

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3253.

HARKAI ÁKOS

Patobiokémia

című program

Programvezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Mészáros Tamás, egyetemi tanár

Bakteriális biofilmképződést gátló aptamerek előállítása és vizsgálata

Doktori értekezés

Harkai Ákos

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros Tamás, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hegyesi Hargita, PhD., egyetemi docens
Dr. Sveiczler Ákos, PhD., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Monostory Katalin, DSc., tudományos főmunkatárs
Dr. Törőcsik Beáta, PhD., egyetemi docens

Budapest
2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
1.1. Aptamerek	8
1.1.1. Aptamerek felfedezése	8
1.1.2. Aptamerek szelekciója, SELEX-ek típusai	9
1.1.3. Aptamerek molekuláris szerkezete	14
1.1.4. Aptamerek in silico vizsgálata	17
1.1.5. Aptamerek in vitro vizsgálata	18
1.1.6. Aptamerek felhasználási területei és alkalmazása	19
1.2. Biofilmek	23
1.2.1. Biofilmek kialakulása, felépítése és jelentősége	23
1.2.2. <i>Streptococcus mutans</i> és virulencia faktorai	27
1.2.3. A glükánköötő fehérjecsald	29
1.2.4. Biofilmképződést gátló törekvések	31
2. Célkitűzések	33
3. Módszerek	34
3.1. Felhasznált anyagok	34
3.1.1. Oldatok, pufferek, vegyszerek	34
3.1.2. Affinitás kromatográfiás gyöngyök és puffereik	36
3.1.3. Oligonukleotidok	36
3.1.4. Molekulaméret markerek	37
3.1.5. Táploldatok, táptalajok	37
3.1.6. Bakteriális sejtek	38
3.1.7. Enzimek és reagenskészletek	38

3.2.	GbpC és AgI/II rekombináns fehérjék előállítása.....	39
3.2.1.	Molekuláris klónozás.....	39
3.2.2.	Plazmid konstrukciók ellenőrzése	41
3.2.3.	Fehérjetermelés.....	42
3.2.4.	Fehérjeizolálás	43
3.2.5.	Fehérjedetektálás	44
3.3.	GbpC funkcionális vizsgálata.....	45
3.3.1.	Fehérje termostabilitása.....	45
3.3.2.	GbpC-dextrán kölcsönhatása.....	46
3.3.2.1.	ALPHAScreen	46
3.3.2.2.	BLI.....	47
3.3.2.3.	MST	47
3.4.	GbpC-specifikus aptamerek szelekciója.....	48
3.4.1.	SELEX folyamata.....	48
3.4.2.	Aptamerjelöltek szűrése	52
3.4.2.1.	In silico elemzés	52
3.4.2.2.	Egyszálú DNS molekulák előállítása PBA-PCR-rel	53
3.4.2.3.	Kötődés és specifikusság vizsgálat ALPHAScreen-nel.....	54
3.4.3.	Aptamerek karakterizálása	55
3.4.3.1.	Kinetikai mérések BLI-vel	55
3.4.3.2.	Affinitásmérések MST-vel.....	55
3.4.3.3.	Stabilitásvizsgálat qPCR-rel	56
3.5.	Aptamerek funkcionális vizsgálata.....	57
3.6.	GbpC-aptamer komplexek térszerkezetének predikciója.....	58
4.	Eredmények.....	59
4.1.	Létrehozott vektorkonstrukciók ellenőrzése.....	59

4.2.	GbpC és AgI/II fehérjék előállítás és izolálása.....	61
4.3.	A GbpC funkcionális vizsgálata	63
4.3.1.	Termostabilitás Ca^{2+} jelenlétében	63
4.3.2.	Dextránkötő képesség.....	64
4.4.	GbpC specifikus aptamerjelöltek szelekciója.....	67
4.5.	Aptamerjelöltek szűrése PBA-PCR-rel kombinált ALPHA-val.....	70
4.6.	Aptamerek karakterizálása	73
4.6.1.	Kinetikai vizsgálatok	73
4.6.2.	Primerrégiók hatása és kompetíciós vizsgálatok.....	75
4.6.3.	A39-es aptamer stabilitása.....	78
4.7.	Aptamerek biofilmgátló hatásának vizsgálata.....	79
4.8.	GbpC-aptamer prediktált modellek értékelése	83
5.	Megbeszélés.....	86
5.1.	A megfelelő szelekciós célmolekula alkalmazásának jelentősége	86
5.2.	A GbpC-specifikus aptamerek szelekciója és karakterizálása.....	88
5.3.	A szelektált aptamerek funkcionális vizsgálata	90
6.	Következtetések.....	93
7.	Összefoglalás	94
8.	Summary.....	95
9.	Irodalomjegyzék	96
10.	Saját publikációk jegyzéke	121
11.	Köszönetnyilvánítás	122
12.	Függelék	123

Rövidítések jegyzéke

6xHis	hat hisztidinből álló hexapeptid jelölés
AI	autoinduktor (AutoInducer)
AgI/II	Antigen I/II
ALPHA	jelerősített homogén távolság modulált lumineszcens vizsgálat (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)
APS	ammónium-perszulfát
ASB	mesterséges nyálpuffer (Artificial Saliva Buffer)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BFM	biofilmképző tápoldat (Biofilm Forming Medium)
BHI	agy-szív kivonat (Brain Heart Infusion)
BLI	bioréteg interferometria (BioLayer Interferometry)
bp	bázispár
BSA	szarvasmarha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
cps	másodperc alatt detektált jel (counts per second)
dNTP	dezinukleotid-trifoszfát
DNS	dezoiribonukleinsav (DNA)
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid)
EMA	Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)
EPS	extracelluláris polimer alkotók (Extracellular Polymeric Substances)
FDA	Egyesült Államok Élelmiszer-, és Gyógyszerügyi Hivatala (Food and Drug Administration)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
GbpC	glükánköti fehérje C (Glucan-binding protein C)
Δ GbpC	glükánköti fehérje C hiányos (deficient Glucan-binding protein C)
k_a	asszociációs sebességi állandó
k_d	disszociációs sebességi állandó

K _D	disszociációs egyensúlyi állandó
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani tápoldat
MDR	multidrog-rezisztencia
MST	mikroskálás termoforézis (MicroScale Thermophoresis)
nt	nukleotid
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBA-PCR	primer blokkolt aszimmetrikus PCR (primer blocked asymmetric PCR)
PBS	foszfát-puffert tartalmazó sóoldat (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PEG	polietilén-glikol
PVDF	poli(vinilidén-fluorid)
QS	quorum sensing (lokális populációsűrűség érzékelése)
RC	reverz komplementer oligonukleotid
RNS	ribonukleinsav (RNA)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (Sodium Dodecyl Sulfate)
SELEX	ligandumok módszeres fejlesztése exponenciális dúsitással (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)
SOC	glükózzal kiegészített tápoldat (Super Optimal broth with Catabolite repression)
SOMAmer	lassan disszociáló proteomimetikus aptamer (Slow Off-rate Modified AptaMER)
TAE	Tris, ecetsav, EDTA keveréke (Tris, Acetic acid, EDTA)
TBE	Tris, borát, EDTA keveréke (Tris, Borate, EDTA)
TBS	Tris-puffert tartalmazó sóoldat (Tris-Buffered Saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
T _m	olvadási hőmérséklet
VEGF	érfal-hámsejt növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

1. Bevezetés

Korunk egyik, ha nem a leggyorsabban fejlődő élettudománya a molekuláris biológia. Az élő rendszerek egyre mélyebb, molekuláris szintű megismerése és működésük megértése évről évre olyan tudományos áttörések megszületéséhez járul hozzá, amelyek megoldásként szolgálhatnak mind globális problémáink, mind individuális betegségeink orvoslására. Az alap kutatásokból származó ismereteink adaptálása lehetőséget ad, hogy egy világméretű pandémia megfékezése, az élővilág diverzitásának megőrzése, vagy az egyre növekvő élelmezési és egészségügyi jólét igényének kiszolgálása jelentős források ráfordításával ugyan, de megvalósítható legyen.

Akárcsak az összetett eukarióta élőlények, a prokarióták is a mindennapi túlélésért küzdenek a saját evolúciós fejlődésük alatt felhalmozott ismereteik alkalmazásával. A legtöbb egysejtű képes önmaga és közvetlen környezete számára kialakítani egy változó körülményeknek is ellenálló, védett miliót, amiben fenntartható módon biztosítottak az életben maradáshoz szükséges feltételek. Ezek a mikroorganizmusok a közösség erejét felismerve társulásokban alakítják ki védett struktúráikat, amiket biofilmeknek nevezünk. A biofilmet alkotó kultúrák a maguk kiterjedt eszköztárával részt vesznek számos humán betegség kialakulásában, amik újabb megoldást kívánnak.

A biofilmek képződésének gátlásával közelebb kerülhetünk ezen kihívás hatékony leküzdéséhez, mi több megelőzéséhez. A nagy felbontású mikroszkópos technikák terjedésével képet kaphattunk arról, milyen szerkezeti elemek építik fel ezeket a struktúrákat, továbbá modern analitikai és molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével azonosíthatóvá váltak egyes molekulák funkciói, amik célpontjaként szolgálhatnak biofilmgátló törekvéseinknek. Az újgenerációs antibiotikumokon túl igény mutatkozik egyéb innovatív antimikrobiális stratégiák kifejlesztésére is, amelyek specifikus gátláson keresztül mérséklék a biofilmképződést. Ehhez nyújthatnak segítséget az aptamerek, amik sajátos térszerkezettel rendelkező egyszálú oligonukleotidok lévén képesek gyakorlatilag bármilyen célmolekula specifikus megkötésére, azok funkciójának gátlására. Alkalmazásuk lehetőséget teremt újabb, eddig meg nem oldott terápiás eljárások kidolgozására, ezáltal hozzájárulva a molekuláris biológia orvostudományokban is hasznosítható tovább virágzásához.

1.1. Aptamerek

1.1.1. Aptamerek felfedezése

Az 1990-es évek hajnalán két, egymástól függetlenül működő kutatópáros olyan rövid, egyszálú RNS molekulák előállítását írta le – egy hónapos különbséggel –, amelyek specifikusan, nagy affinitással kötődnek egy választott célmolekulához. Az egyik páros (Tuerk és Gold) a T4 bakteriofág DNS-polimerázát (gp43) választotta célpontnak, és erre hajtott végre egy szisztematikus RNS-szelekciót. A gp43 elfedi az őt kódoló mRNS Shine-Dalgarno szekvenciáját, így negatív visszacsatolás alatt tartja saját transzlációját. A szabályozás mélyebb tanulmányozása érdekében egy véletlen bázissorrendű oktanukleotid-hurkot tartalmazó egyszálú RNS-könyvtárat hoztak létre, amiből a szelekciós folyamat eredményeként a vad típusú szekvenciához képest közel kétszer nagyobb affinitással ($K_D = 17$ nM) rendelkező alternatív RNS molekulát sikerült izolálni. Ezzel demonstrálták, hogy egy random bázissorrendű RNS-gyűjteményből hamar azonosíthatók a fehérjéhez jól kötődő nukleinsav szekvenciák. Víziójuk szerint, módszerük általánosan alkalmazható bármilyen célmolekulára. A módszert az angol *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*-nek, vagy röviden SELEX-nek nevezték el [1].

A másik szerzőpáros (Ellington és Szostak) szerves kismolekulákra végzett hasonló RNS-szelekciót. Céljuk az volt, hogy kísérleteik révén jobban megértsék a korai élet keletkezését alakító katalitikus makromolekulák fejlődését. Ehhez hat különböző festékkalkotó molekulát választottak, amelyek egy sor metabolikus enzim kofaktorát imitálták és szerkezetükből adódóan mind hidrogénkötéseket, mind van der Waals-kölcsönhatásokat tudtak kialakítani az RNS-ekkel. A festékmolekulákat agaróz gyöngyökhöz kapcsolták, és hat különböző affinitásoszlopba töltötték, amire külön-külön rétegezték a mintegy 10^{13} egyedi „random-mer” szekvenciát tartalmazó szintetikus RNS-könyvtárat. Mosási lépéseket követően a célmolekulákról eluált RNS-eket reverz transzkriptázzal DNS-sé írták át és PCR-rel sokszorosították, majd *in vitro* transzkripcióban visszaírták egyszálú RNS-sé, hogy a kötő szekvenciák mennyisége feldúsuljon a következő ciklushoz. További öt ciklus után azt figyelték meg, hogy az így nyert RNS molekuláknak több, mint 50%-a kötődött az egyes oszlopok töltetéhez, ami a kiindulási 0,1%-hoz képest a specifikus szekvenciák számottevő dúsulására utalt. Egyes elúciók a hasonló kémiai szerkezettel rendelkező festékmolekulákat is meg tudták

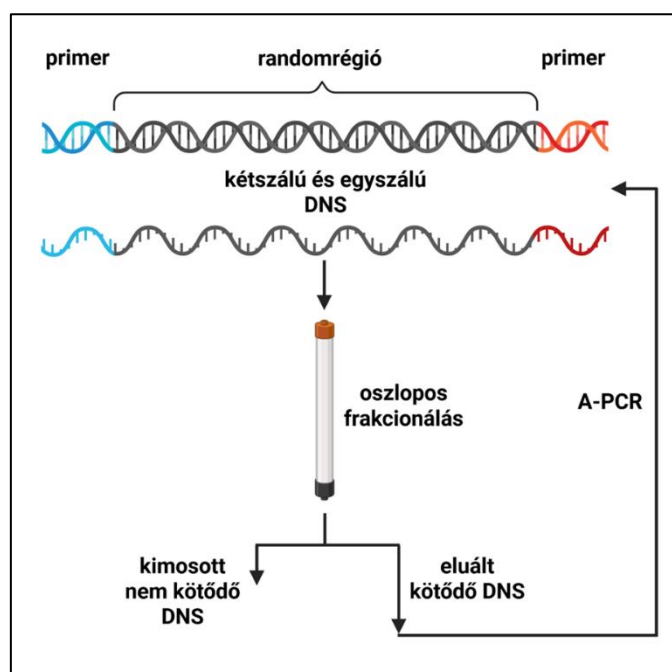
különböztetni egymástól, amivel bebizonyosodott, hogy nagy diverzitású random nukleinsav könyvtárból sikerrel szelektálhatók specifikusan illeszkedő részecskék. A szerzők az izolált egyedi szekvenciák megnevezésére az *aptus* (latin: illeszkedni) és *meros* (görög: részecske) szavak összevonásából az *aptamer* fogalmát vezették be, ami a mai napig használatos a tudományos világban [2].

Érdekesség, hogy egy évtizeddel később már több tucat kismolekulára – különféle aminosavakra, nukleotid származékokra és antibiotikumokra – fejlesztettek specifikus aptamereket, amik egyre szélesebb kutatói körnek adtak új felfedezésekre lehetőséget. Fény derült arra, hogy prokarióta sejtek *btuB* mRNS-ének 5'-nem-transzlálódó régiójában specifikus, fehérjefüggetlen metabolit-megkötés történik, ami az mRNS térszerkezetét megváltoztatva gátolja a transzláció iniciációját, így a riboszóma összeszerelődését és a kódolt kobalamin (B₁₂-vitamin) transzporter kifejeződését. Metabolitokon túl intracelluláris hírvivő molekulákról is kimutatták, hogy az mRNS-hez kötésen keresztül olyan bakteriális gének kifejezését képesek befolyásolni, amik alapvető sejtfolymatok, motilis és biofilmképző életmódok szabályozását teszik lehetővé [3–5]. Mindezen eredmények rámutattak arra, hogy a természetben előforduló ribonukleinsav-kapcsolók (*riboswitch*-ek) az aptamerekre jellemző módon dinamikus térszerkezetükkel specifikusan és nagy érzékenységgel képesek felismerni célmolekulájukat.

1.1.2. Aptamerek szelekciója, SELEX-ek típusai

Az aptamerkutatókban idejekorán az a szemléletformáló elgondolás született, ami szerint a tradicionális ribonukleinsav szelekciók mellett dezoxiribonukleinsav könyvtárból is izolálhatóak lehetnek specifikus aptamermolekulák [6]. A hipotézis igazolásához DNS-könyvtár alkalmazásával is megismételték a festékalkotó szerves molekulákra végrehajtott szelekciót. Tették ezt annak reményében, hogy a DNS-ek használatával az RNS-eknél stabilabb, nagyobb farmakológiai potenciállal bíró molekulákat fejleszthessenek. A korábbi tanulmányban bemutatotthoz hasonlóan, körülbelül $2-3 \times 10^{13}$ egyedi szekvenciát tartalmazó szintetikus DNS-könyvtárból indultak ki. Az egyszálú DNS szekvenciákban véletlen sorrendben követte egymást 120 természetes dezoxinukleotid, amely szakaszt az amplifikációt elősegítő két ismert primerrégió határolt. A célmolekulával történő inkubálást és mosásokat magas sókoncentrációjú pufferben végezték, a nem-kötő szekvenciák ezalatt eliminálódtak,

majd a tölteten rögzített célmolekulákra kötődött aptamereket vízzel eluálták. A kapott elúciók nukleinsavtartalmát töményítették és az egyes DNS-aptamereket aszimmetrikus PCR-ben sokszorosították, aminek az egyszálú termékét a következő szelekciós ciklusban tudták felhasználni kiindulási könyvtárként (1. ábra). Az amplifikációs lépésen kívül újítás volt még a ciklusok közé beiktatott negatív szelekciós lépés, aminek alkalmazásával a töltet anyagához kötődő nem-specifikus aptamerek nagyrészt kiszűrődtek, ezáltal jelentősen gyarapodott a specifikus DNS szekvenciák aránya, így javult a szelekció hatékonysága. A SELEX végeztével az ellenőrzés során megállapították, hogy az izolált egyszálú DNS aptamerek affinitása nem csak a szekvenciától, hanem a nukleinsav kémiai összetételétől is függ, ugyanis az RNS átíratok – szemben a DNS oligonukleotidokkal – nem mutattak jelentős kötődést az oszlopok töltetére konjugált célmolekulák iránt. A specifikus szekvenciák elemzése felderített továbbá egy konszenzus hurokkal rendelkező hajtú-struktúrát is, amellyel rendelkező DNS-aptamer variánsok négy-öttszörös affinitásnövekedést mutattak az azzal nem rendelkezőkhöz képest [6,7].



1. ábra: Az első DNS aptamerszelekció sematikus ábrájának reprodukciója [6] alapján.

Az előbbieken részletezett forradalmi DNS aptamerszelekció folyamata logikájában és lépéseiben alapul szolgál valamennyi azóta kivitelezett nukleinsav SELEX típusnak (1. táblázat). A modern szelekciós stratégiák használatával mára rengeteg

szervetlen és szerves molekulatípusra kínálkozik elérhető aptamer, legyen az akár fémkation, szerves kismolekula, nukleotid, enzimekofaktor, antibiotikum, nukleinsav, aminosav, szénhidrát, fehérje, toxin, vírus, prokarióta vagy eukarióta sejt [8]. Az Aptagen biotechnológiai cég gondozásában elérhető [Apta-Index](#) internetes adatbázisban lehetőségünk van érdeklődésünknek megfelelő, publikált aptamerekre rákeresni és tulajdonságaik között böngészni [9]. A leggyakoribb célmolekulák tipikusan fehérjék, amiket a kismolekulák és a sejtek követnek. Az aptamerszelekció több előretervezett lépést igénylő folyamat, amelynek sikeres kivitelezéséhez számos szelekciós paramétert kell optimális értéken tartani [10–12]. Habár standardizált SELEX protokoll a szelekciós célmolekulák és a felhasználási körülmények sokszínűsége miatt nem áll a kutatók rendelkezésére, az elmúlt években felhalmozott publikált tapasztalatok és a Nemzetközi Aptamer Társaság ([INSOAP](#)) által kezdeményezett publikálási irányelvek bevezetése az aptamerszelekciók egységesítésére olyan törekvések, amelyek elősegíthetik a megbízhatóan működő aptamerek azonosítását [13–16].

