Magyar, Z.; et al. γ -Tubulin interacts with E2FA, E2FB and E2FC transcription factors, regulates proliferation and endocycle in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **2019**.
228. Ditengou, F.A.; Gomes, D.; Nziengui, H.; Kochersperger, P.; Lasok, H.; Medeiros, V.; Paponov, I.A.; Nagy, S.K.; Náday, T.V.; Mészáros, T.; et al. Characterization of auxin transporter PIN6 plasma membrane targeting reveals a function for PIN6 in plant bolting. *New Phytol.* **2018**, *217*.
229. Dory, M.; Hatzimasoura, E.; Kállai, B.M.; Nagy, S.K.; Jäger, K.; Darula, Z.; Náday, T.V.; Mészáros, T.; López-Juez, E.; Barnabás, B.; et al. Coevolving MAPK and PID phosphosites indicate an ancient environmental control of PIN auxin transporters in land plants. *FEBS Lett.* **2018**, *592*.
230. Horvath, B.M.; Kourova, H.; Nagy, S.; Nemeth, E.; Magyar, Z.; Papdi, C.; Ahmad, Z.; Sanchez-Perez, G.F.; Perilli, S.; Blilou, I.; et al. Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1261–1278.
231. Szeitner, Z.; Doleschall, A.; Varga, M.; Keltai, K.; Révész, K.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. Spiegelmers as potential receptors for cTnI diagnostics. *Anal. Methods* **2017**, *9*.
232. Dory, M.; Doleschall, Z.; Nagy, S.K.; Ambrus, H.; Mészáros, T.; Barnabás, B.; Dóczy, R. Kinase-Associated Phosphoisoform Assay: A novel candidate-based method to detect specific kinase-substrate phosphorylation interactions in vivo. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16*.
233. Kohoutová, L.; Kourová, H.; Nagy, S.K.; Volc, J.; Halada, P.; Mészáros, T.; Meskiene, I.; Bögre, L.; Binarová, P. The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with γ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol.* **2015**, *207*.
234. Nagy, S.K.; Darula, Z.; Kállai, B.M.; Bögre, L.; Bánhegyi, G.; Medzihradzky, K.F.; Horváth, G.V.; Mészáros, T. Activation of AtMPK9 through autophosphorylation that makes it independent of the canonical MAPK cascades. *Biochem. J.* **2015**, *467*.
235. Szekanecz, Z. 10th Central European Congress of Rheumatology CECR 2014. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2014**, *126*, 199–234.
236. Nagy, S.K.; Kállai, B.M.; András, J.; Mészáros, T. A novel family of expression vectors with multiple affinity tags for wheat germ cell-free protein expression. *BMC Biotechnol.* **2020**, *20*, 17.
237. Einhauer, A.; Jungbauer, A. The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 455–465.
238. Los, G. V.; Encell, L.P.; McDougall, M.G.; Hartzell, D.D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M.G.; Learish, R.; Ohana, R.F.; Uhr, M.; et al. HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382.
239. Ullman, E.F.; Kirakossian, H.; Singh, S.; Wu, Z.P.; Irvin, B.R.; Pease, J.S.; Switchenko, A.C.; Irvine, J.D.; Dafforn, A.; Skold, C.N.; et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: Measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