Bármilyen célmolekula kerül is kiválasztásra, a szelekció sikerét alapjában meghatározza, hogy a kiindulási aptamerkönyvtárat kellően sokféle egyedi szekvencia alkossa, amit a randomrégió hossza és a könyvtár kémiai összetétele határoz meg. A szintetizált aptamerkönyvtárak központi randomrégiója a szakirodalom szerint 8 és 200 nukleotid között változnak, de átlagosan 20-80 nukleotid hosszúak, amit egy-egy 18-25 nukleotidból álló primerrégió határol az 5'-, és 3'-végeken. A természetes nukleotidokat kiegészíthetik módosított nukleotidok, módosított foszfát-, vagy cukoregységek, amik hatással vannak mind a célmolekulával kialakított kölcsönhatásokra, mind az aptamerek stabilitására. Ugyancsak döntő fontosságú a funkcionális aptamerek előállításához a szelekcióspuffer összetételének körültekintő, prospektív megválasztása. A célmolekula reakciókészségétől és az aptamer jövőbeni alkalmazásától függően mérlegelendő a konvencionális fiziológiás pufferek, úgymint a Tris, a HEPES és a PBS, illetve a kereskedelmi forgalomban elérhető egyszerű vagy összetettebb komplex tápoldatok, továbbá a mesterséges biológiai fluidumok használata, amik a legélethűbb és legreprodukálhatóbb környezetet biztosíthatják a szelekcióhoz, valamint az azt követő karakterizálási mérésekhez. A fémkationok jelenléte jelentős hatással van az aptamerek térszerkezetére és stabilitására, továbbá számos fehérje aktív konformációjára, azonban a túl magas pozitív ion koncentráció elfedheti a cukor-foszfodiészterek negatív töltését,

ennél fogva gyengíti a célmolekulával kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásokat. Hasonlóképpen sarkalatos pont a kölcsönható partnerek és a felhasználás szempontjából optimális pH megválasztása, hiszen a célmolekula ösztötlését legtöbb esetben meghatározza a környező hidrogénionkoncentráció. Releváns metabolitok, valamint kompetitor molekulák hozzáadásával és egyre rövidülő, releváns hőmérsékleten végrehajtott inkubációs idővel biztosítható a valós funkcionális környezet, amiben ténylegesen a tervezett alkalmazási közegükben specifikus aptamerek érvényesülnek. A célmolekula típusától függően megfontolandó a kötődő és nem-kötődő aptamerek hatékony elválasztásának módja. Ehhez a szelekció során célszerű membránra vagy tenyésztő edény felületére, affinitásoszlop töltetéhez, funkcionalizált mágneses affinitásgyöngyökhöz kötni a célmolekulát. Elégtelen szeparációs lépés következtében visszamaradhatnak és sokszorozódhatnak a könnyen amplifikálódó aspecifikus szekvenciák, ezzel rontva a szelekciós hatékonyságot. A szelekció hatékonyságát és az aptamerek specifikusságát minden esetben ajánlott a célmolekulához hasonló „negatív”, illetve kontra-szelekciós célmolekulákat magában foglaló lépéssel növelni.

DNS aptamerszelekció esetén a ciklusok végeztével a célmolekuláról eluált szekvenciák dúsító PCR-ben kerülnek sokszorosításra, majd a következő ciklushoz a kettősszálú termékeket egyszálúsítani szükséges. Az egyszálúsítás eléréséhez az egyenlőtlen primer mennyiségeket használó aszimmetrikus PCR-eken kívül elterjedt még a λ -exonukleázal történő kezelés és a kettősszálú alkalikus denaturálása, melyek hatékonysága változó lehet [17,18]. A λ -exonukleáz számára a reverz primer 5'-végén elhelyezett foszfát-módosítás indikátorként jelzi az elemésztendő szálat, amit 5'→3' irányban, mérsékelt hibaszázalékkal hidrolizál egyszálú forward szállá az enzim [19–21]. Aktivitását csorbítja a PCR keverékben fel nem használt primerek, dNTP-ok és melléktermékek jelenléte, ezért a kezelés előtt az amplifikált termékek tisztítása ajánlott [22]. Felhasználói oldalról valamelyest egyszerűbb a duplaszálú PCR termékek alkalikus denaturálása. Ekkor a PCR keveréket a reverz szál 5'-végén található biotinjelölésen keresztül sztreptavidinnel borított mágneses affinitásgyöngyökhöz kapcsoljuk, majd a két szál közötti hidrogénkötéseket nátrium-hidroxiddal megbontjuk és az elváló forward szálat izoláljuk. Hátrányai az alkalikus denaturálásnak, hogy a lúgkoncentráció és a kezelési idő optimalizálандó, gondoskodni kell a denaturált szálat tartalmazó oldat közömbösítéséről, továbbá a kölcsönhatásokban előszeretettel használt biotinjelölést a

forward szál nem, csak a reverz szál terminálisa hordozhatja. Az átlagosan 8-15 ciklusos aptamerszelekció lépései során óhatatlanul fellépő emberi hibafaktort kiküszöbölendő automatizált eljárások már része a terület vívmányainak. Előre programozott robotok segítségével felgyorsíthatóvá és reprodukálhatóvá váltak a SELEX-ek, továbbá az ugyanazon célpontra párhuzamosan végzett szelekciókkal lehetőség nyílt az egyes szelekciós paraméterek kötő szekvenciák arányára gyakorolt hatásának vizsgálatára [23,24].

A ciklusok és a SELEX végén a szelekció előrehaladtát, vagyis azt, hogy az aptamerkönyvtárakban a specifikus aptamerek dúsultak, ellenőrizni szükséges. Napjainkban egyre könnyebben elérhető az újgenerációs szekvenálás lehetősége, ami a hagyományos néhány tíz aptameres vizsgálatot nagyságrendekkel túlszárnyalva a teljes szelekciós folyamat lépéseiből származó több milliós szekvencielemzést tesznek monitorozhatóvá [25–27]. A szelekciós lépések kiértékeléséből származó legfontosabb információk a könyvtár jelenlétén túl a visszamaradt egyedi szekvenciasorrendek, a szekvenciák diverzitásának ciklusok közti változása és a kötődésben potenciálisan résztvevő szekvenciamotívumok megjelenése.

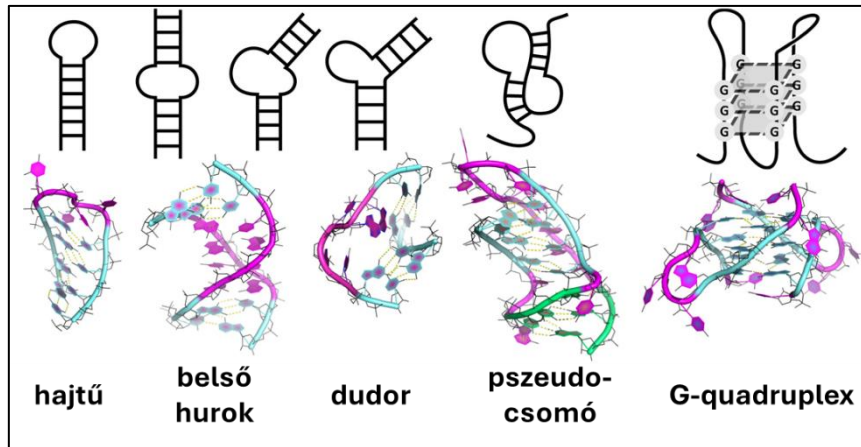
1. táblázat: Fontosabb SELEX változatok jellemzői [8,28] alapján.

SELEX típusa	Jellemzők	Megjelenés
<i>Negative SELEX</i>	Ennek során a jelenlévő nem kívánt anyagokra, hordozókra történik ellenszelekció, ezáltal az aspecifikus szekvenciák kizáródnak az aptamerkönyvtárból.	1992 [6]
<i>Counter SELEX</i>	A célmolekulának szerkezeti analógja, homológ variánsa ellen végrehajtott negatív szelekciós lépést tartalmazó eljárás, amivel biztosítható a nagyfokú szelektivitás.	1994 [29]
<i>Spiegelmer technika</i>	A célmolekula enantiomerjére történik D-nukleinsav szelekció, majd az L-nukleinsav szintézisével az eredeti natív targetre specifikus nukleáz-rezisztens L-aptamereket kapunk.	1996 [30]
<i>Chimeric SELEX</i>	Két aptamerszelekciót végeznek két célpontra, majd az átlapoló primerszakaszok mentén egyesítik a szekvenciákat, hogy bifunkciós aptamereket nyerjenek.	1998 [31]
<i>Crossover SELEX</i>	A módszer során célpontként mind a tisztított fehérjéket, mind az azonos fehérjét a felszínükön expresszáló sejteket használják.	2001 [32]
<i>Toggle SELEX</i>	Az aptamerszelekció több, hasonló szerkezetű célmolekula-analóg (pl. peptid és fehérje) változtatásával történik, hogy az aptamer szélesebb ligand felismeréssel működhessen.	2001 [33]

<i>Cell SELEX</i>	Komplex struktúrák, úgymint vírusok vagy sejtek ellen végrehajtott szelekció, amiben a célmolekula ismeretlen, ám a SELEX-et követően tömegspektrometriával felderíthető.	2003 [34]
<i>Tailored SELEX</i>	Primerrégió nélküli aptamerszelekciót tesz lehetővé. Az amplifikációhoz a primereket a randomrégióhoz ligálják, azután lehasítják, így elérhető az aptamer hosszának minimalizálása.	2003 [35]
<i>FluMag SELEX</i>	A célmolekulát mágneses affinitásgyöngyök felületére immobilizálják, ezzel megkönnyítve és felgyorsítva a mosási és szeparációs lépéseket. Nem utolsó sorban, így csökkenthető a felhasználandó célmolekula mennyisége.	2003-2005 [36,37]
<i>FACS SELEX</i>	Áramlási citométer beiktatásával azok a fluoreszcens aptamerek választhatók el, amelyek az élő szuszpenziós vagy primer célsejtekhez kötődtek.	2010 [38]
<i>Capture SELEX</i>	Különlegessége, hogy a célmolekula helyett az aptamerkönyvtár van a mágneses gyöngyök felületére kötve. Így a nehezen vagy nem-kiköthető kismolekulákra történő szelekció megvalósítható.	2005-2012 [39,40]
<i>Motif SELEX</i>	A szelekciós könyvtár a primerrégiók mellett tartalmaz még további térszerkezet-javító konszenzus szekvenciákat, amik lehetővé teszik a megnövelt affinitású aptamerek izolálását.	2025 [41]

1.1.3. Aptamerek molekuláris szerkezete

Az aptamer kifejezést az egyszálú specifikus oligonukleotidokra használjuk, de fontos megjegyezni, hogy a valóságban ezek a molekulák többnyire nem lineárisak, hanem jellegzetes másodlagos és harmadlagos struktúrákba rendeződnek. A komplex struktúrákat a klasszikus Watson-Crick bázispárosodási szabályok mellett kevésbé szokványos nukleinsav formák is alakítják (2. ábra). A Hoogsteen bázispárosodási elmélet szerint a pentózhoz N-glikozid-kötéssel kapcsolt purin bázisok a kedvezőbb *anti*-konformációtól (kifelé néző) eltérő *syn*-helyzetben (befelé fordulva) is állhatnak, ezáltal az adenin és guanin N1-es atomjai helyett a N7-es atomjai töltik be a H-akceptor szerepét [42]. A jelenség következtében egymástól néhány nukleotid közbeékelésével elválasztott guaninban gazdag régiók egyértékű kation jelenlétében G-quadruplexeket alkothatnak, amik stabil másodlagos szerkezetet adnak megannyi aptamernek [43,44] és élőlényekben, fiziológiásan is fellelhető nukleinsav struktúráknak [45]. Az aptamerek sajátos térszerkezetének gyakori összetevői még a változó hosszúságú hajtű elemek, a láncközi dudorok és a pszeudocsomók, amiknek a kialakulását megszabja az aptamer elsődleges szerkezete, a közeg összetétele és hőmérséklete, valamint a célmolekula jelenléte [46–48].

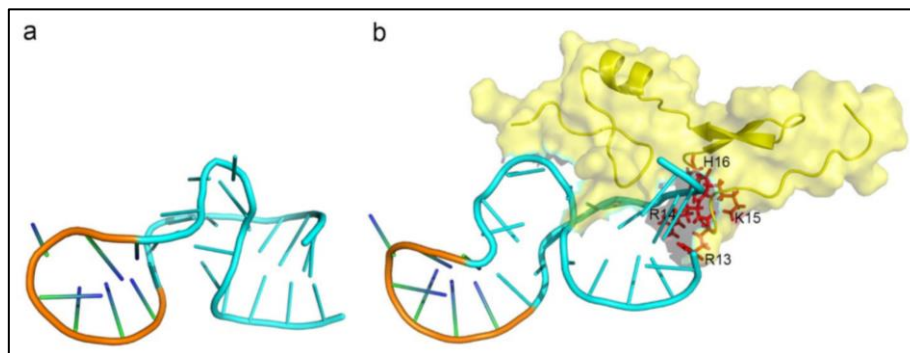


2. ábra: Az aptamerek térszerkezetében megjelenő jellegzetes elemek [48] alapján.

A fent vázolt önálló szerkezettel bíró aptamerek funkcionális formájukat dinamikusan képesek kialakítani, így az enzim-szubsztrát vagy antitest-antigén kapcsolódásokhoz képest rugalmasabb illeszkedéssel kapcsolódnak célmolekulájukhoz. A változékony, de mégis stabil szerkezetből adódó célmolekulakötésre nevezetes példa az ATP-kötő aptamer [49]. A 25 nukleotidból felépülő DNS térszerkezetét két G-kvartett alapozza meg, amit két rövid komplementer szakasz tovább stabilizál, és egy ATP-specifikus kötőzsebet létrehozva alkalmassá teszi az aptamert a szelektív megkötésre [49,50]. Az aptamerek flexibilis térszerkezetváltozása tette lehetővé ezenfelül azt is, hogy élelmiszer-szennyező ochratoxinokat megkülönböztetni képes DNS aptamereket azonosítsanak jelölésmentes mérési elrendezésben [51]. Az aptamer-ligand szerkezetek kialakulásának megértését segíti elmélyíteni az az összefoglaló, amiben a szelektált oligonukleotidok fehérjékkel alkotott komplexeit vizsgálták [52]. A tanulmány szerint általános érvényűnek látszik, hogy a fehérje-aptamer komplexek kémiai kölcsönhatásait elsősorban a fehérjék aptamerköti felületét (epitópját) képező elektropozitív szegmensek határozzák meg, amik ideális platformot biztosítanak a nettó negatív töltésű nukleinsavak kötéséhez. A foszfodiészter-kötések mellett, ezek a nem kovalens kölcsönhatások kialakulhatnak a nukleinsavak bázisainak delokalizált elektronrendszere és a részben vagy teljesen pozitív töltésű aminosav oldalláncok (Asn, Gln, Arg, Lys) között kation- π kölcsönhatásokban, illetve kifejezetten ionos kölcsönhatásra emlékeztető nukleobázis és protonált arginin közti π - π kölcsönhatásokban. A dinamikus struktúrát az aptamerek és más aminosavak közötti hidrogén-hidak tovább stabilizálhatják. Ezeket az elméleti jelenségeket igazolja a kísérletes szerkezetek alapján modellezett pegaptanib-VEGF¹⁶⁵

komplex, amiben a kölcsönhatást poláros – főként pozitív – aminosavak koordinálják (3. ábra). Erősíti az elmélet igazát, hogy az aptamer-fehérje kölcsönhatások erősségét jellemző egyensúlyi disszociációs állandó (K_D) értéke korrelációt mutat a fehérje össztöltésével, így feltételezhető, hogy magasabb izoelektromos ponttal rendelkező fehérjék esetén alacsonyabb K_D -értéket kapunk fiziológias körülmények között [25].

A legtöbb fehérje fiziológias oldatokban ugyan töltéssel rendelkező, szolubilis formát ölt, tovább szélesítheti a kialakuló kémiai kölcsönhatások tárházát a hidrofób (pl.: benzil-, naftil-, triptamino-, izobutil-) csoportokat hordozó oligonukleotidok alkalmazása. Ezek a C5-ös atomján módosított uridint prezentáló aptamerek (*SOMAmer*-ek) intramolekuláris és intermolekuláris hidrofób klasztereket alkotnak, amelyek a célmolekula specifikus megkötéséért lesznek felelősek. Az interleukin-6-ra szelektált aptamer szerkezetvizsgálata során megfigyelték, hogy az aptamer célmolekulakötő felszíne (paratópja) körülöleli a proinflammatorikus citokint, amiben tízből nyolc módosított nukleotid közvetlenül részt vesz. A kölcsönható benzil-csoportot kondenzált aromás csoportokra cserélve pedig alacsonyabb K_D -t kaptak [53,54]. Ezekkel a módosításokkal egyrészt nagyságrendekkel megnövelhető az aptamerek affinitása célmolekulájuk iránt, másrészt a szokatlanul nagy térrészt elfoglaló hidrofób csoportok miatt azok ellenállóbbá tehetők nukleázokkal szemben [55,56]. Mindezen kedvező tulajdonságaik ígéretes felhasználási távlatokat nyitottak az elkövetkezendőkre nézve.



3. ábra: A pegaptanib-VEGF¹⁶⁵ aptamer-fehérje komplex modellje. A pegaptanib aptamer egyedi szerkezetét (a) megváltoztatva illeszkedik célmolekulájához (b), amit az epitópon található poláros aminosavak (piros) segítenek elő [52].

1.1.4. Aptamerek *in silico* vizsgálata

Az aptamerek szelekciója a SELEX után az egyes ciklusokban feldúsult szekvenciák elemzésével és az aptamerek karakterizálásával folytatódik. Ez a meghatározó fázis egyfelől számítógéppel történő (*in silico*) bioinformatikai analízist, másfelől kémcsőben végzett (*in vitro*) kísérletes kölcsönhatás vizsgálatokat igényel és – tapasztalataink alapján – jócskán időmeghatározó szakasza lehet a teljes aptamerszelekciós folyamatnak.

Az aptamerszekvenciák kis elemszáma esetén jó kiindulás, ha a szekvenálási eredményeket felhasználva az egyedi szekvenciák ismétlődését és hasonlóságát vetjük össze. Kiegészítik ezeket az elsődleges vizsgálatokat azok a számítási online alkalmazások, amelyekkel felderíthetők az aptamerek önálló szerkezetelemei [57,58], továbbá a szekvenciák randomrégiójában megjelenő ismétlődő motívumok [59]. Nagy áteresztő képességű szekvenálási eredmények adatainak kezelésére és összetett elemzésekhez ugyancsak hozzáférhetőek kiértékelő programok [60,61], amik pontozó rendszereket alkalmazva rangsorolják az egyes szelekciós ciklusokból származó szekvenciák gyakoriságát, azok lépések közötti dúsulását, a megjelenő motívumklasztereket, valamint a másodlagos szerkezetet jellemző termodinamikai paramétereket. Szükséges bioinformatikai kapacitás hiányában az elemzéseket erre specializálódott vállalkozások is elvégezhetik [62].

Merőben új fordulatot hozott a molekuláris szerkezetek bioinformatikai modellezése terén az elmúlt években életre keltett, gépi tanulással fejlesztett harmadlagos fehérjestruktúrát prediktáló szerver, az AlphaFold megjelenése [63]. A módszer fejlesztőinek célja egy olyan alkalmazás létrehozása volt, amely a fehérjék szerkezetére vonatkozó fizikai és biológiai ismereteket magában foglaló neurális hálózati modelljük segítségével képes nagy pontosságú fehérjeszerkezet-jóslást végrehajtani, mindössze a felhasználó által betáplált aminosav sorrend alapján. A módszer validálása során igazolást nyert, hogy az algoritmus a klasszikus szerkezetfelderítési kísérletek pontosságával képes az addig nem publikált fehérjeszerkezetek jelentős részét modellezni [64]. A fejlesztéseknek köszönhetően 2024-ben újabb mérföldkőhöz ért az AlphaFold, mivelhogy a fehérjék szerkezetmodelljén túlmenően további biomolekulák kölcsönhatásának predikcióját is jó hatásfokkal el tudta végezni, ezzel utat engedve az azelőtt soha nem vizsgált molekulák komplexének kísérletes méréseket mellőző tanulmányozásának [65].

A feltalálók tudományos eredményét fémjelzi, hogy munkájukkal elnyerték a 2024. évi kémiai Nobel-díjat [66].

Habár unikális *in silico* technikát kapott a kutatótársadalom az AlphaFold publikálásával, a jelenlegi 3-as verzió korlátai következtében nem helyettesítheti, csupán kiegészíti a szisztematikus kísérletes vizsgálatokat.

1.1.5. Aptamerek *in vitro* vizsgálata

Az aptamerek felfedezésével párhuzamosan az alkalmazott természettudományok fejlődése megannyi metodikai újítást hozott magával, amelyek lehetőséget teremtettek többek között az aptamerek és célmolekulájuk kölcsönhatásának kvantitatív jellemzésére. Bár két molekula kötődése azonos körülmények között elméletileg ugyanazzal az egyensúlyi disszociációs állandóval jellemezhető, a gyakorlat mégis azt mutatja, hogy számos tényező befolyásolhatja a mért kötődést. Ilyen tényezők lehetnek például: a vizsgálendő minták típusa, minősége, a választott mérőtechnika és az ahhoz szükséges mintaelőkészítés, a mérési elrendezés, a kezelő személye, vagy akár a laboratórium felszereltsége [67]. Mindezeket figyelembe véve nem meglepő, hogy különböző állandókat mérünk egy adott kölcsönhatásra, amikkel így legfeljebb becsülni tudjuk az elméleti értéket [67–69]. Éppen ezért ajánlatos minél több, eltérő elven alapuló technikával vizsgálni a kölcsönhatást, beleértve az aptamer-célmolekula kötődést is.

Jelen dolgozatban használt kölcsönhatás vizsgálati technikák (lásd: Módszerek 3.3.2.) közül az ALPHAScreen mérésekben a vizsgált molekulákat funkcionális donor és akceptor gyöngyök felületére kapcsoljuk, majd a mintakeveréket 680 nm hullámhosszúságú fényel besugározzuk. Ekkor a donor gyöngyök az oldatban jelenlévő normál állapotú triplétt oxigénmolekulákat képesek reaktívabb szingulett állapotú oxigénné gerjeszteni. Az aptamer-célmolekula kölcsönhatás következtében a donor és akceptor gyöngyök közel kerülnek egymáshoz, és a gyöngyök közti távolságot megtevő reaktív oxigén gerjeszteni tudja az akceptor gyöngyökben található fluorofór komponenseket, így a létrejött kölcsönhatást 520-620 nm-en kemilumineszcens jel formájában detektálhatjuk [70,71]. Kölcsönhatás hiányában az akceptor gyöngyök háttérjelet emittálnak. A technika előnye, hogy nagy mintaszám esetén viszonylag gyorsan, széles dinamikus tartományban, kevés mintaanyag felhasználása mellett

kaphatunk információt az affinitásról, azonban használatával az egzakt kinetikai paraméterek meghatározása körülményes.

A bioréteg interferometriás (BLI) mérésekhez először az egyik kölcsönható partnert szenzorfelületre immobilizáljuk, majd az így módosított szenzort a másik partnert tartalmazó mintaoldatba merítjük. Hozzákötődéskor a szenzor felületén található optikai réteg vastagsága megváltozik, amely változást a készülékből emittált, optikai rétegen visszaverődő fehér fény belső referenciához viszonyított hullámhossz-eltolódásával közvetlenül detektálhatunk. A módszerrel a kötődő molekula asszociációs és disszociációs kinetikáját valós időben követhetjük, ami értékes adatokkal szolgál a kölcsönhatás minőségéről [72]. Hátránya az immobilizálásnak, hogy a kikötött partnert jelölni kell és specifikus konformációjának kialakításában gátolt lehet.

Az aptamerek és célmolekuláik kölcsönhatását immobilizálás nélkül, tetszőleges mérési közegben is jellemezhetjük egy biofizikai elven működő népszerű technika, a mikroskálás termoforézis (MST) használatával. Lényege, hogy kölcsönhatás esetén a szabad partnerekhez képest megváltozik a vizsgált molekulakomplex összetömege, ösztölte és így szolvátburka, amit a termoforézis során fluoreszcenciaváltozás formájában tudunk követni [13,73,74]. A technika kiválóan alkalmas aptamerek megbízható és rugalmas körülmények között végzett karakterizálására, azonban a minták tisztasága és koncentrációja, valamint a fluoreszcens jelölés szükségessége limitálhatják az áteresztőképességét.

Összegezve, a jól kötő, specifikus aptamerek szelekciójához elengedhetetlen a sokrétű ellenőrzővizsgálatok elvégzése. Ez a mai gyakorlatban mind a bioinformatika nyújtotta korszerű számítási módszerek, mind a különböző kölcsönhatásvizsgáló mérési technikák konszekutív használatát jelenti. A karakterizálási fázis eredményeként gyakorlati jelentőséggel rendelkező aptamereket azonosíthatunk.

1.1.6. Aptamerek felhasználási területei és alkalmazása

Az aptamerek nagy affinitással történő specifikus ligand-felismerésük folytán számtalan felhasználási lehetőséget rejtnek magukban, amiket elsősorban alkalmazott kutatási, elválasztástechnikai, diagnosztikai, vagy terápiás területeken lehet kibontakoztatni. A potenciális alkalmazási területeken szinte egyeduralkodók a kutatás-fejlesztési és innovációs piacon jóval korábban megjelent monoklonális antitestek,

amiknek kutatását és előállításuk elvének kidolgozását már az aptamerek leírását megelőzően, 1984-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták [75]. Az antitestek jelentősége és megbízhatósága az esetek többségében valóban tagadhatatlan, azonban jellemzőik összevetéséből (2. táblázat) és az alábbiakban bemutatott gyakorlati példákból kitűnik, hogy az aptamerek több szempontból kedvezőbb tulajdonságokkal bírnak, így azok méltó alternatívái az ellenanyagoknak.

2. táblázat: Az ellenanyagok és aptamerek jellemzőinek összehasonlítása [76,77] alapján.

		Monoklonális antitest	Aptamer
Előállítás folyamata		<i>in vivo</i> , immunizálás	<i>in vitro</i> , kémiai szintézis
Előállítási idő		4-6 hónap	1-3 hónap
Célmolekulák típusa		korlátozott	korlátlan
Specifikusság (K_D)		nagy (μM -pM)	nagy (mM-pM)
Reprodukálhatóság		változó	megbízható
Módosítási lehetőség		korlátozott	széleskörű
Méret		150-180 kDa (IgG)	5-50 kDa (15-150 nt)
Szöveti penetráció		korlátozott	hatékony
Keringési féleletidő		hosszú	változó
Stabilitás	fizikai hatásra:	érzékeny	változó
	pH változásra:	érzékeny	érzékeny
	proteázzal szemben:	érzékeny	ellenálló
	nukleázzal szemben:	ellenálló	változó
Immunogenitás		jellemző	nem jellemző
Költségigény		magas	mérsékelt
Alkalmazás		széleskörű	feltörekvő

Egy kutatási gyakorlatból vett szemléletes példa, amely bemutatja, hogy milyen szituációban előnyösebb az aptamerek használata az antitestekkel szemben, az az aptameralapú hőmérsékletre aktiválódó (*hot start*) DNS polimerázok alkalmazása. A módosított nukleotidokat tartalmazó aptamer specifikusan kötődik a PCR enziméhez, amit adott hőmérsékletig gátlás alatt tart. A termociklus befejeztével a minta hőmérséklete lecsökken, így az intakt aptamer újra visszaköt a *Taq*-polimerázhoz és – szemben egyéb megoldásokkal – a következő termociklusokban ismét teljesen reverzibilisen kontrollálja az idő előtti polimeráz aktivitást [78]. Kedvező tulajdonságaikat igazolja még, hogy elvéve, de találni példát kimutatásra fejlesztett aptameralapú diagnosztikai termékekre is

[79]. Az egyik legismertebb ilyen eszköz a Neoventures Biotechnology vállalat által forgalmazott OTA-Sense és Afla-Sense detektáló reagenskészlet, amikkel penészgombák karcinogén toxinjait lehet élelmiszerekből kimutatni [80]. A toxinokon túl kecsegtető eredményeket mutatnak a betegágy melletti (*point-of-care*) diagnosztikára fejlesztett kardiális troponin I (cTnI) aptamerek megjelenése is, amely irányú fejlesztésekben munkacsoportunk is részt vett korábban [81–84]. Újabb példa az Aptamer Science cég diagnosztikai terméke, az AptoDetect-Lung, ami hét különböző biomarker detektálásával nyújt információt a nem-kissejtes tüdődaganat korai alakulásáról [85]. A legnagyobb diagnosztikai innováció potenciálját azonban mégis az aptamerfejlesztés prominens képviselője, a Larry Gold alapította SomaLogic hozta el a piacra a SomaScan formájában. A berendezés minimális mennyiségű biológiai fluidumból mintegy 17000 fehérje detektálását végzi el módosított nukleotidokat hordozó aptamerek segítségével, ami a patológias folyamatok követését és újabb biomarkerek azonosítását teszi lehetővé [86,87].

A hőmérséklet-aktivált DNS polimeráz példájából is látható, hogy a megfelelő aptamer képes működésében gátolni célmolekuláját. Ezt a sajátságát kihasználva seregnyi inhibitorfejlesztés eredményezett ígéretes, gátló hatású aptamereket [77], amik közül tucatnál is több aptamer vált mára klinikai vizsgálat tárgyává, hogy terápiás szerek hatóanyagaként kerülhessenek törzskönyvezésre (3. táblázat). Az első amerikai és európai gyógyszerhatóságok által 2004-ben, illetve 2006-ban engedélyezett aptameralapú gyógyszer a Macugen (pegaptanib) volt, amit az időskori makula degenerációval élők számára fejlesztettek ki. Az RNS-aptamer a vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) 165-ös izoformájához köt, amivel a tüneteket okozó új véredényképzést (*angiogenesis*) és az erek membrájának átjárhatóságát (*permeabilitas vascularis*) csökkenti. A hatóanyag farmakokinetikai tulajdonságait javítandó 5'-végén polietilén-glikollal kapcsolt, 2'-metoxi, illetve 2'-fluoro-csoportokat tartalmaz és intravitreális úton adagolható. A pegaptanib aptamer további indikációit érintő klinikai vizsgálatok folyamatban vannak [88,89]. Az terápiás aptamerek fejlesztését némileg visszavetette a REG1 (pegnivacogin) Fázis III-ban leállított vizsgálata. Az eseti antikoagulánsnak szánt készítmény perkután koronária intervenció során allergiás reakciót váltott ki néhány páciensben, amely reakciót – mint később kiderült – nem az aptamerre, hanem a keringési felezési időt növelő PEG-komponensre adott specifikus immunválasz idézett elő [90]. Új

lendületet adott azonban 2023-ban a második aptamergyógyszer, az Izervay (avacincaptad pegol) megjelenése. A szintén oftalmológiai célokra fejlesztett készítmény a C5 komplementfehérjéhez kötve gátolja a kaszkád működését, ezzel védi az ép fényérzékeny sejteket a membránt támadó komplex (MAC) kialakulásától és képes lassítani a retinadegenerációt [91].

A felsorolt véges számú példák valósan tükrözik, hogy az aptamerek mindennapi alkalmazása ez idáig nem került teljességgel kiaknázásra sem a molekuláris biológia rohamosan fejlődő eszköztárában, sem az orvostudományok területén. Mindazonáltal az elmúlt években megjelenő újítások és az egyre gazdagodó használatukra vonatkozó gyakorlati ismereteink ígéretes jövőt szavatolnak az aptamer kutatásoknak.

3. táblázat: Klinikai vizsgálatokban szereplő terápiás célú aptamerek [89,92] alapján.

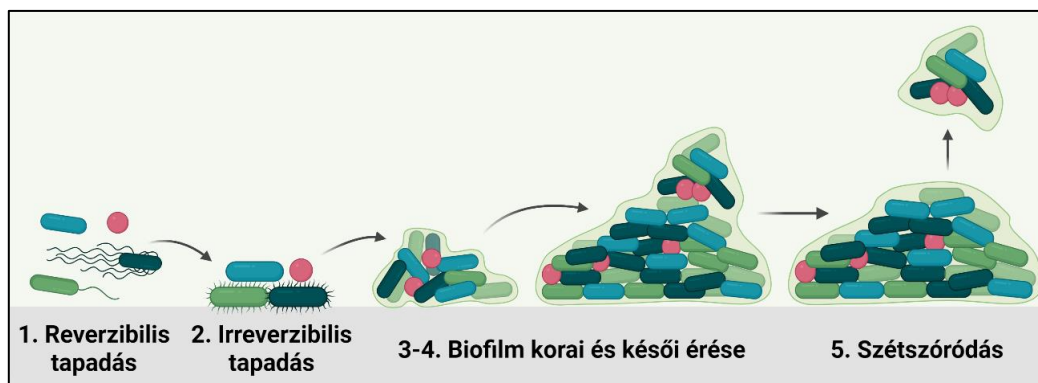
Aptamer	Típus	Célmolekula	Alkalmazás	Státusz
Macugen (pegaptanib)	RNS	VEGF ¹⁶⁵ fehérje	Időskori makuladegeneráció	FDA, EMA által engedélyezett
Izervay (avacincaptad pegol)	RNS	C5 komplement fehérje	Időskori makuladegeneráció	FDA által engedélyezett
REG1 (pegnivacogin)	RNS	Faktor IX fehérje	Koszorúér betegség	Fázis III, leállítva
Fovista (E10030)	DNS	PDGF fehérje	Időskori makuladegeneráció	Fázis III, leállítva
ARC1779	DNS	vWF fehérje	Vérzékenység	Fázis II, leállítva
AS1411	DNS	nukleolin	Akut mieloid leukémia	Fázis II, leállítva
NOX-A12 (olaptased pegol)	RNS Spiegelmer	CXCL12 fehérje	Agydaganat	Fázis II, teljesítve
NOX-E36 (emapticap pegol)	RNS Spiegelmer	CCL2 fehérje	Gyulladás-csökkentő	Fázis II, teljesítve
NOX-H94 (lexaptepid pegol)	RNS Spiegelmer	Hepcidin peptidhormon	Vérzékenység	Fázis II, teljesítve
BT200	RNS	vWF fehérje	Vérzékenység	Fázis II, toborzás
NU172	DNS	trombin fehérje	Szívbetegség	Fázis II, megkezdve
BC007 (rovunaptabin)	DNS	GPCR, SARS-Cov-2 tüskefehérje	Szívelégtelenség, poszt-COVID-19 szindróma	Fázis I, teljesítve
AON-D21	L-DNS/RNS	C5a fehérje	Gyulladás-csökkentő	Fázis I, toborzás
⁶⁸ Ga-Sgc8	Izotópkonjugált DNS	PTK7 fehérje	Vastagbél-daganat	Preklinikai fázis

1.2. Biofilmek

1.2.1. Biofilmek kialakulása, felépítése és jelentősége

A biofilmek kémiai és biológiai rendkívül heterogén, extracelluláris polimer alkotókból (EPS) felépülő, jellemzően szilárd-folyadék határfelületen kialakuló dinamikus struktúrák, amelyek hozzájárulnak a legtöbb prokarióta és néhány egysejtű eukarióta mindennapi túléléséhez. Számos kísérletes és összefoglaló tanulmány központi kérdése, hogy hogyan alakul ki egy önálló, szabadon mozgó (planktonikus) sejtből a biofilmképző sejtek összetett és kiterjedt halmaza, illetve milyen folyamatok szabályozzák annak létrejöttét. Az elektronmikroszkópok fejlődésével láthatóvá váltak a mikrométer alatti tartományba eső sejtalkotók és sejtfüggelékek, így a baktériumokat borító tokanyag is [93], ami csakhamar glikokálisként [94,95] terjedt el a tudományos köztudatban, és jó néhány baktériumtörzs sejt felszínén került azóta azonosításra [96,97]. A glikokális a sejtek ruténium vörössel festhető poliszacharidokból, glikoproteinekből, esetleg glikolipidekből álló külső rétege, ami védi azokat a kiszáradás és a fagociták ellen, továbbá biztosítja a felülethez, vagy más sejtekhez való tapadásukat [97].

Az adhézió a biofilmképződés ötlépéses ciklusának kezdeti lépése [98]; a planktonikus sejtek előbb reverzibilisen, majd irreverzibilisen tapadnak a felszínhez, amivel nő a lokális populációsűrűség és a mikrokolóniák által megindul a biofilm korai érése, amit az EPS termelésben gazdag késői érés követ, végül a kiterjedt biofilmből kiválnak és szétszóródnak az újabb planktonikus sejtek (4. ábra). *Pseudomonas aeruginosa* sejtekkel végzett kísérletek során direkt mikroszkópos és fehérjeexpressziós vizsgálatokkal kimutatták, hogy az egyes stádiumokat különböző fenotípusok jellemzik. A biofilmalkotó sejteknek jelentősen megváltozott a motilitása, az alginát termelése és a kommunikációja a folyamat során [99]. Ez összhangban volt más munkacsoportok eredményeivel is, amik megváltozott génexpressziós mintázatokat igazoltak planktonikus *P. aeruginosa*, *P. putida*, *E. coli*, *L. plantarum* és *S. mutans* sejtek, valamint azok felülethez kötődött formái között [99–101]. Világossá vált, hogy a kezdeti adhéziót követően a biofilmérés szakaszában egyes gének – amik pl. a mozgást és védelmi feladatokat szolgálják – kikapcsolódnak, míg az EPS termelésben és annak szabályozásában fontos szerepet játszó gének bekapcsolásra kerülnek [102].



4. ábra: A biofilmképződés ötlépéses ciklusa.

Bár a biofilmképződés szabályozásának molekuláris hátterét jelenleg is aktívan kutatják [103–106], az eddigi eredmények alapján a főbb mozgató rugók a környezeti hatások (tápanyag, pH, hőmérséklet, oxidatív stressz, populációsűrűség) megváltozása, valamint a kezdeti tapadást követő fenotípusváltozás lehetnek. E faktorok hatására egyes másodlagos hírvivők szintje megnő a sejtekben. A ciklikus di-guanozin-monofoszfát (c-di-GMP) bakteriális jelátviteli molekula számos sejtfolyamat, többek között a felszíni adaptáció, a motilitás és a biofilmképződés szabályozásához is hozzájárul [107–111]. Az így alakuló mikrokolóniákban a lokális sejtsűrűség egyre növekszik, ami az egysejtűek intercelluláris kommunikációjához vezet. Luciferáz gént expresszáló *Vibrio fischeri* törzsekkel végzett kísértekben megfigyelték, hogy a frissen átoltott tengeri baktériumok kezdetben nem mutatnak biolumineszcenciát, csak egy bizonyos növekedési szint elérése után [112]. Hasonló sejtszám-függő expressziót írtak le más baktériumtörzsek esetén is [113–115], amely jelenséget – a határozatképességhez szükséges létszám jogi kifejezése nyomán – *quorum sensing*-nek nevezték el [116]. A *quorum sensing* (QS) – a többsejtű eukarióta rendszerekre emlékeztető – parakrin sejt-kommunikációt tesz lehetővé, amiben a mediátor szerepét nem hormonok vagy citokinek, hanem kis molekulatömegű lakton-, furán-, zsírsav-származékok, esetleg oligopeptidek, úgynevezett *autoinduktorok* töltik be [106]. Az autoinduktorok hatására a biofilm további érése, az extracelluláris polimer alkotók (EPS) kiterjedt szintézise és a sejtek szóródása valósul meg (4. táblázat).

4. táblázat: Biofilmképző mikroorganizmusok által expresszált releváns gének, azok funkciói és a hatást kiváltó lehetséges autoinduktorok.