- S. A. **1994**, *91*, 5426–5430.
240. AlphaLISA/AlphaScreen/AlphaPlex Reagents | PerkinElmer Available online: <https://www.perkinelmer.com/category/alpha-reagents> (accessed on Dec 12, **2020**).
241. Lautner, G.; Balogh, Z.; Gyurkovics, A.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. Homogeneous assay for evaluation of aptamer-protein interaction. *Analyst* **2012**, *137*.
242. Dausse, E.; Taouji, S.; Evadé, L.; Di Primo, C.; Chevet, E.; Toulmé, J.J. HAPIScreen, a method for high-throughput aptamer identification. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*.
243. SantaLucia, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 1460–1465.
244. Pierce, K.E.; Sanchez, J.A.; Rice, J.E.; Wangh, L.J. Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: primer design criteria for high yields of specific single-stranded DNA and improved real-time detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 8609–14.
245. Tolnai, Z.; Harkai, Á.; Szeitner, Z.; Scholz, É.N.; Percze, K.; Gyurkovics, A.; Mészáros, T. A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1047*.
246. Kanagawa, T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 317–323.
247. Hu, L.; Lin, Q.; Xie, P.; Zeng, L.; Liu, L.; Huang, M.; Yan, Q.; Zhang, M.; Lin, G. Accurate CNV identification from only a few cells with low GC bias in a single-molecule sequencing platform. *bioRxiv* 2020, 2020.01.21.908897.
248. Percze, K.; Mészáros, T. Analysis of Modified Nucleotide Aptamer Library Generated by Thermophilic DNA Polymerases. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 2939–2944.
249. Ereemeeva, E.; Herdewijn, P. PCR Amplification of Base-Modified DNA. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2018**, *10*, 18–48.
250. Kuwahara, M.; Takahata, Y.; Shoji, A.; Ozaki, A.N.; Ozaki, H.; Sawai, H. Substrate properties of C5-substituted pyrimidine 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates for thermostable DNA polymerases during PCR. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3735–3738.
251. Witt, M.; Phung, N.L.; Stalke, A.; Walter, J.-G.; Stahl, F.; von Neuhoff, N.; Scheper, T. Comparing two conventional methods of emulsion PCR and optimizing of Tegosoftware-based emulsion PCR. *Eng. Life Sci.* **2017**, *17*, 953–958.
252. Ereemeeva, E.; Herdewijn, P. PCR Amplification of Base-Modified DNA. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2018**, *10*, 18–48.
253. Huang, H. Fidelity and predominant mutations produced by deep vent wild-type and exonuclease-deficient DNA polymerases during in vitro DNA amplification. *DNA Cell Biol.* **1996**, *15*, 589–594.
254. Van Der Merwe, K.J.; Steyn, P.S.; Fourie, L.; Scott, D.B.; Theron, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. [20]. *Nature* **1965**, *205*, 1112–1113.
255. Pfohl-Leskowicz, A.; Manderville, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 61–99.
256. Visconti, A.; De Girolamo, A. Fitness for purpose – Ochratoxin A analytical developments. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 37–44.
257. McKeague, M.; Velu, R.; Hill, K.; Bardóczy, V.; Mészáros, T.; DeRosa, M.C. Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. **2014**, *6*.
258. Kikin, O.; D'Antonio, L.; Bagga, P.S. QGRS Mapper: A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W676–W682.
259. Mergny, J.-L.; Phan, A.-T.; Lacroix, L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74–78.

260. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415.
261. Huizenga, D.E.; Szostak, J.W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665.
262. Kong, L.; Xu, J.; Xu, Y.; Xiang, Y.; Yuan, R.; Chai, Y. A universal and label-free aptasensor for fluorescent detection of ATP and thrombin based on SYBR Green I dye. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 193–197.
263. Cruz-Aguado, J.A.; Penner, G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10456–10461.
264. Barthelmebs, L.; Jonca, J.; Hayat, A.; Prieto-Simon, B.; Marty, J.L. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* **2011**, *22*, 737–743.
265. McKeague, M.; Velu, R.; De Girolamo, A.; Valenzano, S.; Pascale, M.; Smith, M.; DeRosa, M. Comparison of In-Solution Biorecognition Properties of Aptamers against Ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. **2016**, *8*, 336.
266. Costantini, F.; Sberna, C.; Petrucci, G.; Reverberi, M.; Domenici, F.; Fanelli, C.; Manetti, C.; De Cesare, G.; Derosa, M.; Nascetti, A.; et al. Aptamer-based sandwich assay for on chip detection of Ochratoxin A by an array of amorphous silicon photosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *230*, 31–39.
267. Velu, R.; De Rosa, M.C. Lateral flow assays for Ochratoxin A using metal nanoparticles: Comparison of “adsorption-desorption” approach to linkage inversion assembled nano-aptasensors (LIANA). *Analyst* **2018**, *143*, 4566–4574.
268. Wang, Q.; Yang, Q.; Wu, W. Graphene-Based Steganographic Aptasensor for Information Computing and Monitoring Toxins of Biofilm in Food. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3139.
269. Martelli, G.P.; Jelkmann, W. Foveavirus, a new plant virus genus. *Arch. Virol.* **1998**, *143*, 1245–1249.
270. Yoshikawa, N.; Matsuda, H.; Oda, Y.; Isogai, M.; Takahashi, T.; Ito, T.; Yoshida, K. Genome heterogeneity of apple stem pitting virus in apple trees. In Proceedings of the Acta Horticulturae; International Society for Horticultural Science, **2001**; Vol. 550, pp. 285–290.
271. Komorowska, B.; Hasiów-Jaroszewska, B.; Minicka, J. Application of nucleic acid aptamers for detection of Apple stem pitting virus isolates. *Mol. Cell. Probes* **2017**, *36*, 62–65.
272. Gugerli, P.; Ramel, M.E. Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of apple stem pitting and pear yellow vein viruses in apple and pear. In Proceedings of the Acta Horticulturae; International Society for Horticultural Science, **2004**; Vol. 657, pp. 59–69.
273. Lautner, G.; Balogh, Z.; Gyurkovics, A.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. Homogeneous assay for evaluation of aptamer-protein interaction. *Analyst* **2012**, *137*, 3929–3931.
274. Drolet, D.W.; Moon-McDermott, L.; Romig, T.S. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1021–1025, doi:10.1038/nbt0896-1021.
275. Bi, W.; Bai, X.; Gao, F.; Lu, C.; Wang, Y.; Zhai, G.; Tian, S.; Fan, E.; Zhang, Y.; Zhang, K. A DNA-templated Aptamer Probe for Identification of Target Proteins. *Anal. Chem.* **2017**.
276. Lautner, G.; Balogh, Z.; Bardóczy, V.; Mészáros, T.; Gyurcsányi, R.E. Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging. *Analyst* **2010**, *135*, 918–926.
277. Hall, C.B. Respiratory Syncytial Virus. In *Principles and Practice of Clinical Virology*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK; pp. 323–341.
278. Liljeroos, L.; Krzyzaniak, M.A.; Helenius, A.; Butcher, S.J. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**,