Fajok	Aktiválódó gének és funkciójuk	Potenciális autoinduktor	Hivatkozás
<i>Escherichia coli</i>	<i>csgA, csgD, proU</i>	curli-szintézis és szabályozás, stresszválasz	AI-2 [117,118]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>wbbM, wzm, luxS</i>	lipopoliszacharid szintézis, QS szabályozás	AI-2 [119,120]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>gap, DnaK, KAT, PlnD</i>	adhézió, stresszválasz, bacteriocin termelés	AI-2, plantaricin [100,121,122]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>algC, rhlA,B, lasI,R</i>	alginát és ramnolipid szintézis, QS szabályozás	C4-, C12-homoszerin-laktonok [106,123,124]
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>icaADBC, luxS</i>	adhéziós poliszacharid termelés, QS szabályozás	AI-peptid [125]
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>gtf, gbp, comC,D,E,X</i>	exopoliszacharid-szintézis, QS szabályozás	AI-2, CS-peptid [126,127]
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>vps, luxS</i>	exopoliszacharid-szintézis, QS szabályozás	CAI-1, AI-2 [128]
<i>Aspergillus niger</i>	<i>brlA</i>	konídium termelés	farnezol [129]
<i>Candida albicans</i>	<i>ALS1, ALS3, Rfa2</i>	adhéziós glikoprotein-, és hifatermelés	farnezol, tirozol [103,130,131]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Flo11</i>	filamentszintézis	feniletanol, triptofol [104,132]

Az EPS-ek közül legnagyobb mennyiségben jelenlévő exopoliszacharidokat a biofilmet alkotó mikroorganizmusok fehérjeapparátusa szintetizálja. Legtöbbjük nagy molekulatömegű (több megadaltonos), lineáris vagy elágazó homo-, vagy heteropoliszacharid, amik semleges, illetve töltött cukoregységeket egyaránt tartalmaznak, ezáltal változatos kölcsönhatásokat képesek kialakítani [133]. Az orális biofilmeket képező *Streptococcus* nemzetség tagjai szacharózból glükán és fruktán homopoliszacharidokat, míg a *Pseudomonas* biofilmek diverz egységeket tartalmazó alginát, glükóz (Pel) és glükóz-mannóz-ramnóz (Psl) polimereket építenek [134–136]. Szerkezetükhöz hasonlóan funkciójuk is sokrétű; segítik a sejtek egymáshoz és felülethez kötődését, mechanikai stabilitást adnak a biofilmnek, erősen vízmegtartóak és éhinség idején tápanyag forrásként szolgálhatnak [133].

A biofilm mátrix jelentős mennyiségben tartalmaz extracelluláris fehérjéket, amik közül kiemelendők a makromolekulákat felépítő polimerázok, szintetázok, transzferázok és a lebontásra képes enzimek. A biopolimerek hidrolízisével nem csak szén-, és energiaforráshoz juthatnak a sejtek, hanem a mátrix szerkezetének megbontásával előidézhető a biofilmalkotó sejtek leválása és szétszóródása [133]. Fenntarthatósági és ipari szempontból nagy fontossággal bírnak a szintetikus polimereket biodegradáló enzimek [137], valamint a szulfát-redukáló és vas(II)-oxidáló mikrobák által termelt korrozív redoxi-enzimek [138,139]. A nem-enzimatis fehérjék kulcsszerepet játszanak a biofilmek szerkezetének kialakításában és megtartásában. Ezeknek a sejt felszíni vagy szekretált fehérjéknek a liganduma a biofilmben található valamely hosszabb extracelluláris polimer, így ezek a fehérjék összekötő, csomópont elemekként funkcionálnak [133].

Az extracelluláris DNS-ekről kimutatták, hogy a humán patogén *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* törzsek biofilm mátrixát eltérő mértékben alkotják [140–142], továbbá előfordulnak szignifikáns mennyiségben szennyvizek biofilmjében [143]. Szerkezetük a termelő törzstől függően változhat; *P. aeruginosa* biofilmekben jellemző a rácyszerű elrendeződés [144], míg a nem tipizálható *Haemophilus influenzae* biofilmjét gracilis, lazaszövésű és vaskos DNS-szálak együtt alkotják [145]. Szerepüket tekintve elsődleges a sejt-aggregáló hatás, ezzel nagy stabilitást adva a biofilmeknek, amit nukleázok megbonthatnak [146]. Külön érdekes ezen alkotók forrásának kérdése; egyes baktériumok extracelluláris és genomiális DNS-ének összehasonlítása azt mutatta, hogy ezek a nukleinsavak megegyezhetnek egymással, de vannak határozott különbségek, ami arra utal, hogy a sejt lízisen túl egyéb fajspecifikus alternatív utak is közre játszhatnak ezen DNS-ek kiválasztásában [133,147,148].

A biofilmet építő mikroorganizmusok komoly erőforrásokat fordítanak arra, hogy kialakítsák és fenntartsák ezt a különleges létformát. A kialakított ideális mikro környezetben biztosítottak a kolonizációhoz szükséges kedvező feltételek, továbbá a szimbiózisban élő heterogén kultúrák horizontális géntranszfer által kölcsönös evolúciós előnyökhöz juttathatják egymást [102,149]. Elszigeteltségük a környezettől elsősorban védelmet nyújt a változó környezeti hatásokkal, immunsejtekkel és az antimikrobiális ágensekkel szemben, aminek egyik legjelentősebb következménye a

humán szervezetből nehezen eliminálható fertőzések megjelenése, mi több a kórokozó törzsek antibiotikum rezisztenssé válása (5. táblázat).

5. táblázat: Biofilmképző mikroorganizmusokhoz köthető humán megbetegedések [150] alapján (MDR: multidrog-rezisztenciára hajlamos törzs).

Fajok	Kapcsolódó betegségek
<i>Acinetobacter baumannii</i>	nozokomiális pneumonia, meningitis, sepsis (MDR)
<i>Candida albicans</i>	orális, bőrfelszíni, vaginális candidiasis
<i>Escherichia coli</i>	nozokómiás húgyúti fertőzések, enteritis, prostatitis (MDR)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	bakteriális vaginosis
<i>Haemophilus influenzae</i>	pharyngitis, laryngitis, otitis media (MDR)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	nozokómiás húgyúti fertőzések, pneumonia (MDR)
<i>Legionella pneumophila</i>	legionellosis (légúti fertőzés)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	krónikus sebfertőzés, nozokómiás pneumonia, sepsis (MDR)
<i>Salmonella enterica</i>	salmonellosis (gasztrointesztinális fertőzés)
<i>Staphylococcus aureus</i>	protézis-, sebfertőzés, sinusitis, endocarditis, mastitis (MDR)
<i>Streptococcus mutans</i>	caries, bacteraemia, endocarditis, stroke
<i>Vibrio cholerae</i>	kolera (gasztrointesztinális fertőzés)

Összefoglalva, a biofilmek sejtek és azok extracelluláris makromolekuláinak komplex halmaza, ami számos mikroorganizmusnak széles körben elterjedt életformája. A hálózatos rendszer kiépülését környezeti hatások és a sejtek közötti kommunikáció, a *quorum sensing* szabályozzák. A védett miliót kialakító populációk jobban tolerálják a változó körülményeket, így rezisztenssé válhatnak, ami komoly kockázatokat rejthet magában.

1.2.2. *Streptococcus mutans* és virulencia faktorai

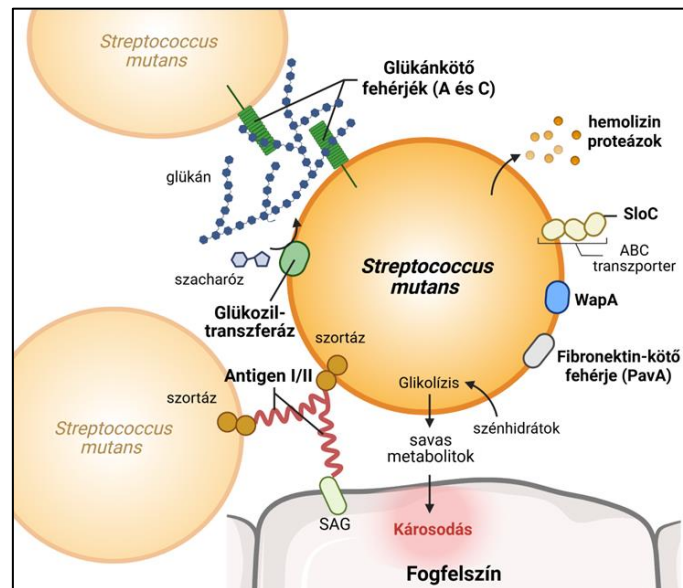
Az egészséges humán szervezetet több száz különböző mikroba faj kolonizálja, amiket együttesen humán mikrobiomnak nevezünk. A főbb kolonizált területeink a bőr, az orr-, és szájüreg, a respiratorikus és gasztrointesztinális traktus, valamint az urogenitális rendszer. A Humán Genom Projekt [151,152] mintájára 2007-ben életre hívott Humán Mikrobiom Projekt célja, hogy korszerű molekuláris biológiai és bioinformatikai eljárások segítségével azonosításra és hozzáférhető adatbázisba kerüljön a bennünk élő valamennyi mikroorganizmus teljes genetikai állománya. Az adatok alapul

szolgálhatnak jövőbeni metagenomikai kutatásoknak, amik által megérthetjük, hogy hogyan járulnak hozzá ezek a mikroba törzsek az egyén normál fiziológiájához és a betegségekre való hajlamához [153,154].

A *Streptococcus mutans* fakultatív anaerob, Gram-pozitív baktérium, amely az emberi szájüreg normálflórájának egyik fő biofilmképző tagja. Habár zömében kommenzalista, patogenitásának érvényesülésekor már parazita alkotójává válik az orális mikrobiomnak. A *S. mutans*-t tekintik a fogszuvasodás elsődleges kórokozójának, mivel a fogak felszínén megjelenő plakkokból minden esetben kimutatható [155]. A plakkokban más savas fermentációt végző mikrobák is megjelenhetnek, amik anyagcseretermékeik révén demineralizálják a fogzománc szeretlen komponenseit, ezáltal felemésztik a fogszerkezetet és fogíny-, illetve foggyökérhártya-gyulladásához, végső soron akár maradandó fogvesztéshez vezethetnek. A fogászati implantátumok környezetében kialakuló gyulladásokért főleg más törzseket tettek felelőssé [156–158]. Friss kutatásokban összefüggést találtak az agyi érkatasztrófában (*ischemic stroke*) szenvedő betegek szájhygiéniája és a betegség prognózisa között, ami új utat jelenthet e neurológiai betegség prevenciójában és a betegséggel élők rehabilitációjának hatékonyságában [159,160].

A *Streptococcus*-ok virulenciáját elősegítik a sejt felszínhez kötött és szekretált virulencia faktorok, a metabolitokból eredő acidogenitás, a savtűrő képesség és a biofilmképzésre való hajlam. Felülethez kötődése két módon történhet: szacharóz-függő vagy szacharóz-független módon. Szacharóz hiányában a bakteriális szortáz által sejtalba horgonyzott *Streptococcal protein antigen P* (SpaP, vagy más néven: Antigen I/II) a nyálban található agglutininhez (SAG) kötődik, ami a sejtek aggregációjához vezet, így megindulhat a biofilm korai érése [161]. Szacharóz jelenlétében a szintén sejt felszíni glükozil-transzferázok (Gtf) a diszacharidból változatos glükóz-polimereket, azaz glükánokat gyártanak, amik hidat képeznek a baktériumsejtek között. A glükánkötő fehérjék (Gbp) enzimaktivitással részben nem rendelkező glükán-receptorok, amik megkötik a termelt homopoliszacharidot (5. ábra). Érdekesség, hogy bár a *S. mutans* genomanalízise alapján – a Gram-pozitív törzsekre nem jellemző módon – képes metabolizálni legalább tizenötféle különböző cukorforrást, glükántermelést csak szacharóztartalmú tápoldatban végez. További adhezinjei még a sejt fal-asszociált protein A (WapA), a fibronektin-kötő protein (PavA) és a kétértékű kation-transzporter

lipoprotein (SloC), aminek szerepe van a bakteriális szívbelhártya-gyulladás (*endocarditis*) kialakulásában [162–164].



5. ábra: A *Streptococcus mutans* főbb virulencia faktorai [163] alapján.

1.2.3. A glükánkötő fehérjecsalád

A *S. mutans* biofilmképzésének vizsgálataihoz nélkülözhetetlen volt az az úttörő megfigyelés, ami szerint a szacharóztartalmú tápoldatban növesztett tokképző *Streptococcus mutans* GS 5 humán izolátuma gélszerű masszaként tapadt a tenyésztő edény falához. Ugyanez a törzs drasztikus károkat okozott patkány modellen végzett kísérletekben, így hamar relációba hozták az extracelluláris tokanyag jelentőségét a kariogén betegséggel [165]. Ma már tudjuk, hogy a *Streptococcus*-ok extracelluláris polimer alkotói közül, a glükán és a glükánkötő fehérjék kapcsolata sarokköve biofilmképzésüknek.

Az első glükánkötő fehérje (GbpA) izolálása egyetlen egy SDS-poliakrilamid gélt bemutató cikkben került publikálásra 1979-ben. A kísérletek tanúsága szerint a különböző dextrán-összetételű kromatográfiás oszlopokról nyert frakciók fehérjei affinitást mutattak azok töltete iránt, mielőtt 10 kDa-os dextránnal eluálódtak. Az oszlopok típusa és az alkalmazott kontrollok alapján megállapítható volt, hogy a fehérje inkább az α -1,6-glikozidos kötések tartalmazó szakaszokhoz kötődik, mint az α -1,3-glikozidoshoz [166]. A *gbpA* gén Sanger-szekvenálása után meghatározták a fehérje pontos méretét és aminosav sorrendjét, így a fehérje glükánkötő régióját tudták azonosítani [167]. A gén

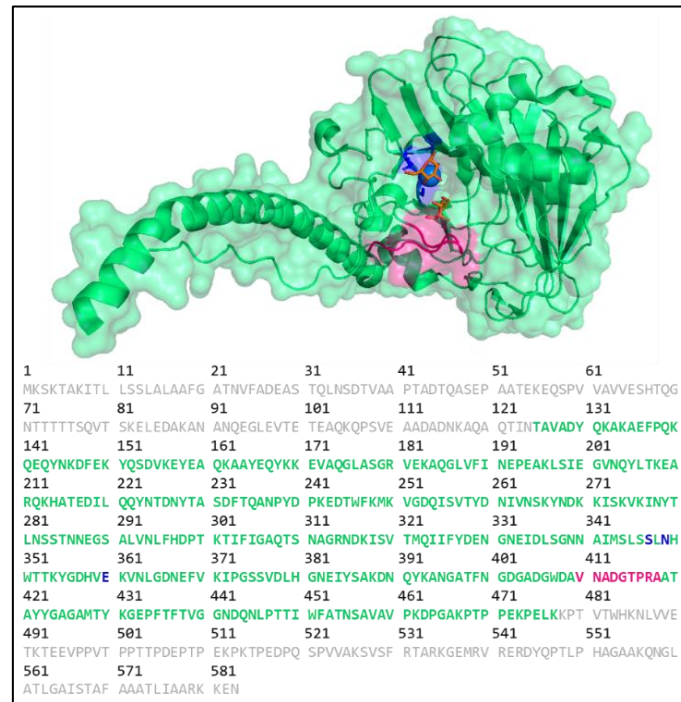
inaktiválásával a képződő biofilm morfológiája megváltozott, amit a törzs egyéb virulencia faktorai kompenzáltak [168,169].

Jó pár évvel később, 1994-ben izolálták a második glükánkötő fehérjét (GbpB). Génje a baktériumsejt számára esszenciálisnak bizonyult, ugyanis az egy peptidoglikán-hidrolázt kódol, amely fehérje a sejtfal szintézisében játszhat szerepet és glükánkötése segíti a sejtközeli elhelyezkedést. Deléciós mutánsai épp ezért instabilak, így funkcióját nehéz vizsgálni [126,170,171].

Ellentétben a GbpA és GbpB felfedezésével – amiket affinitás kromatográfiával izoláltak először –, a GbpC-t random mutagenézises kísérletekben azonosították 1997-ben [126,172]. A deléciós mutáns elvesztette dextrán-függő aggregációs tulajdonságát, így a fenotípust okozó feltételezett *gbcC* gént tudták genotipizálni, és a génterméket jellemezni. A kapott aminosav szekvencia eltért a korábban azonosított fehérjékétől, továbbá a glükózil-transzferázok glükánkötő doménjával sem volt közös szakasza. Azonban a *Streptococcus*-ok Spa-fehérjecsaldájának egyes tagjával, például a glükánt nem kötő Antigen I/II-vel már mutatott szekvenciális hasonlóságot [172]. Közös vonásaik közt szerepel, hogy mindkettő rendelkezik sejtfalba horgonyzódó régióval, amit a LPXTG aminosav motívumon keresztül a bakteriális szortáz helyez el [173]. A *gbcC* gén expressziós szabályozásának vizsgálata rávilágított arra is, hogy a transzkripciós regulátort kódoló *tarC* knock-out mutánsokban megnövekedett a glükózil-transzferáz S, valamint a glükánkötő fehérje C expresszió. Ez alapján a TarC negatív transzkripciós regulátorként funkcionál, és potenciális célpontként szolgálhat a kariogén baktérium expressziójának szabályozásában [174]. Az egyes glükánkötő fehérjék funkcióját célzó tanulmányokból kiderült még az is, hogy a *gbcAC* és *gbcACD* hiányos *S. mutans* mutánsok esetén szignifikánsan csökkent a törzsek kariogenitása, ami vélhetően a fehérjék biofilm-szerkezetváltozásra gyakorolt hatásával magyarázható, ezenfelül rámutat a glükánkötő fehérjék terápiás célpontként történő alkalmazhatóságára [175,176]. 2018-as publikálása óta elérhető a GbpC kísérletes úton meghatározott nagyfelbontású (1.14 Å, PDB: [6CAM](#)) kristályszerkezete (6. ábra), ami alapján igazolható, hogy mely szerkezeti régiók mutatnak hasonlóságot az Antigen I/II-vel. Ilyen például az az esszenciális nonapeptid hurokstruktúra, ami segíti a glükán fehérjéhez kötését, ezáltal a GbpC-közvetített biofilmképződést. Mindemelett bizonyítást nyert a GbpC-nek a

szacharóz-független aggregációban betöltött szerepe is, és a kalciumion fontossága valamennyi kölcsönhatás kialakulásában [177].

A *S. mutans* UA159 törzs genomanalízise nyomán 2004-ben azonosították a GbpD-t, ami a GbpA-hoz hasonló aminosav-ismétlődéseket tartalmaz és nagy affinitású glükánkötése mellett lipáz aktivitást is mutatott. A fehérje ezen tulajdonsága a biofilmet építő fajok közötti kompetíciós előnyhöz járulhat hozzá [176,178].



6. ábra: A *Streptococcus mutans* glükánkötő fehérje C (GbpC) szerkezete. A röntgenkristallográfiás térszerkezetben megfigyelhető a flexibilis hurokstruktúra (magenta), amint a monoszacharidokat (narancs) a glükánkötő zsebbe segíti, amiben a fehérje (zöld) kalciumion (kék) kofaktora is található [177] alapján.

1.2.4. Biofilmképződést gátló törekvések

A mikrobiális biofilmeknek számos egészségügyi, környezeti, vagy akár ipari szempontból káros következménye ismert, amelyek leküzdésére standard kezelést ez idáig nem fejlesztettek ki. A terápiák kidolgozását nehezítik a struktúrák és a szabályozási mechanizmusok sokszínűsége, amit tovább bonyolítanak a heterogén multikultúrákban létrejövő túlélési stratégiák, a rezisztenciák egyre gyorsabb terjedése. E problémák megoldása lehet különféle célpontokon specifikusan ható molekulák azonosítása, amelyek befolyásolják az épülő biofilm képződését vagy annak szerkezetét.

Egyes édesítőszeresek – úgymint a szacharin, ciklamát, aceszulkám-K, stevia – terápiás potenciált mutattak patogén törzsek ellen. Jelenlétükben a baktériumok növekedési kinetikája szignifikánsan visszaesett, továbbá a biofilmképzéshez szükséges gének expressziója, a sejtek morfológiája és a mikrobiom összetétele drasztikusan megváltozott [179–181]. Ezek a megfigyelések a cukorpótlók napi fogyasztásának újragondolását vetik fel. Szintetikus peptidok ugyancsak biofilmellenes hatást mutattak *Staphylococcus aureus* törzs ellen. A tarantula-eredetű peptidok planktonikus sejteken túl biofilmet alkotó sejteken is letálisnak bizonyultak. A hatás vélhetően a peptid ciklizálással és diszulfid-hidak létrehozásával elért proteáz-rezisztenciának és így a biofilmstruktúrába történő penetrálás utáni sejtfalröncsolásnak tudható be [182,183]. Léteznek természetes védőmechanizmusok is, amelyek mérséklék a *Streptococcus mutans* szacharóz-független kitapadását és a biofilmképződés megindulását. Ilyen a nyálban található humán szekretoros IgA kötődése a bakteriális Antigen I/II-höz [184]. Egyes *Staphylococcus aureus* virulencia faktorok ellen fejlesztett monoklonális antitesteket már klinikai fázisokban tesztelnek, változó sikerrel [185]. Alig néhány bakteriosztatikus aptamer fejlesztését írták le a mai napig, amelyek teljes sejtre történt szelekciójuk miatt ismeretlen célponton keresztül tudják csökkenteni a biofilmalakulást [186–189]. Valamelyest specifikusabb biofilmgátlást tesznek lehetővé a C4-HSL *quorum sensing*-molekulára, a SipA-, és a PBP2a-fehérjékre szelektált aptamerek [190–192].