- 110, 11133–11138.
279. Henderson, F.W.; Collier, A.M.; Clyde, W.A.; Denny, F.W. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N. Engl. J. Med.* **1979**, *300*, 530–4.
280. Englund, J.A.; Piedra, P.A.; Jewell, A.; Patel, K.; Baxter, B.B.; Whimbey, E. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* **1996**, *34*, 1649–1653.
281. Falsey, A.R.; Walsh, E.E. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Drugs Aging* **2005**, *22*, 577–87.
282. Griffiths, C.; Drews, S.J.; Marchant, D.J. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 277–319.
283. Bagdonaite, I.; Wandall, H.H. Global aspects of viral glycosylation. *Glycobiology* **2018**, *28*, 443–467.
284. Percze, K.; Szakács, Z.; Scholz, É.; András, J.; Szeitner, Z.; Kieboom, C.H.V.D.; Ferwerda, G.; Jonge, M.I.D.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. Aptamers for respiratory syncytial virus detection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.
285. Zhou, L.; Xiao, Q.; Zhao, Y.; Huang, A.; Ren, L.; Liu, E. The impact of viral dynamics on the clinical severity of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Med. Virol.* **2015**, *87*, 1276–1284.
286. Szakács, Z.; Mészáros, T.; De Jonge, M.I.; Gyurcsányi, R.E. Selective counting and sizing of single virus particles using fluorescent aptamer-based nanoparticle tracking analysis. *Nanoscale* **2018**, *10*, 13942–13948.
287. Eriksson, S.; Junikka, M.; Laitinen, P.; Majamaa-Voltti, K.; Alfthan, H.; Pettersson, K. Negative Interference in Cardiac Troponin I Immunoassays from a Frequently Occurring Serum and Plasma Component. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1095–1104.
288. Szeitner, Z.; Lautner, G.; Nagy, S.K.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. A rational approach for generating cardiac troponin I selective Spiegelmers. *Chem. Commun. (Camb)*. **2014**, *50*, 6801–4.
289. Hortin, G.L.; Sviridov, D. The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. *J. Proteomics* **2010**, *73*, 629–636.
290. Lowenthal, M.S.; Gasca-Aragon, H.; Schiel, J.E.; Dodder, N.G.; Bunk, D.M. A quantitative LC-MS/MS method for comparative analysis of capture-antibody affinity toward protein antigens. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 2726–2732.
291. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - 8th Edition Available online: <https://www.elsevier.com/books/tietz-fundamentals-of-clinical-chemistry-and-molecular-diagnostics/rifai/978-0-323-53044-6> (accessed on Aug 20, **2020**).
292. Gaze, D.C.; Collinson, P.O. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T adheres to polysulfone dialyser membranes in an in vitro haemodialysis model: Explanation for lower serum cTnI concentrations following dialysis. *Open Hear.* **2014**, *1*.
293. Tolnai, Z.J.; András, J.; Szeitner, Z.; Percze, K.; Simon, L.F.; Gyurcsányi, R.E.; Mészáros, T. Spiegelmer-Based Sandwich Assay for Cardiac Troponin I Detection. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4963.
294. Li, P.; Chen, Z.; Liu, B.; Li, K.; Wang, H.; Lin, L.; He, L.; Wei, J.; Liu, T. Establishment of a novel homogeneous nanoparticle-based assay for sensitive procalcitonin detection of ultra low-volume serum samples. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 5395–5404.