A mindennapi ápolói, orvosi és fogorvosi gyakorlatban egyaránt található mérsékelt számban olyan eszközök és eljárások, amelyek a biofilmképződést megelőzni, kialakulása esetén azt eliminálni igyekeznek. Problémát okozhatnak mind prehospitalis sérültek, mind hosszú távon hospitalizált, mozgásszegény páciensek testfelületén a fertőzött sebek, nyomási fekélyek (*decubitus*) megjelenése, amiket modern ezüsttartalmú kötszerekkel, illetve ezüst-kolloid alapú gélekkel tudnak kezelni [193–196]. Az invazív beavatkozást igénylő orvosi eszközök (katéterek, tubusok, szívbillentyűk, protézisek) felületét törekszenek mikrobiális tapadást mérséklő anyagokból készíteni, illetve azokat biofilm-preventív ágensekkel bevonni [197–202]. Új keletű profilaktikus módszer továbbá a fogorvosi ellátás során a vezérelt biofilm terápia (*Guided Biofilm Therapy*), aminek lényege, hogy a dentális plakkokat biofilmfestést követően nagy nyomású szuszpenzió-befúvásos (*air-flow*) rendszerrel eltávolítják, ezzel megelőzve a fogszuvasodáshoz és fogágybetegségekhez vezető folyamatokat [203,204].

2. Célkitűzések

A dolgozatom témáját érintő szakirodalom tanulmányozása alapján megállapítottam, hogy a biofilmek összetett szerkezete és működése jelentős egészségügyi következményekkel is járhatnak, amiknek hatékony leküzdéséhez, mi több, megelőzéséhez jelenleg korlátozott számú eszközzel rendelkezünk. A patogén mikroorganizmusok által termelt biofilm minimalizálásának egy lehetséges stratégiája, ha egy jóldefiniált építőelemén keresztül, specifikusan célozzuk a biofilm architektúrát. Az aptamerek tulajdonságaikból adódóan bizonyítottan alkalmasak célmolekulák specifikus felismerésére és azok aktivitásának gátlására, így potenciális biofilm inhibitoroként is használhatóak.

Munkám során elsődleges célként tűztük ki olyan DNS aptamerek előállítását és vizsgálatát, amelyek alkalmasak lehetnek a *Streptococcus mutans* glükánkötő fehérje C (GbpC)-hez kötődve a biofilmképződést specifikusan gátolni. Ehhez a következő lépések megvalósítását tartottuk szükségesnek:

1. Az aptamerszelekcióhoz, majd az azt követő kölcsönhatás vizsgálati mérésekhez szükséges rekombináns GbpC, valamint Antigen I/II célmolekulák molekuláris klónozás útján történő előállítása prokarióta sejt rendszerben, és az azt követő izolálásuk affinitás kromatográfiás módszerrel.
2. Az izolált rekombináns GbpC célfehérje stabilitásának és glükánkötésének vizsgálata a majdani szelekciós körülmények között.
3. A GbpC-specifikus DNS aptamerek szelekciójának elvégzése az Antigen I/II szerkezetanalóg fehérje és GbpC-hiányos *S. mutans* mutáns sejtek ellen végzett kontraszelekciós lépések közbeiktatásával.
4. A GbpC-re szelektált aptamerjelöltek előállítása továbbfejlesztett primer blokkolt aszimmetrikus PCR-rel, majd az aptamerek karakterizálása kísérletes és predikciós módszerekkel.
5. Végül a karakterizált aptamerek funkcionális tesztelése biofilmgátló kísérletekben.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. Oldatok, pufferek, vegyszerek

- 1x ASB (*artificial saliva buffer*) +mucin (Pickering)
- 1x TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0)
- 1,0 N nátronlúg
- 1,0 N sósav
- 10%-os APS (ammónium-perszulfát; 0,5 g/5 ml)
- 10x Laemmli puffer (0,25 M Tris, 1,92 M glicin, 1% SDS, pH=8,4-8,9; Serva)
- 10x PBS (*phosphate buffered saline*: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 20 mM KH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄·2H₂O, pH=7,4)
- 10 mM CleanAmp dNTP mix (TriLink)
- 10 mg/ml kanamicin-szulfát oldat (Gibco)
- 10000x GelGreen, GelRed (Biotium)
- 2-butanol (Reanal)
- 40%-os akrilamid (akrilamid:biszakrilamid = 29:1 DNS-hez, Sigma)
- 40%-os akrilamid (akrilamid:biszakrilamid = 37,5:1 fehérjéhez, Sigma)
- 5x SDS-DTT puffer (0,25% brómfenolkék, 50% glicerin, 0,25 M Tris pH=6,8; 0,5 M ditiotritol, 10% nátrium-dodecil-szulfát)
- 5x TBE puffer (1 L-ben: 54 g Tris, 27,5 g bórsav, 20 ml 0,5 M EDTA, pH=8,2)
- 50x TAE puffer (500 ml-ben: 121g Tris, 28,5ml ecetsav, 50ml 500 mM EDTA, pH=8,3)
- 6x Loading Dye (Thermo)
- Abszolút etanol (Molar Chemicals Kft.)
- Abszolút metanol (Molar Chemicals Kft.)
- Agaróz (Lonza, SeaKem LE)
- Bactoagar (BD)
- BHI (*brain-heart infusion*) por (Jena Bioscience)
- Biotin-dextrán (Thermo)
- Brómfenolkék (Sigma)
- BSA (*bovine serum albumin*) (Sigma)
- Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva)

- Coomassie Blue festőoldat (1 L-ben: 50 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 100 ml etanol, 0,2 g CBB, 23,5 ml foszforsav)
- Coomassie Blue festékmentesítő oldat (1 L-ben: 100 ml etanol, 23,5 ml foszforsav)
- Dextrán-szulfát nátrium sója ($M_{\text{átlagos}} = 5$ kDa, Sigma)
- DTT (ditiotreitól) (Sigma)
- DMSO (dimetil-szulfoxid) (Sigma)
- EDTA (etilén-diamin-tetraacetát) (Sigma)
- Elválasztó gél puffer (100 ml 1,5 M Tris pH= 8,8 + 3,846 ml 10%-os SDS)
- Élesztőkivonat (VWR)
- FITC (fluoreszcein-izotiocianát)-dextrán (Sigma)
- Fruktóz (Sigma)
- Glükóz (Molar Chemicals Kft.)
- Imidazol (Sigma)
- Kalcium-klorid (Molar Chemicals Kft.)
- Kristályibolya (Sigma)
- Lazacsperma DNS (*Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes*, Sigma)
- LB (Luria-Bertani) agar por (Sigma)
- Nátrium-dihidrogénfoszfát-dihidrát (Molar Chemicals Kft.)
- Nátrium-dodecil-szulfát (*sodium dodecyl sulfate*, Millipore)
- Nátrium-hipoklorit (Hip-Tom Kft.)
- Nátrium-hidroxid (Molar Chemicals Kft.)
- Nukleázmentes ultratiszta víz (Thermo)
- pH-Pufferlösungsung (standard pH kalibráló oldatok, Mettler Toledo GmbH)
- Protease Inhibitor Cocktail for Histidine-tagged Proteins (Sigma)
- ProClin300 (Sigma)
- PVDF (polivinilidén-difluorid) membrán (Millipore, Immobilon-FL)
- Szacharóz (Molar Chemicals Kft.)
- Szűrőpapír (Bio-Rad)
- TEMED (tetrametil-etilén-diamin) (Sigma)
- Tömörítő gél puffer (100 ml 1 M Tris pH= 6,8 + 7,692 ml 10%-os SDS)
- Tripton (Sigma)
- Tris (trisz-(hidroximetil)-amino-metán) (Sigma-Aldrich)

- Tween-20 (Thermo)
- Western blot-hoz:
 - Transzferáló puffer: 1 L-ben: 0,84 g NaHCO₃, 0,318 g Na₂CO₃, 10% metanol
 - Blokkoló puffer: Intercept® (TBS) Blocking Buffer (LI-COR)
 - Antitestek:
 - Elsődleges monoklonális anti-polihisztidin egérből (Sigma, H1029)
 - Másodlagos poliklonális anti-egér IgG kecskéből (LI-COR, IRDye 680RD)
 - Mosó puffer: 1xTBS +0,1% Tween-20

3.1.2. Affinitás kromatográfiás gyöngyök és puffereik

- PureCube Ni-INDIGO MagBeads (Cube Biotech)
 - Lysis Buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0
 - Washing Buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazol, pH 8.0
 - Elution Buffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8.0
- Dynabeads M-270 Streptavidin (Thermo)
 - B&W Buffer (2x): 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl

3.1.3. Oligonukleotidok

6. táblázat: Felhasznált oligonukleotidok szekvenciái

Elnevezés	Szekvencia (5' → 3')	Gyártó
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	Thermo
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Thermo
cPCR forward primer (193)	AAACGACGGCCAGTGAATTG	Eurofins
cPCR reverz primer (194)	TTATGCTTCCGGCTCGTATG	Eurofins
DNS aptamer könyvtár (SEL13)	AGATACCAATACGCTGCC-(N40)-GCCACTGGTAACGACATC	Sigma
Lib13 forward primer (257)	AGATACCAATACGCTGCC	Eurofins
Lib13 forward primer (258)	5'-Biotin-(TEG)-AGATACCAATACGCTGCC	Eurofins
Lib13 reverz primer (260)	GATGTCGTTACCAGTGGC	Eurofins

Lib13 reverz primer (261)	5'-Biotin-(TEG)-GATGTCGTTACCAGTGGC	Eurofins
Lib13 reverz primer (263)	GATGTCGTTACCAGTGGC-(Foszfát)-3'	Eurofins
Lib13 reverz komplementer (264)	GCCACTGGTAACGACATC	Eurofins
Szintetizált aptamerek (5' → 3')		
A30	AGATACCAATACGCTGCC- TTCTTGAAAAAGGGTAGCGCAGGCCGCTAATGACATAACT- GCCACTGGTAACGACATC	Eurofins
A39	AGATACCAATACGCTGCC- TAGCCCCTACCCTGTTGCTCCCCCTCGCCCCCTCTCACCCC- GCCACTGGTAACGACATC	Eurofins
A65	AGATACCAATACGCTGCC- TTTCCAATTACGCCATGCATCACCCCTAAAATCTGAATAC- GCCACTGGTAACGACATC	Eurofins
A96	AGATACCAATACGCTGCC- CCGCCGGTCCCGAGCTACAACACTTTACGCCCCCTCCCC- GCCACTGGTAACGACATC	Eurofins
A58	AGATACCAATACGCTGCC- ATACCCACCCATCACCGAGTCGACACTCACCTAACAGCCG- GCCACTGGTAACGACATC	Eurofins
A39 rövid	TAGCCCCTACCCTGTTGCTCCCCCTCGCCCCCTCTCACCCC	Eurofins
A96 rövid	CCGCCGGTCCCGAGCTACAACACTTTACGCCCCCTCCCC	Eurofins

3.1.4. Molekulaméret markerek

- GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo): 700, 500, 400, **300**, 200, 150, **100**, 75, 50, 25 bp
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo): 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 bp
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo): 180, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15, **10** kDa

3.1.5. Táploldatok, táptalajok

- LB táploldat: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, desztillált víz

- LB táptalaj: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 2% agar, desztillált víz
- SOC tápoldat: 2% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz, desztillált víz
- MDG tápoldat: 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,5% glükóz, 0,25% aszpartát, 0,2x nyomelemek, desztillált víz
- ZYM-5052 tápoldat: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,5% glicerin, 0,05% glükóz, 0,2x nyomelemek, 0,2% laktóz, desztillált víz
- BHI tápoldat: 37g/L BHI por, desztillált víz
- BHI táptalaj: 37g/L BHI por, 2% Bactoagar, desztillált víz

3.1.6. Bakteriális sejtek

- XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent)
- α -Select Chemically Competent Cells (Bioline)
- BL21(DE3) Competent *E. coli* (NEB)
- *Streptococcus mutans* UA130 (University of Iowa)
- *Streptococcus mutans* Δ GbpC [177]

3.1.7. Enzimek és reagenskészletek

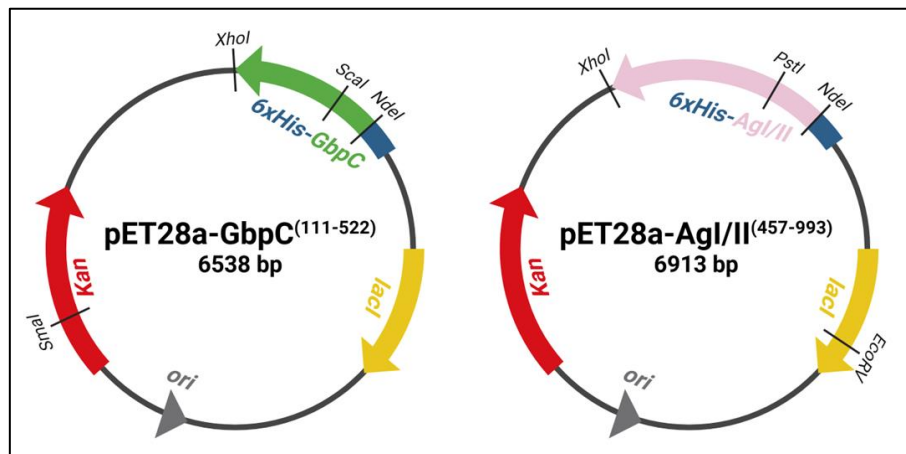
- FastDigest RE (*EcoRV*, *NdeI*, *PstI*, *ScaI*, *SmaI*, *XhoI*) + 10x FD Buffer (Thermo)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase + 10x Buffer (Fermentas)
- T4 DNA Ligase + 10x T4 DNA Ligase Buffer (Thermo)
- 2x PCR BIO Taq Mix (PCR Biosystems)
- Lysozyme (Sigma)
- KOD XL DNA Polymerase + 10x Buffer + dNTPs (2 mM each) (Merck)
- iProof High-Fidelity PCR Kit (Bio-Rad)
- 2x qPCR BIO SyGreen Mix Lo-ROX (PCR Biosystems)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel)
- QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen)
- NucleoBond Xtra Midi (Plus) Kit (Macherey-Nagel)
- GloMelt Thermal Shift Protein Stability Kit (Biotium)

- AlphaScreen Histidine (Nickel Chelate) Detection Kit (PerkinElmer/Revvity)
- Micellula DNA Emulsion & Purification Kit (EURx)
- Oligo Clean & Concentrator Kit (Zymo Research)
- Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)
- LabChip HT DNA 1K Reagent Kit + DNA Assay Chip (PerkinElmer/Revvity)

3.2. GbpC és AgI/II rekombináns fehérjék előállítása

3.2.1. Molekuláris klónozás

A választott célfehérjék géneit kódoló plazmid konstrukciókat klasszikus klónozási technikával, restrikciós endonukleázok segítségével hoztuk létre. A génfragmenteket a GbpC szerkezetét leíró tanulmány [177] alapján úgy terveztük meg, hogy a sejtfelszíni fehérjéknek az extracelluláris szakasza ([Q8DTF1](#) alapján GbpC¹¹¹⁻⁵²² és [P23504](#) alapján AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³), N-terminális 6xHis-jelöléssel és trombin hasítóhellyel kerüljön kifejeződésre (7. ábra). Ehhez kémiaailag megszintetizáltattuk a génfragmenteket tartalmazó pUCIDT-Amp (IDT) donor plazmidokat, majd PCR segítségével felsokszorozítottuk az expressziós pET-28a (Novagen) recipiens plazmidba beilleszteni kívánt DNS szakaszokat. Ezután mind az expressziós vektort, mind a PCR terméket *NdeI* és *XhoI* restrikciós endonukleázokkal kezeltük, majd az emésztett fragmenteket agarózgélből történő izolálást követően T4 DNS ligázzal egyesítettük (7. táblázat).



7. ábra: A GbpC és Antigen I/II fehérje fragmenteket kódoló plazmidok térképei. A fontosabb funkcionális szakaszok: N-terminális 6xHis-címkével rendelkező rekombináns fehérjét kódoló szekvencia, lac-represszor gén (*lacI*, sárga), replikációs origó (*ori*, szürke), kanamicin rezisztencia gén (*Kan*, piros) és az alkalmazott restrikciós endonukleázok hasítási pozíciói.

A ligálódott konstrukciókkal XL10-Gold kémiai kompetens *E. coli* sejteket transzformáltunk. Az 50 µl fagyott sejtsuszpenziót 15 perc alatt jégen felolvasztottuk és ehhez 5 µl ligátumot adtunk, majd a keveréket 20 percig jégen inkubáltuk. A kompetens sejteket 42°C-ra melegített asztali termosztátban pontosan 1 percig tettük ki hősokknak, amit 3 perces jégen regenerálás, majd 500 µl steril SOC tápoldat hozzáadásával további 60 perc 37°C-on történő 220 rpm-es rázatás követett. A transzformált sejteket kanamicint tartalmazó LB-agar táptalajra szélesztettük, hogy ezzel pozitívan szelektáljuk a pET-28a plazmidot felvett és a rezisztencia gént kifejező kolóniákat. Az agar lemezeket 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

7. táblázat: Molekuláris klónozási reakciók.

7/a: Génfragmentek amplifikációja	
<u>Reakcióelegy</u>	<u>PCR program</u>
10 µl 5x iProof HF puffer	1. 98°C, 3 min
1,236 µl 0,1 µg/µl M13F primer	2. 98°C, 10 sec
1,302 µl 0,1 µg/µl M13R primer	3. 51°C, 10 sec
2,0 µl 10 mM CleanAmp dNTP	4. 72°C, 20 sec
0,5 µl iProof (<i>Pfu</i>) polimeráz	5. 2-4. lépések ismétlése 34x
1,0 µl templát DNS	6. 72°C, 3 min
33,9 µl nukleázmentes víz	7. 4°C, ∞
Végtérfogat: 50 µl	
7/b: Emésztés restrikciós endonukleázokkal	
<u>pET-28a plazmid emésztése</u>	<u>Inszert emésztése</u>
3000 ng tisztított vektor	30 µl PCR termék
6,0 µl 10x FastDigest puffer	6,0 µl 10x FastDigest puffer
3,0 µl FastDigest <i>NdeI</i> enzim	3,0 µl FastDigest <i>NdeI</i> enzim
3,0 µl FastDigest <i>XhoI</i> enzim	3,0 µl FastDigest <i>XhoI</i> enzim
3,0 µl Fast AP foszfatáz enzim	18 µl nukleázmentes víz
Kiegészítve nukleázmentes vízzel	
Végtérfogat: 60 µl	Végtérfogat: 60 µl
Inkubálás: 37°C, 2 h	Inkubálás: 37°C, 2 h
Inaktiválás: 80°C, 5 min	Inaktiválás: 80°C, 5 min

7/c: Ligálási reakció	
Számítási képlet	Reakcióelegy
$m(\text{Inszer}) =$	2,65 µl emésztett, tisztított vektor
$\frac{\text{Vektor}(100 \text{ ng}) \cdot \text{Inszer}(1247 \text{ bp})}{\text{Vektor}(5289 \text{ bp})}$	2,16 µl emésztett, tisztított inszer
$\cdot \frac{\text{Inszer}(3 \text{ mol})}{\text{Vektor}(1 \text{ mol})} = 70,7 \text{ ng}$	2,0 µl 10x T4 ligálási puffer
	0,4 µl T4 DNS ligáz enzim
	12,8 µl nukleázmentes víz
	Végtérfogat: 20 µl
	Inkubálás: 25°C, 15 min
	Inaktiválás: 65°C, 10 min

3.2.2. Plazmid konstrukciók ellenőrzése

Az LB-agar lemezeken megjelenő baktériumtelepek a kanamicin elleni rezisztenciára, vagyis a sikeres transzformálásra utalnak, azonban a klónozást, esetleges mutációk megjelenését további módszerekkel minden esetben szükséges ellenőrizni.