9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

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

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, Dóczi 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 Phosphoisoform 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.

10. Függelék

1. A dolgozatban tárgyalt aptamer és spiegelmerek szekvenciái

| | | | |
|-----|---------------------------------|--------------------|---------------------|
| B5 | AAGCCCCGTACCAAAGAAGGTCAGGTGTCT | | |
| F6 | AAGCCCCGTACCAAAGAAGGTCAGGTGTCT | | |
| D10 | TAAGAGGCAGACAGTAAGAACAACCTACCTT | | |
| D12 | TAAGAGGCAGACAGTAAGAACAACCTACCTT | | |
| H8 | AGTGCGGTGAG | CCGTCCGAC | ATACAAATAC |
| E6 | AC | CCGTCCGAC | TCGGCCATAAATTAAGGC |
| E11 | TCATTAGGTGA | GTGTCCGTTCT | ACACTATA |
| E10 | | GTGTCCGTTCT | TATTGGCGGCTCCCAATGT |
| B10 | TCCATATCG | TTAGCGTACGG | TGGCAGTCT |
| F10 | A | TTAGCGTACTG | CCAACCATCAGGCGCCA |
| H5 | TCGCCGTCCTGATCAGTAGCAGCCAGAACG | | |

1. **táblázat.** Részletesen tanulmányozott RSV szelektív aptamerek nukleinsav-szekvenciája. A megegyező motívumok vastag betűvel kiemelve.

| Kód | Szekvencia | Kópia szám |
|-----|---|------------|
| A4 | AGTGCAGGCTGAGTGGGTGGGTGGGTGGTGTGGCCACGTT | 32 |
| E6 | GACAAGACTACCTCGCTAGTACTACTATTCTATTCCGAT | 2 |
| C5 | GAGGTGAGTGTGTGTGGGTGGGTGGTGGTAAATGATCGT | 2 |
| G3 | GATGCAGGTCGATATGTATATCGTACTTATCTGTTACGTT | 2 |
| C11 | GGTGCAGGGTTGGTGGGTGGGGGGTGGTGTGGCCACGTT | 2 |
| E10 | AAACATACCGTAACGTATTAATTTCACTGACAATTCTTCC | 1 |
| H9 | AACCAACATGCATCCCGACAATCATTATTCACCATTTCATC | 1 |
| F10 | AACCCATGAGTGCATGATTGTGTCTAACCTTAGTACGAAT | 1 |
| D2 | ACCGTGTGCAACCTCCCTCATGTATCCTACTCACCATCC | 1 |
| E11 | ACGGCGCCACACCACCCAGGGTGGGTGGTGTGGCCACGTT | 1 |
| B9 | AGCGAGTGGAGGTGGGTGGGTGGTGGTGTATGGAGTGA | |
| E7 | AGGGAGAGTTAGTACCACATCTGGTGTATTGTGTTGCATC | |
| C10 | AGGTGAAGTGCGGCAATACGCGTATGATATATCTTCTCGT | |
| A9 | AGTGCAGCATAACATATCTCAACTACATTTCTCACTCCGCA | |
| G12 | AGTGTAGTAGGTAATATGAGTGTGCCATGGAGGGGAGGT | |
| B6 | AGTTGATGCTGGTCATTACATGCCACCATACCATGAGGTA | |
| C6 | ATCGTACGGAGGGTGGGTGGGTGGTGTATGAGTGGAGGTC | |
| B2 | ATCTGCAATGACTATTGCATCATTTATCCCCTTTACCTC | |
| E4 | ATGATGCAGTAAAGTGTACTGGGGCATGTGTGTGGCGGTT | |
| C7 | ATGCGTGGTGATACATATTCTTTTCGTGTTTACATTGTAT | |
| D7 | ATGCTGCGGTATGAGTAGTGCATACTATACGTTTCTCGTT | |
| F7 | GACGAGGAATGATGTGTACCGTATGGAGTGGAACTGCATT | |