A tervezett génfragmentek méreteit ismerve ([Q8DTF1](#) alapján GbpC: 1254 bp és [P23504](#) alapján AgI/II: 1629 bp) és pET-28a specifikus primerek segítségével igazolható a célfehérjét kódoló, beillesztett DNS szakasz jelenléte a plazmidban. Ehhez kolónia-PCR-t állítottunk össze (8/a. táblázat) és a reakció termékeit 1xTAE-val készített 1%-os agarózgélben választottuk el és GelGreen-es festés után GelDoc (Bio-Rad) készülékkel detektáltuk. A megfelelő méretű termékeket adó kolóniákat plazmidtisztításhoz készítettük elő.

A nagyobb mennyiségű plazmidizoláláshoz 1-1 különálló, az előbbieket szerint igazolt baktériumkolóniát oltottunk be 50 µg/ml kanamicinnel kiegészített 100 ml LB tápoldatba. A tápoldatokat 37°C-on, 220 rpm-es rázatással inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap a baktériumok begyűjtését követően a gyártói utasítások szerint plazmidot izoláltunk és annak DNS koncentrációját spektrofotometriás méréssel 260 nm-en NanoDrop készülékkel határoztuk meg.

A nagyobb mennyiségben izolált és tisztított plazmid tervezett méretét próbaemésztési reakcióban igazoltuk. Ehhez egy vagy két, a vektorban vagy az inszerben hasító restrikciós endonukleáz választottunk, és azokkal kezeltük a kész konstrukciókat (8/b. táblázat). Az emésztési reakciók fragmenseit 1xTAE-val készített 0,8%-os

agarózgélben választottuk el, és GelGreen-es festés után GelDoc (Bio-Rad) készülékkel detektáltuk.

Végül az igazoltan megfelelő méretű plazmidokat univerzális T7 primerekkel küldtük Sanger-szekvenálásra. A kapott szekvenogramokat ellenőrizve, és a szekvenciákat a tervezettekkel összevetve döntöttünk az elkészült konstrukciók további felhasználásáról a fehérjetermeléshez.

8. táblázat: Plazmidkonstrukciókat ellenőrző reakciók.

8/a: Kolónia PCR			
<u>Reakcióelegy</u>		<u>cPCR program</u>	
10 µl	2x PCR BIO <i>Taq</i> Mix	1.	95°C, 5 min
1,0 µl	10 µM 37 T7 forward primer	2.	95°C, 10 sec
1,0 µl	10 µM 38 T7 reverse primer	3.	45°C, 10 sec
8,0 µl	nukleázmentes víz	4.	72°C, 10 sec
Templát DNS: különálló kolóniából		5.	2-4. lépések ismétlése 34x
Végtérfogat: 20 µl		6.	72°C, 2 min
		7.	4°C, ∞
8/b: Próbaemésztési reakciók			
<u>pET-28a_GbpC plazmid emésztése</u>		<u>pET-28a_AgI/II plazmid emésztése</u>	
250 ng	tisztított plazmid	250 ng	tisztított plazmid
2,0 µl	10x FastDigest puffer	2,0 µl	10x FastDigest puffer
0,5 µl	FastDigest <i>ScaI</i> enzim	0,5 µl	FastDigest <i>EcoRV</i> enzim
0,5 µl	FastDigest <i>SmaI</i> enzim	0,5 µl	FastDigest <i>PstI</i> enzim
Kiegészítve nukleázmentes vízzel		Kiegészítve nukleázmentes vízzel	
Végtérfogat: 20 µl		Végtérfogat: 20 µl	
Inkubálás: 37°C, 15 min		Inkubálás: 37°C, 15 min	

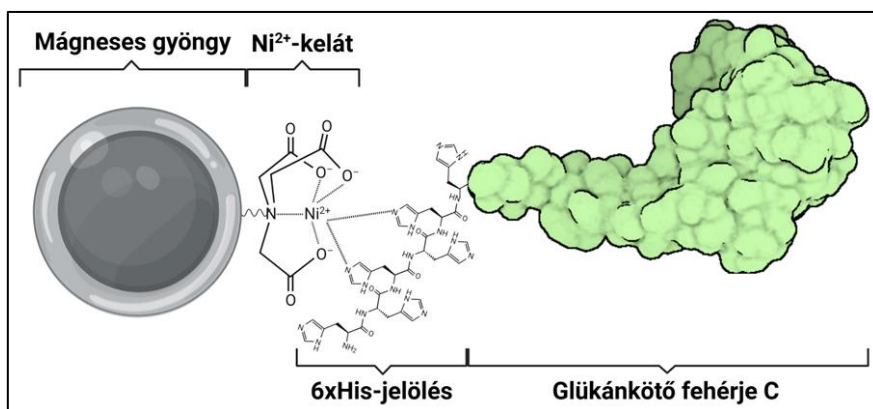
3.2.3. Fehérjetermelés

A GbpC (50 kDa) és AgI/II (65 kDa) fehérje fragmentek (Függelék 12.1.) túltermeléséhez autoindukciós expressziós rendszert [205] használtunk. Ehhez elsőként BL21(DE3) kémiai kompetens *E. coli* sejteket gyártói utasítások szerint transzformáltuk a korábban validált plazmidokkal, majd 1-1 különálló telepet 50 µg/ml kanamicinnel kiegészített 2 ml MDG nem-indukáló tápoldatba oltottunk és 5 órán át 37°C-on 220 rpm-

es rázatással inkubáltunk. Ezt követően az MDG szuszpenzióból 50 µl-t 50 µg/ml kanamicinnel kiegészített 100 ml ZYM-5052 autoindukciós tápoldatba inokuláltunk, és 16 órán át 37°C-on 220 rpm-es rázatással inkubáltunk. Másnap az indukált sejtsuszpenziót steril kónikus centrifugacsövekbe osztottuk szét, és 4°C-on, 20 perc alatt 4000 rpm sebességgel centrifugáltuk a fehérjetisztításhoz. Hosszabb távon a centrifugált sejteket -20°C-on tároltuk.

3.2.4. Fehérjeizolálás

A rekombináns fehérjék izolálását a klónozás eredményeképpen létrejött N-terminális 6xHis-jelölésen keresztül, nikkellionokkal konjugált PureCube Ni-INDIGO paramágneses affinitásgyöngyökkel (8. ábra), gyártói utasítások szerint végeztük.



8. ábra: 6xHis-címkével rendelkező GbpC tisztítása immobilizált fémion affinitás kromatográfiával. A rekombináns fehérje hexa-hisztidin jelöléséből származó nemkötő elektronpárok erős komplexet alkotnak a mágneses gyöngy felületéhez kötött Ni²⁺-keláttal.

A kitermelés növelése érdekében a fagyasztott, majd kiolvasztott baktériumsejteket lizozimmal és proteázinhibitor koktéllal kiegészített feltárási pufferrel kezeltük szobahőmérsékleten 15 percig, ezután mechanikus szonikátorral (Artek Systems, Sonic 300) 5x 30 másodperces, 30-as fokozaton történő kezeléssel növeltük a hűtött szuszpenzió homogenitását. A keveréket 2 ml-es mikrocentrifuga-csövekbe átpipettázva 4°C-on, 20 perc alatt 13000 rpm-en üleptítettük, és a külön gyűjtött felülúszóhoz adtuk az affinitásgyöngyöt. Hideg szobában 1 óras kapcsolási idő után a

mágneses gyöngyöket begyűjtöttük és 3x 1 ml 30 mM imidazoltartalmú mosópufferrel szabadultunk meg a szennyező komponensektől 2x 5 perc, majd 1x 10 perc inkubációval.

Az aptamerszelekcióhoz a célfehérjét a mágneses affinitásgyöngyökhöz kapcsolva tartottuk, azonban a funkcionális és kölcsönhatás vizsgálatokhoz a gyöngyökről eluáltuk 500 mM imidazol tartalmú elúciós pufferrel, és 30 kDa-os áteresztési méretű Amicon membránszűrővel (Merck) töményítettük, majd a tároló puffert 1xASB-re cseréltük.

3.2.5. Fehérjedetektálás

A fehérjekitermelés hatékonyságát és az egyes fehérjefrakciók tisztaságát a fehérjék molekulatömege alapján ($M(\text{GbpC}) \approx 50 \text{ kDa}$ és $M(\text{AgI/II}) \approx 65 \text{ kDa}$), 12%-os SDS-poliakrilamid gélben (9. táblázat), redukáló és denaturáló körülmények között, 1xLaemmler futtató puffert használva gélelektroforézist (SDS-PAGE) követő Coomassie Blue festéssel ellenőriztük. Az eluált, valamint puffercserélt izolátumok fehérje koncentrációját spektrofotometriás méréssel 280 nm-en (NanoDrop-pal) határoztuk meg.

9. táblázat: 12%-os denaturáló akrilamid gél összetétele fehérjék elválasztásához.

Gélvastagság:		0,7 mm	
Akrilamid-koncentráció:		12 V/V%	
Alsó (elválasztó) gél		Felső (tömörítő) gél	
Ultratiszta víz	2,19 ml	Ultratiszta víz	1,44 ml
Alsó (elválasztó) gélpuffer	1,30 ml	Felső (tömörítő) gélpuffer	280 μl
40%-os akrilamid (37,5:1)	1,56 ml	40%-os akrilamid (37,5:1)	260 μl
10%-os APS	50 μl	10%-os APS	20 μl
TEMED	2 μl	TEMED	2 μl

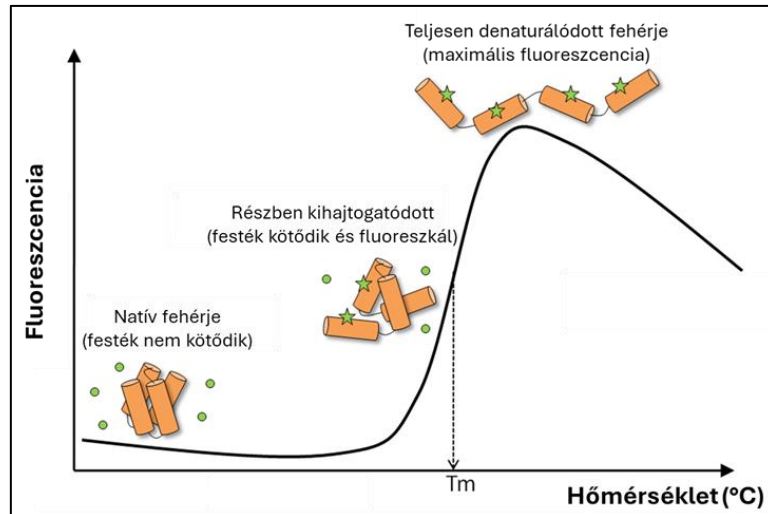
A fehérjék 6xHis specifikus kimutatását Western blot technikával végeztük. Az SDS-PAGE után metanolos bikarbonát/karbonát pufferben nedves transzfert állítottunk össze. A pozitív pólustól (anódtól) számítva két szűrőpapírra helyeztük rá a metanolban aktivált 0,45 μm -es pórusnagyságú PVDF membránt, az elválasztott fehérjéket tartalmazó poliakrilamid gélt és további két szűrőpapírt. A transzfert 4°C-on, egy éjszakán át 30 V konstans feszültségen végeztük. Másnap a szendvics szétszerelése után az átblottolt membránt 37°C-os inkubátorban tiszta szűrőpapírok között kiszárítottuk. A membránt újra aktiváltuk metanolban, majd 1xTBS-ben mostuk és TBS-alapú blokkoló

pufferben (LI-COR, Intercept (TBS) Blocking Buffer) szobahőn, 1 órán át enyhén ráztuk. Ezután került hozzáadásra az egerben termelt monoklonális anti-polihisztidin elsődleges antitest (Sigma, H1029) 1:2000 hígításban, 0,2% Tween-20-szal kiegészített blokkoló pufferhez keverve, és így inkubáltuk a membránt billegtetve, 4°C-on egy éjszakán át. Harmadnap az elsődleges antitest oldatát leöntve 3x 5 percig mostuk a membránt 1xTBS + 0,1% Tween-20 pufferrel, enyhén rázatva. Ezután került hozzáadásra a kecskében termelt poliklonális anti-egér IgG másodlagos fluoreszcensen jelölt antitest (LI-COR, IRDye 680RD) 1:20000 hígításban, 0,2% Tween-20-szal és 0,01% SDS-sel kiegészített blokkoló pufferhez keverve, és így inkubáltuk a membránt sötétben billegtetve, szobahőn, 1 órán át. A másodlagos antitest oldatát leöntve 3x 5 percig mostuk a membránt 1xTBS + 0,1% Tween-20 pufferrel sötétben, enyhén rázatva. Végül a membránt az utolsó mosást követően 1xTBS oldatban tároltuk a detektálásig fénytől védve, 4°C-on. A fluoreszcensen jelölt másodlagos antitest emisszióját Odyssey (LI-COR) készülékkel 25°C-on, vörös csatornán 700 nm-en detektáltuk.

3.3. GbpC funkcionális vizsgálata

3.3.1. Fehérje termostabilitása

A tisztított GbpC térszerkezetének termostabilitását GloMelt Thermal Shift Protein Stability Kit segítségével vizsgáltuk a gyártó protokollja szerint. A 10 µl reakcióelegy 1x GloMelt festékből, 50 nM ROX referenciafestékből és 10 µg GbpC-ből állt, amit a teszt pufferek egyikével (PBS, PBS + 1 mM CaCl₂, 1xASB) hígítottunk. A mintákat MicroAmp Fast Optical 96-lyukú mikrotiterlemezbe (Applied Biosystem) osztottuk szét és MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystem) fóliával fedtük le. A fehérje termikus kihajtogatódása (*thermal unfolding*) során bekötődő festék fluoreszcenciáját (9. ábra) QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR készülékkel (Applied Biosystem) követtük nyomon 25°C–99°C hőmérséklettartományban, kék optikai filter (SYBR Green) beállítással Ex/Em= 470/520±15 nm hullámhosszon, majd a kapott olvadási görbék hőmérséklet szerinti első deriváltját és a fehérje olvadáspontját QuantStudio 12K Flex Software (Applied Biosystem) segítségével értékeltük ki.

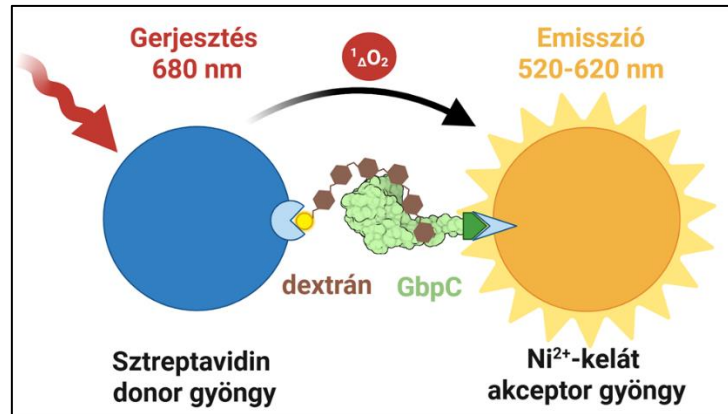


9. ábra: A termikus kihajtogatódási vizsgálat folyamata és detektálása. A fluoreszcens festék a hőmérséklet-emelkedése során denaturálódó fehérje aminosavainak hidrofób oldalláncaihoz kötődik. A görbe inflexiós pontjához tartozó hőmérséklet érték (T_m) a fehérje olvadáspontját jelöli, ahol a denaturáltság 50%-os [206] alapján.

3.3.2. GbpC-dextrán kölcsönhatása

3.3.2.1. ALPHAScreen

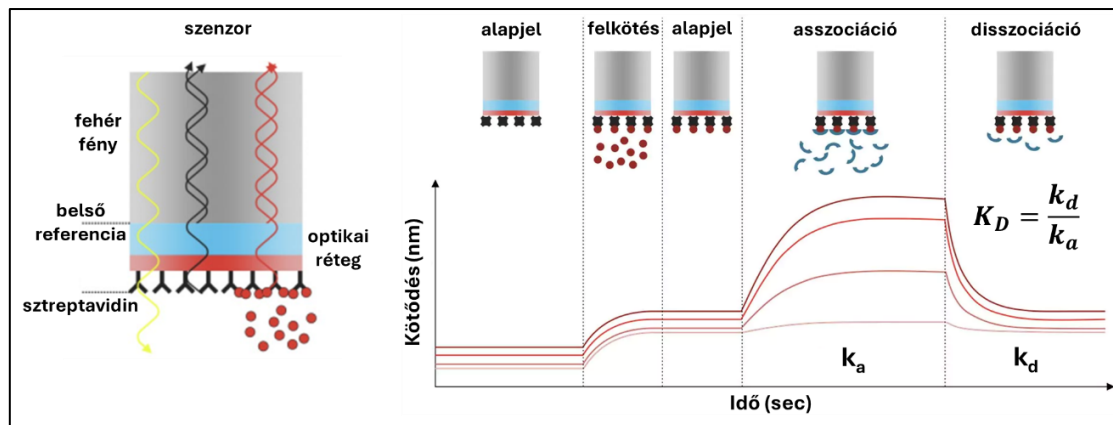
A termelt GbpC fehérje glükán (dextrán)-kötő képességét elsőként ALPHA-technikával ellenőriztük. Ehhez 6xHis-jelölés detektálására alkalmas reagenskészletet (Histidine Detection Kit) használtunk. A reakcióelegyet AlphaPlate 384 SW típusú mikrotiterlemezben (PerkinElmer), 18 μ l-ben állítottuk össze, amihez az N-terminálisan 6xHis-jelölt rekombináns fehérjéből készült, végkoncentrációban 125-1000 nM-os hígításokat 15 nM biotinilált dextránnal (Thermo, D1956), illetve kontrollként üres donor gyönggyel inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, 0,1 mg/ml mucinnal kiegészített 1xASB-ben. Ezt követte a Ni^{2+} -nal módosított akceptor gyöngyök, majd a sztreptavidinnel módosított donor gyöngyök hozzáadása, amiket rendre 30-30 percig inkubáltunk sötétben (az utolsó 10 percet már a mérőkészülékben, 25°C-on). A keletkező kemilumineszcens jelet EnSpire (PerkinElmer) készülékkel 25°C-on mértük (10. ábra).



10. ábra: Az ALPHA mérési technika sematikus ábrája.

3.3.2.2. BLI

Egy további, immobilizálást igénylő módszer segítségével a GbpC-dextrán kölcsönhatás kinetikáját is megvizsgáltuk. Ehhez sztreptavidinnel módosított Super Streptavidin (Fortebio) típusú szenzort telítettünk 1 μM -os biotinilált dextránnal, majd a kötődött ligandumot 0-40 μM -os GbpC 1xASB-vel készült hígításokba merítettük, és követtük a rétegvastagság-változását (11. ábra). A kinetikai méréseket szobahőmérsékleten BLItz (Fortebio) készülékkel végeztük és BLItz Pro (v1.2) szoftverrel értékeltük.

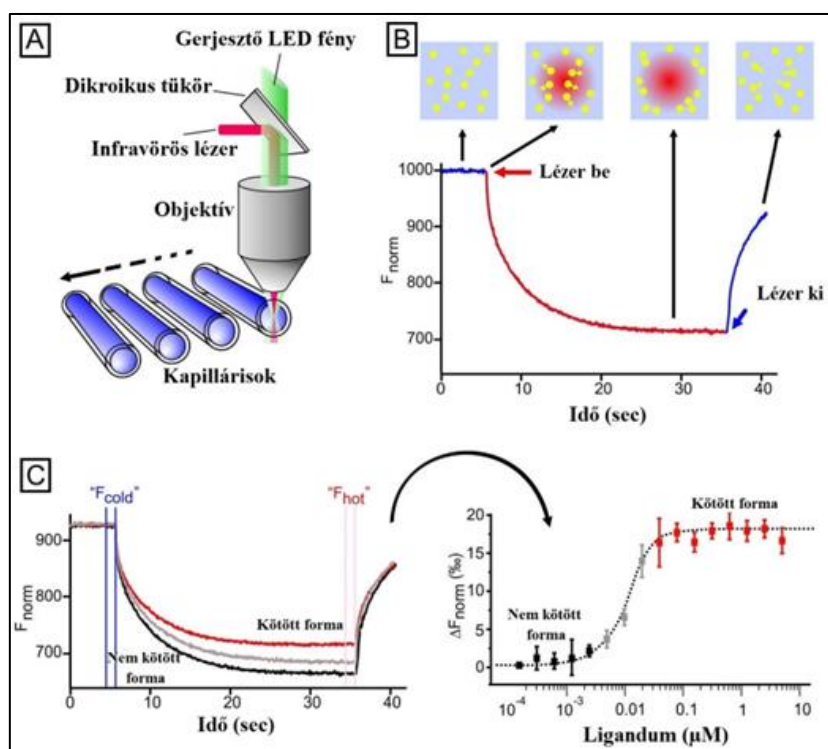


11. ábra: A BLI mérési technika sematikus ábrája és a kinetikai görbe alakulása [207].

3.3.2.3. MST

Végül a homogén mérési elrendezést igénylő mikroskálás termoforézissel vizsgáltuk a GbpC dextrán iránti affinitását. Ehhez a 100 μM -os GbpC törzsoldatból

1xASB-vel 16-tagú felező hígítási sort készítettünk, és mindegyik taghoz 0,02% Tween-20-szal kiegészített 100 nM-os FITC-dextrán (Sigma, FD10S) oldatot adtunk 1:1 térfogatarányban. Az egyes reakcióelegyeket Monolith (NanoTemper) üvegapillárisokba töltöttük és 20%-os (FITC-jelölést gerjesztő) kék fény besugárzással, 40%-os infravörös melegítéssel, rendre 3;20;1 másodperces követési időkkel mértük a hőmérsékletváltozás indukálta fluoreszcenciaváltozást 25°C-on Monolith NT.115 (NanoTemper) készülék segítségével (12. ábra). Az eredmények kiértékeléséhez az MO.Affinity Analysis (v2.3) szoftvert használtuk.



12. ábra: Az MST technika sematikus ábrája és az eredmények értékelése [208] alapján. A kapillárisokba töltött minták termoforézisét infravörös lézer, fluoreszkálását LED fény indukálja (A). A fluoreszcencia-intenzitásváltozását (B) követve megállapítható a kötődés (C).

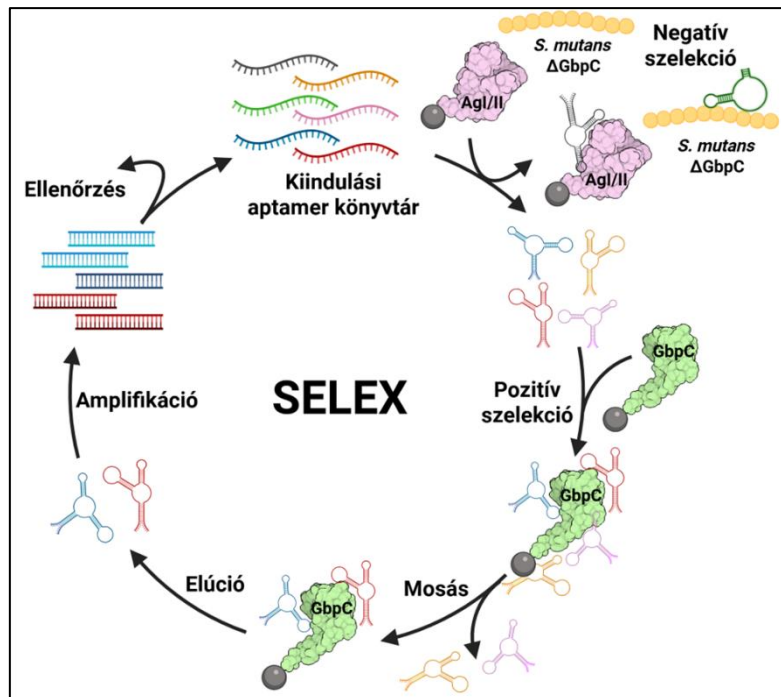
3.4. GbpC-specifikus aptamerek szelekciója

3.4.1. SELEX folyamata

A DNS aptamerszelekció egy nagy szekvenciális diverzitást mutató, egyszálú oligonukleotidokat tartalmazó könyvtárból indult ki, amit kémiai szintézis útján állítottunk elő. A sokféleséget a szekvenciák 40 random nukleotidból álló variábilis

régiója – elméletileg 4^{40} , vagyis kb. 10^{24} -féle, ám gyakorlatilag csupán 10^{14} - 10^{15} -féle bázissorrend – biztosítja, amit két, egyenként 18 nukleotidból álló primerrégió határol.

A szelekciós puffert úgy választottuk meg, hogy az a potenciális felhasználási körülményeket imitálja, egyúttal ideális miliót biztosítson a célfehérjék natív térszerkezeté számára. Ehhez kereskedelmi forgalomban kapható mesterséges nyálpuffert alkalmaztunk, aminek kémiai összetétele (Függelék 12.2.) a fiziológias szekréturnak megfeleltethető [209]. A szelekciós ciklusok megkezdésekor a kiindulási könyvtár nukleázmentes vizes oldatát 95°C -on, 5 percig melegítettük, ezzel megbontva a szekvenciák intra-, és intermolekuláris kölcsönhatásait, majd jégen gyorsan lehűtöttük. A lehűlt oldatot $1200\ \mu\text{l}$ $1\times\text{ASB}$ -hez kevertük, és néhány percig szobahőn tartottuk, amíg a DNS molekulák felvették az oldat komponensei indukálta szerkezetüket. Ezt követte a mágneses affinitásgyöngyön kikötött célfehérje hozzáadása, ami pozitív szelekciós ciklusok esetén GbpC, míg negatív (kontra-) szelekciós lépés esetén AgI/II, illetve ΔGbpC *S. mutans* sejtuszpenzió volt. A szelekció előrehaladtával a szelekciós nyomást fokozatosan emeltük, hogy a gyengébben és aspecifikusan kötődő szekvenciákat elimináljuk. Végül a pozitív ciklusok végén a kötődő DNS molekulákat 95°C -on, 5 perces hőkezeléssel eluáltuk, és félretettük az amplifikációs lépéshez (13. ábra). Az egyes szelekciós ciklusok részletes protokollja a Függelék 12.3-ban került összefoglalásra.



13. ábra: Az aptamerszelekció egy ciklusának sematikus ábrája.

Tekintettel a DNS aptamerek magas diverzitására, az amplifikációs lépést emulziós PCR-rel végeztük, ezzel minimalizálva a melléktermék-képződés esélyét. Az emulziós reakcióelegyet a gyártó (EURx, Micellula Kit) protokollja alapján, az alábbiak szerint állítottuk össze (11/a. táblázat). Az 50 µl vizes fázist 300 µl háromkomponensű olajos fázisba diszpergáltuk, majd 4°C-on, 5 percig tartó erőteljes kevertetéssel (vortex) tejszerű emulziót készítettünk, amit három PCR csőbe egyenlően osztottunk szét. A reakció végeztével az emulzió micelláit 1 ml butanolba mosva bontottuk meg, és 400 µl OrangeDX-et hozzáadva 2 percig forgattuk, majd 2 perc alatt maximális sebességen centrifugálva szeparáltuk a vizes és olajos fázisokat. Az ePCR-termékeket tartalmazó alsó vizes fázist az OligoClean and Concentrator reagenskészlet léptéknövelt protokollja szerint tisztítottuk, és végül 50 µl nukleázmentes vízben nyertük ki. Az így kapott termékeket 1xTBE futtató puffert használva 10%-os poliakrilamid gélben (10. táblázat), elektroforézissel választottuk el, és GelGreen-es festést követően értékeltük.

10. táblázat: 10%-os akrilamid gél összetétele DNS-ek elválasztásához.

Gélvastagság:	1,0 mm
Akrilamid-koncentráció:	10 V/V%
Egyfázisú elválasztó gél	
Ultratiszta víz	3,2 ml
40%-os akrilamid (29:1)	1,6 ml
5x TBE	1,2 ml
10%-os APS	100 µl
TEMED	5 µl

A tisztított kétszálú ePCR terméket alkalikus denaturálással egyszálúsítottuk a következő lépéshez. Ehhez a reverz szál biotinnal jelölt 5'-végén keresztül a termékeket sztreptavidinnel borított mágneses affinitásgyöngyökhöz kapcsoltuk gyártói protokoll szerint. A pozitív (*sense*) szálát 50 µl frissen készített 50 mM NaOH hozzáadásával 10 perces forgatón történő inkubálást követően választottuk el a negatív (*antisense*) száltól, ami a mágneses gyöngyökhöz kötve maradt. Az egyszálúsított DNS-eket tartalmazó felülúszót 7,5 µl 400 mM NaH₂PO₄-tal semlegesítettük, és a következő szelekciós ciklusban használtuk fel.

Az utolsó szelekciós ciklus után nyert aptamerekkel elvégeztünk egy végső ePCR-t (11/b. táblázat), aminek reakcióelegyéhez jelöletlen primereket és iProof DNS-polimerázt adtunk, hogy így a tisztított termékeket tompa végekkel a Zero Blunt TOPO Cloning reagenskészlet gyártói leírása szerint pCR-Blunt II-TOPO vektorba inszertálhassuk (11/c. táblázat). A konstrukciókkal α -Select Gold kémiai kompetens sejteket transzformáltunk. Az aptamerjelöltek beillesztését vektorspecifikus primereket használva kolónia PCR segítségével vizsgáltuk (11/d. táblázat), majd a termékeket 1xTAE-ban agaróz gélelektroforézissel, illetve LabChip DNS 1K reagenskészletet használva LabChip GXII kapilláris elektroforetikus készülékkel (PerkinElmer) vizsgáltuk. A megfelelő méretű cPCR-termékeket (55-öt) Sanger-szekvenálásra küldtük az Eurofins Genomics-nak.

11. táblázat: Aptamerszelekció során alkalmazott enzimreakciók.

11/a: Emulziós PCR	
<u>Reakcióemulzió olajos fázisa</u>	<u>PCR program</u>
220 μ l Emulziós komponens 1	1. 94°C, 5 min
60 μ l Emulziós komponens 3	2. 94°C, 30 sec
20 μ l Emulziós komponens 2	3. 50°C, 5 sec
Végtérfogat: 300 μl	4. 72°C, 20 sec
<u>Reakcióemulzió vizes fázisa</u>	5. 2-4. lépések ismétlése 24x
5,0 μ l 10x KOD XL puffer	6. 72°C, 5 min
5,0 μ l KOD dNTP (2 mM)	7. 4°C, ∞
1,5 μ l 10 μ M 257 forward primer	
1,5 μ l 10 μ M 261 5'Btn reverz primer	
0,5 μ l 1 mg/ml BSA	
2,0 μ l 100% DMSO	
0,3 μ l KOD XL polimeráz	
34 μ l templát DNS	
Kiegészítve nukleázmentes vízzel	
Végtérfogat: 50 μl	

11/b: Végső ePCR iProof DNS-polimerázzal		
<u>Reakcióemulzió vizes fázisa</u>		<u>PCR program</u>
10 µl	5x iProof HF puffer	1. 98°C, 3 min
2,5 µl	10 µM 257 primer	2. 98°C, 10 sec
2,5 µl	10 µM 260 primer	3. 55°C, 10 sec
5,0 µl	10 mM CleanAmp dNTP	4. 72°C, 20 sec
0,5 µl	iProof (<i>Pfu</i>) polimeráz	5. 2-4. lépések ismétlése 19x
1,0 µl	templát DNS	6. 72°C, 5 min
Kiegészítve nukleázmentes vízzel		7. 4°C, ∞
Végtérfogat: 50 µl		
11/c: TOPO klónozás		
<u>Reakcióelegy</u>		
4,0 µl	friss, tisztított PCR termék	
1,0 µl	Salt Solution (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂)	
1,0 µl	pCR [™] II-Blunt-TOPO [®] vektor	
Végtérfogat: 6,0 µl		
Inkubálás szobahőmérsékleten: 20 min		
11/d: Kolónia PCR		
<u>Reakcióelegy</u>		<u>cPCR program</u>
10 µl	2x PCR BIO Taq Mix	1. 95°C, 5 min
1,0 µl	10 µM 193 forward primer	2. 95°C, 10 sec
1,0 µl	10 µM 194 reverse primer	3. 60°C, 10 sec
8,0 µl	nukleázmentes víz	4. 72°C, 5 sec
Templát DNS: különálló kolóniából		5. 2-4. lépések ismétlése 24x
Végtérfogat: 20 µl		6. 72°C, 2 min
		7. 4°C, ∞

3.4.2. Aptamerjelöltek szűrése

3.4.2.1. *In silico* elemzés

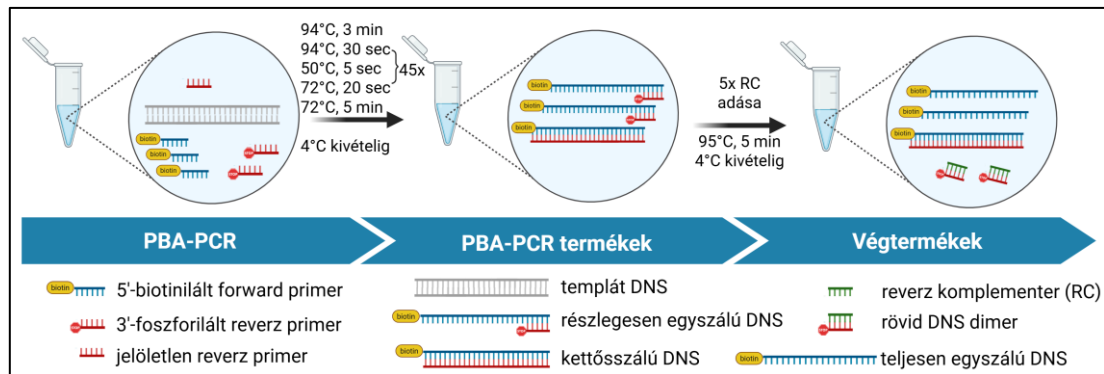
A vártak megfelelő méretű oligonukleotidoknak elsőként a bázismegoszlását vizsgáltuk, és az ismétlődő nukleinsav-szekvenciákat szűrtük ki az UGENE (v50.0) szoftver segítségével. Az egyes nukleinsav-szekvenciák randomrégiójában feltűnő

rövidebb motívumokat az online elérhető MEME Suite [59] alkalmazással kerestettük meg.

3.4.2.2. Egyszálú DNS molekulák előállítása PBA-PCR-rel

Az egyes oligonukleotidok kötődésének kísérletes vizsgálatához szükségünk volt egy nagy áteresztőképességű és költséghatékony módszerre, amellyel a szekvenálási eredményből kapott aptamerjelölteket tetszőleges 5'-módosítással elő tudjuk állítani laborkörülmények között. Ehhez a munkacsoportunkban korábban Tolnai Zoltán által optimalizált primer blokkolt aszimmetrikus PCR [210] továbbfejlesztett változatát alkalmaztuk.

Röviden a PBA-PCR-ről és a továbbfejlesztésről: a részben egyszálú termékeket eredményező aszimmetrikus PCR-t a reakció kezdete előtt egy második, 3'-végén foszfátcsoporttal módosított reverz primerrel egészítettük ki, aminek következtében a blokkoló primer miatt az adott szárlól nem képződik termék. Azonban a blokkoló primer kötődése hatással lehet az előállt aptamerjelölt által létesített kölcsönhatásokra, ezért azt feleslegben adott komplementer oligonukleotidjával leszorítottuk, így egy teljesen egyszálú, 5'-végén biotinnal módosított aptamerjelöltet kaptunk, amit elsődleges kölcsönhatás vizsgálatokhoz tudunk felhasználni (14. ábra).



14. ábra: Aptamerek előállítása továbbfejlesztett PBA-PCR-rel.

A vizsgálandó oligonukleotidokat előállító PBA-PCR templátjaként a szekvenáláshoz összeállított kolónia PCR termékek 50x-es hígítása szolgált, amit a 12. táblázatban részletezett keverékhez adtunk hozzá. A PBA-PCR-t követően a blokkoló reverz primer anyagmennyiségéhez képest 5x-ös feleslegben adtunk reverz primerrel

komplementer (RC) szekvenciát, amit 95°C-on 5 percig inkubáltunk a reakciótermékkel, majd gyorsan lehűtöttünk, hogy a részlegesen kétszálú PBA-PCR-termékeket teljes hosszában egyszálúsítsuk.

12. táblázat: Primer blokkolt aszimmetrikus PCR összeállítása.

PBA-PCR +RC	
<u>Reakcióelegy</u>	<u>PCR program</u>
2,0 µl 10x KOD XL puffer	1. 94°C, 3 min
2,0 µl KOD dNTP (2 mM)	2. 94°C, 10 sec
1,0 µl 10 µM 258 5'-Btn forward primer	3. 50°C, 10 sec
0,5 µl 1 µM 260 reverz primer	4. 72°C, 5 sec
0,95 µl 10 µM 263 3'-foszfát primer	5. 2-4. lépések ismétlése 44x
0,8 µl 100% DMSO	6. 72°C, 3 min
0,15 µl KOD-XL polimeráz	7. 4°C, ∞
1,0 µl templát DNS	
Kiegészítve nukleázmentes vízzel	
Végtérfogat: 20 µl	
<u>Reverz komplementer hozzáadás</u>	<u>Inkubálás</u>
0,475 µl 100 µM 264 RC	95°C, 5 min, majd 4°C, ∞

3.4.2.3. Kötődés és specifikusság vizsgálat ALPHAScreen-nel

Az aptamerjelöltek GbpC és AgI/II fehérjék iránt mutatott affinitását ALPHA-technikával vizsgáltuk. A kötődésvizsgálathoz elsőként a kölcsönható partnereket kevertük össze; végkoncentrációban 500 és 1000 nM tisztított GbpC-t és kb. 12,5 nM PBA-PCR-rel előállított 5'-biotinnal módosított aptamerjelöltet. Az 1 órás inkubálás után került hozzáadásra a nikkelionnal borított akceptor gyöngy, majd 30 percet követően a sztreptavidinnel borított donor gyöngy, amit szintén 30 percig sötétben inkubáltunk (az utolsó 10 percet már a mérőkészülékben, 25°C-on). A reakcióelegyeket AlphaPlate 384 SW típusú mikrotiterlemezben (PerkinElmer), 18 µl össztérfogatban állítottuk össze. A mérőpuffer 1xASB volt, kiegészítve 0,1 mg/ml mucinnal és 0,1 µg/ml lazacsperma DNS-sel. A keletkező kemilumineszcens jelet EnSpire (PerkinElmer) készülékkel 25°C-on mértük.

A specifikusság vizsgálatok menete a kötődési vizsgálatokkal megegyezően zajlott annyi különbséggel, hogy az előbbi kötődésvizsgálatban meghatározott 11 legjobban teljesítő aptamerjelölt kölcsönhatását végkoncentrációban 750 nM GbpC-vel, 750 nM AgI/II-vel, illetve célfehérjével borítatlan („csupasz”) Ni²⁺-akceptor gyönggyel szemben mértük.

3.4.3. Aptamerek karakterizálása

3.4.3.1. Kinetikai mérések BLI-vel

Az aptamerjelöltek kötődésének kinetikáját bioréteg interferometria segítségével vizsgáltuk. Ehhez sztreptavidinnel módosított Super Streptavidin (Fortebio) szenzort telítettünk 1 µM-os kémiaailag szintetizált, 5'-biotinilált aptamerjelölt (A30, A39, A65, A96 vagy A58) oldattal, majd a kötődött ligandumot 0-50 µM-os GbpC 1xASB-vel készült hígításaiba merítettük és követtük a rétegvastagság-változását. A kinetikai méréseket szobahőmérsékleten BLItz (Fortebio) készülékkel végeztük és BLItz Pro (v1.2) szoftverrel értékeltük.

3.4.3.2. Affinitásmérések MST-vel

A két legígéretesebb aptamerjelölt GbpC és AgI/II iránti affinitását mikroskálás termoforetikus mérésekkel is vizsgáltuk. Ehhez kémiaailag megszintetizáltattuk az A39 és A96 jelöltek teljes hosszúságú, valamint primerrégiókat nem tartalmazó, rövidebb változatait 5'-Cy5 fluoreszcens módosítással. Az affinitástisztítás és puffercsere után nyert 200 µM-os GbpC, illetve 80 µM-os AgI/II törzsoldatokból 1xASB-vel 16-tagú felező hígítási sort készítettünk, és mindegyik taghoz 0,02% Tween-20-szal kiegészített 100 nM-os Cy5-aptamerjelölt oldatot adtunk 1:1 térfogatarányban. Az egyes reakcióelegyeket Monolith (NanoTemper) üvegapillárisokba töltöttük és 20%-os (Cy5-jelölést gerjesztő) piros fény besugárzással, 40%-os infravörös melegítéssel, rendre 3;20;1 másodperces követési időkkel mértük a hőmérsékletváltozás indukálta fluoreszcenciaváltozást Monolith NT.115 (NanoTemper) készülék segítségével, 25°C-on. Az eredmények kiértékeléséhez az MO.Affinity Analysis (v2.3) szoftvert használtuk.