| | | |
|-----|---|--|
| A6 | GATGAATCGACCCCTACCCATTACATCATCGTTGACAGCT | |
| H4 | GATGACAATGGTGTCATGATGTACATAATGTAGTTCTCGT | |
| C2 | GATGATATGTTGCGCTTTATTGTCTCTAACTAATGGTGAC | |
| B10 | GATGCACTTGACGTATGTCTCACTTTCTTTTCATTGACAT | |
| F12 | GATGCCGGAGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGTGAGGAGACAGG | |
| H2 | GATGCGTACATGAATTCTATCACATCATTGTATATTCGTT | |
| D1 | GATGTAATGCGTGTTCTCTGCTGAAGGTGCAACCTAGCT | |
| E9 | GATGTACACTCACCGAAGAACTACCTTGCCGTATGCTATT | |
| D5 | GATGTAGGTGTTGTACCCATATGCTTGTGTTTCGTTTCGTT | |
| E3 | GATGTGGTAAATGAATGTGTTTCGGAGCTGAGGTGCAGGT | |
| H11 | GATGTGAAGGATTATCTAACCTTACATGTATCATTTCGTT | |
| B12 | GCATCCACGATCAAACGTTGATACACTTTCTCTCATCACT | |
| H1 | GGTGATGGCAAGTGTAGTTTATACGTTAGTAACGTGATGT | |
| F6 | GGTGCAGGATTACATTAATGGATTACAGTTGATTTTCGTA | |
| A5 | GGTGGAAGCACACGTACACCCTAGATACAGGACGACCGTT | |
| C1 | GGTGGTGGTGGTACGGTGCTAATGAGGGAAGGAGGGGGAT | |
| G4 | GGTGTGGTGGGTGGGAGGTGAGGTTGGGACAGTGGGGGT | |
| D4 | GTGATCATATCGTGCACTATCACAGGTATGTTGCGGCGAT | |
| D12 | GTTGTGGTAGAGCTAGGGGTTGGACGGAACATATTAGTGT | |
| G1 | TATGTAGGCCATGCACTACCACCTTATTTACCGTGTAAC | |
| F8 | TGCCCACGCTTTAACGTAGCATACTGTATCACATTTCCCT | |
| C9 | TGTGCATGTTAGTCCGGTGTAGATAGTTGGGTGTTGGGTT | |
| A2r | AGTGGGTGGGTGGGTGGTCCGGTAGGGAGAGC | |
| E1r | ACACACCCGACAGATATCGTAATTACGAATTTACACC | |
| C4r | GACACGTCGCGTTAGTAACATTGGTATACATGACCGT | |

2. táblázat. A cTnI N-terminális epitópjára szelektált spiegelmerok nukleinsav-szekvenciája. A karakterizált spiegelmerok kiemelve.

| | |
|----------|---|
| A6 | 5'-CAG TGA GTG ATG GTG AGG GCT TAG TTC GCC GCT CAT GCC GAA TCT CCT GTA TAA ATA CCC ACA CTG TCC ATA CAC G-3' |
| C6 | 5'-CAG TGA GTG ATG GTG AGG GTG AAT CGG TGT CGA CTA TTA AAT TAA GTT GTG GTT GTT CCC ACA CTG TCC ATA CAC G-3' |
| C6 short | 5'-TG AAT CGG TGT CGA CTA TTA AAT TAA GTT GTG GTT GTT-3' |

3. táblázat. A szendvics vizsgálatokban használt cTnI C-terminálisára szelektív spiegelmerok nukleinsav-szekvenciája.

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 együttgondolkodásban, 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 köszönhetem, 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 amellet, hogy tapasztalt kutatóként megismertetett a molekuláris biológiai módszerekkel, közeli baráttá vált, munkakapcsolatunk és barátságunk azóta is töretlen.

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

Hazaköltözésemmel Salgó András alkalmazásommal 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* translációval kapcsolatos apró trükköket. A nála tett látogatásom adott lendületet az *in vitro* translációval kapcsolatos kutatásainknak.

A BME-n 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 aptamerkutatásunk, 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 elvülhetetlen 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 Baláznak, 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.