A kompetitív mérésekhez a GbpC célmolekula törzsoldatát 40 µM-osra hígítottuk 1xASB + 0,02% Tween-20 pufferrel, amihez azonos térfogatú 200 nM-os teljes hosszúságú Cy5-A39 vagy Cy5-A96 oldatot pipettáztunk, és a komplexet előinkubáltuk 25°C-on, 5 percig. Ez idő alatt 100 µM-os jelöletlen A39 (hosszú) vagy FITC-dextrán

törzsoldatból 16-tagú felező hígítási sort készítettünk 1xASB-vel, és az előinkubálást követően 1:1 térfogat arányban kevertük össze a fehérje és aptamer oldatát a hígítási tagokkal. Az egyes reakcióelegyetek Monolith (NanoTemper) üvegapillárisokba töltöttük, és 20%-os (Cy5-jelölést gerjesztő) piros fény besugárzással, 40%-os infravörös melegítéssel, rendre 3;20;1 másodperces követési időkkel mértük a hőmérsékletváltozás indukálta fluoreszcenciaváltozást Monolith NT.115 (NanoTemper) készülék segítségével, 25°C-on. Az eredmények kiértékeléséhez az MO.Affinity Analysis (v2.3) segédprogramot használtuk.

3.4.3.3. Stabilitásvizsgálat qPCR-rel

Az A39-es teljes hosszúságú, jelöletlen aptamer nukleázokkal szembeni stabilitását sejtes modellrendszerben vizsgáltuk. A modellrendszerben a *biofilm assay*-nél alkalmazott körülményeket állítottunk be, azaz biofilmképző tápoldatba 1:100 térfogatarányban vad típusú *S. mutans* UA130 baktériumtörzset oltottunk, majd 37°C-on, statikus inkubátorban növesztettük. A baktérium-szuszpenzióhoz hozzáadott kiindulási aptamerkoncentráció 2 µM volt. Az aptamer hozzáadásának időpontjától (t_0) számítva még további hat időpontban ($t_0 + 1$ h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h) vettünk egységnyi térfogatú mintát a keverékből, amit rögtön folyékony nitrogénben fagyasztottuk és -80°C-on tároltuk.

Az intakt aptamerek relatív mennyiségét az egyes mintákból qPCR-rel határoztuk meg. Ennek összeállításához a vett mintákból két lépésben ezerszeres hígítást készítettünk, és ebből 1-1 µl-t adtunk a 10 µl-es reakcióelegyekhez templátként. A qPCR programot gyártói ajánlások alapján állítottuk be (13. táblázat). A mintákat MicroAmp Fast Optical 96-lyukú mikrotiterlemezbe (Applied Biosystem) osztottuk szét, és MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystem) fóliával fedtük le. A qPCR-t QuantStudio 3 Real-Time PCR készülékben (Applied Biosystem) hajtottuk végre. Az aptamer féléletidejét a készülék szoftvere által számított küszöb ciklusokból egyfázisú bomlási modellt alkalmazva GraphPad Prism (v10.3) programmal számítottuk ki.

13. táblázat: A mennyiségi polimeráz-láncreakció összeállítása.

qPCR		
Reakcióelegy		qPCR program
5,0 µl	2x qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX	1. 95°C, 5 min
0,4 µl	10 µM 257 forward primer	2. 95°C, 5 sec
0,4 µl	10 µM 260 reverse primer	3. 60°C, 20 sec
1,0 µl	kihígított templát	4. 2-3. lépések ismétlése 39x
Kiegészítve nukleázmentes vízzel		5. 72°C, 2 min
Végtérfogat: 10 µl		6. 4°C, ∞

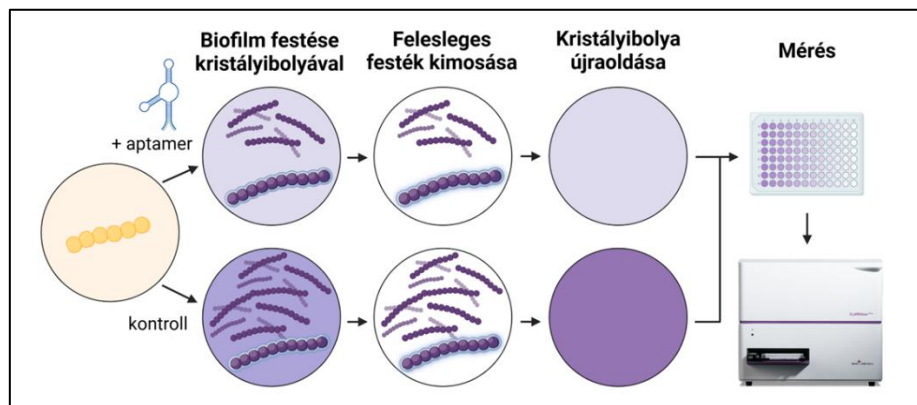
3.5. Aptamerek funkcionális vizsgálata

A kiválasztott, karakterizált aptamerek (A30, A39, A65, A96 és A58) biofilmgátló hatását 96-lyukú mikrotiterlemezben összeállított, egyszerű modellrendszerben (*biofilm assay*) vizsgáltuk. A teszteléséhez a következőket készítettük elő: *Streptococcus mutans* UA130 (vad típusú) és Δ GbpC (mutáns) baktériumtörzsek BHI-táptalajon növesztett telepeit frissen készített és autoklávozott (121°C, 15 perc) 1xBHI tápoldatban egy éjszaka alatt 37°C-on aerob, rázatott inkubátorban késő-log fázisig növesztettünk. A frissen készített biofilmképző tápoldatot (BFM) úgy állítottuk össze, hogy a steril 1xBHI tápoldatot kiegészítettük még 0,22 µm pórusnagyságú membránon (Millipore, Millex GS) átszűrt, végkoncentrációban 1% szacharóz vagy fruktóz+glükóz oldattal és 1:100 térfogathígításban vad típusú vagy mutáns bakteriális sejtszuszpenzióval. A kész BFM-ek 98 µl-ét U-fenekű polisztirol, steril mikrotiterlemezbe (Starstedt, 82.1582.501) osztottuk szét, és 2-2 µl 100 µM-os jelöletlen aptamer törzsoldatot (Eurofins) adtunk hozzá. Az így összeállított reakciókeverékeket 16 órán át, 37°C-on, aerob, statikus körülmények között inkubáltuk.

A következő napon a planktonikus sejteket tartalmazó felülúszókat nátrium-hipokloritos gyűjtőbe leöntöttük, és a visszamaradt képleteket 3x 200 µl autoklávozott 1xPBS-sel mostuk. A műanyaghoz tapadt biofilm-struktúrákat 125 µl 0,05 %-os kristályibolya-oldattal 10 perc alatt, szobahőmérsékleten megfestettük, a fölösleges festéköldatot határozottan leöntöttük, majd a maradékot három-öt vizes merítéssel kimostuk, és hagytuk a mikrotiterlemezt megszáradni. Ezután a festődött mintákat 200 µl 30%-os ecetsavban újraoldottuk, és abból 125 µl-t tiszta F-fenekű 96-lyukú

mikrotiterlemezbe (Sarstedt, 82.1581) helyeztünk át. A képződött biofilm mennyiségével arányos abszorbanciát 595 nm-en CLARIOstar (BMG Labtech) készüléssel mértük (15. ábra). Az aptamerek gátló hatását a kezeletlen minták abszorbanciájához viszonyítva az alábbi képlet alapján számítottuk ki. A számított hatások szignifikanciáját kétmintás t-próbával GraphPad Prism (v10.3) program segítségével vizsgáltuk.

$$\text{Biofilmképződés gátlása (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abszorbancia(kezelt)}}{\text{Abszorbancia(kezeletlen)}}\right) \times 100\% .$$



15. ábra: A biofilmképződés mennyiségi meghatározása.

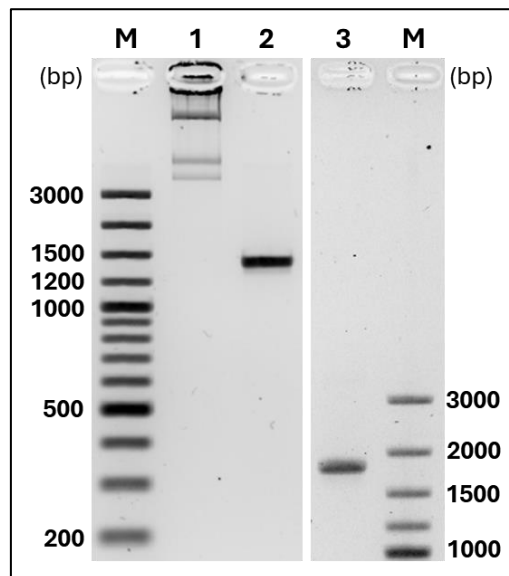
3.6. GbpC-aptamer komplexek térszerkezetének predikciója

A karakterizált és funkcionálisan vizsgált aptamerek kötőhelyének feltérképezését az online hozzáférhető, gépi tanulással fejlesztett [AlphaFold Server](#) (Google DeepMind & Isomorphic Labs) szerkezetjósoló alkalmazás segítségével végeztük. A szerver legújabb 3-as verziója [65] lehetővé teszi különböző biomolekulák ionok jelenlétében kialakuló komplexének modellezését. A bekért aminosav (UniProt: [Q8DTF1](#) alapján) és aptamer nukleinsav-szekvenciák, valamint a szelekció és a kölcsönhatás vizsgálatok során is jelen lévő Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- ionok megadása után a kapott eredményeket értékeltük, és PyMOL (v3.1) segédprogrammal elemeztük.

4. Eredmények

4.1. Létrehozott vektorkonstrukciók ellenőrzése

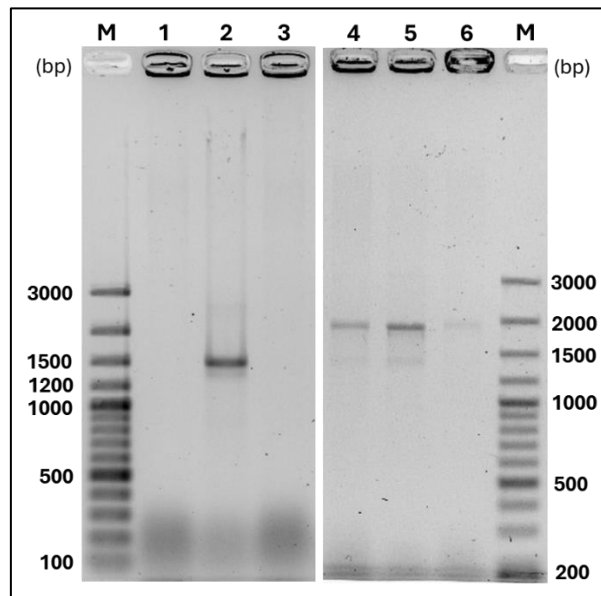
Az aptamerszelekcióhoz előállítandó bakteriális fehérje célmolekulákat *E. coli* alapú sejtes expressziós rendszerben kívántuk termeltetni, amihez a vektorkonstrukciókat a klasszikus, restrikciós endonukleázokat igénylő klónozással hoztuk létre. A GbpC, illetve AgI/II fehérjéket kódoló génfragmenteket a donor plazmidokból M13 univerzális primerek segítségével PCR-ben felsokszorozítottuk. A keletkezett termékeket a várt bázispár-hosszúsággal – GbpC esetén 1423 bp, AgI/II esetén 1798 bp –, melléktermék képződése nélkül detektáltuk (16. ábra), így inszertként tudtuk azokat felhasználni.



16. ábra: Donor vektorokból amplifikálódott célfehérjéket kódoló PCR termékek. A PCR-t követően a reakcióelegyekekből 2-2 μ l terméket 1xTAE-val készített 2%-os, illetve 1%-os agarózgélben elektroforézissel választottuk el. Az elválasztást követően a gélt GelGreen interkalálódó festékkel festettük és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: 100 bp-os DNS marker; 1: pUCIDT-Amp GbpC fragmenst kódoló donor plazmid; 2: GbpC-t kódoló fragmentum (1423 bp); 3: AgI/II-t kódoló fragmentum (1798 bp).

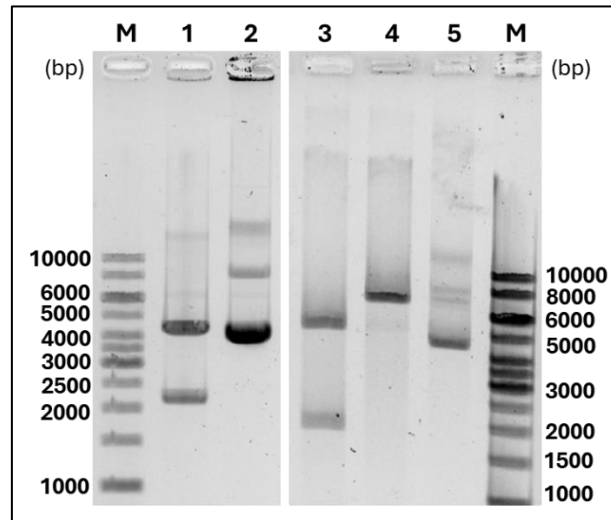
A megfelelő méretű PCR termékeket és a recipiens pET-28a expressziós vektort *NdeI* és *XhoI* restrikciós endonukleázokkal kezeltük, majd az emésztett inszerteket a vektorral ligálási reakciókban egyesítettük, és az egyesített fragmenteket kompetens sejtekbe transzformáltuk. A kanamicin rezisztenciagénnel rendelkező, tehát pozitívan

szelektált baktériumtelepekből T7 univerzális primerekkel készült kolónia PCR eredmények alapján azokat a klónokat választottuk plazmid izolálásra alkalmasnak, amelyekből kimutatható volt a célfehérjét kódoló inszert jelenléte. Az előzetes számításaink alapján a pozitív cPCR termékek nagysága pET-28a_GbpC¹¹¹⁻⁵²², illetve pET-28a_AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ plazmidok esetén rendre 1487 bp, illetve 1862 bp hosszúnak adódtak, amelyek megegyeztek a kísérletben kapott termékek nagyságával (17. ábra).



17. ábra: Recipiens vektorokból amplifikálódott kolónia PCR termékek. A PCR-t követően a reakcióelegyekből 5-5 μ l terméket 1xTAE-val készített 1%-os agarózgélben elektroforézissel választottuk el. Az elválasztást követően a gél GelGreen interkalálódó festékkel festettük, és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: 100 bp-os DNS marker; 1 és 3: negatív kolónia (üres pET-28a terméke 320 bp); 2: GbpC fragmentumot felvett pozitív kolónia (1487 bp); 4-6: AgI/II fragmentumot felvett pozitív kolónia (1862 bp).

A létrehozott vektorkonstrukciókat baktériumsejtekből izoláltuk és méretüket restrikciós endonukleázokkal végzett próbaemésztéssel ellenőriztük. A fragmentek számított mérete próbaemésztést követően pET-28a_GbpC¹¹¹⁻⁵²² esetén (*ScaI*+*SmaI* által emésztve) $2191 + 4347 = 6538$ bp, míg pET-28a_AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ esetén (*EcoRV*+*PstI* által emésztve) $1806 + 5107 = 6913$ bp. A próbaemésztési reakciókban kapott termékek mérete a számított értékekkel megegyezett (18. ábra), így az elkészült plazmidokat nukleinsavszekvenálással is megerősítettük, mielőtt a célfehérjék expressziójára használtuk.



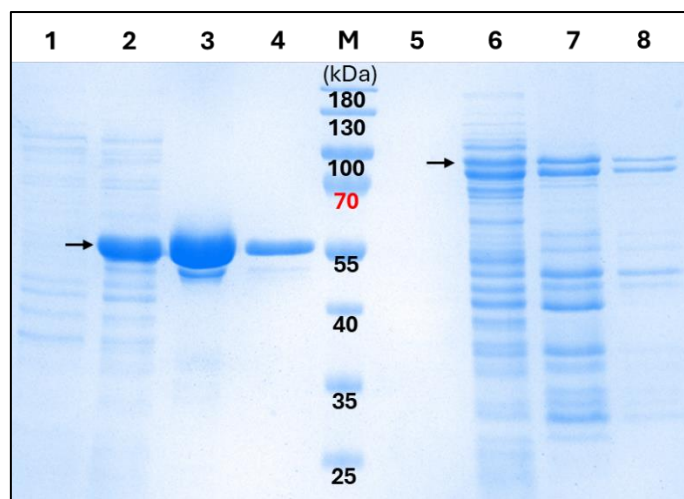
18. ábra: A létrehozott pET-28a vektorkonstrukciók próbaemésztése. Az izolált plazmidok 250 ng-ját restriktív endonukleázokkal kezeltük, majd az emésztési reakcióelegyekből 10-10 μ l terméket 1xTAE-val készített 0,8%-os agarózgélben elektroforézissel választottuk el. Az elválasztást követően a gélt GelGreen interkaláló festékkel festettük, és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: 1 kb-os DNS marker; 1: pET-28a_GbpC¹¹¹⁻⁵²² kétszeres emésztése (2191 bp és 4347 bp); 2: pET-28a_GbpC¹¹¹⁻⁵²² emésztetlen plazmid; 3: pET-28a_AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ kétszeres emésztése (1806 bp és 5107 bp); 4: pET-28a_AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ egyszeres emésztése (6913 bp); 5: pET-28a_AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ emésztetlen plazmid.

4.2. GbpC és AgI/II fehérjék előállítása és izolálása

Az aptamerszelekcióhoz és az azt követő kölcsönhatás vizsgálatokhoz szükségünk volt egy megbízható és robusztus fehérjetermelő rendszerre, továbbá egy hatékony fehérjetisztítási eljárásra. Az *E. coli* alapú autoindukciós expressziós rendszer megfelelt ezen kívánalmaknak. Ehhez a validált plazmidokkal transzformált kompetens sejteket előbb laktózmentes minimál tápközegben szaporítottuk fel, majd az exponenciális növekedési fázisban laktóztartalmú komplex tápoldatba oltottuk át, ezzel indukálva a T7 promotert és a fehérjetermelést.

A pET-28a expressziós vektorokkal N-terminális 6xHis-jelölést tartalmazó fúziós fehérjéket termeltettünk baktériumsejtekkel, amely jelölés biztosította a hatékony affinitástisztítást. Az expresszió indukálását és az izolált fehérjefrakciókat denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követően értékeltük. Míg az indukció előtti

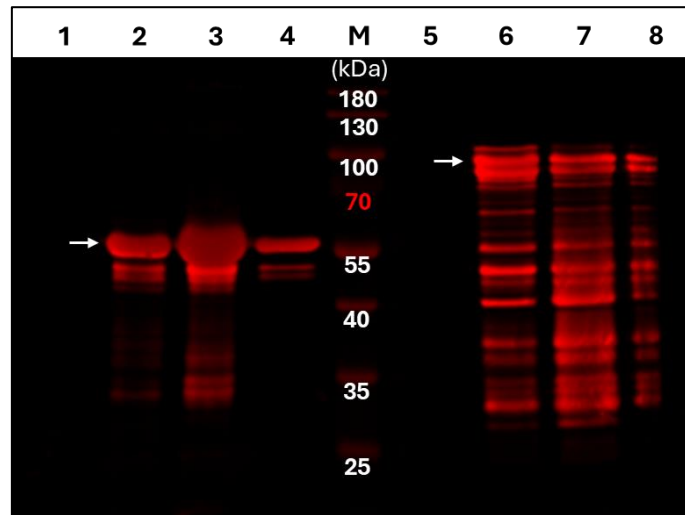
mintákban csak a kompetens sejt endogén fehérjéi láthatóak, addig az indukció utániakban már megjelentek a termelődött GbpC (kb. 50 kDa) és Antigen I/II (kb. 65 kDa) rekombináns fehérjék is. A GbpC affinitástisztítása után minimális mennyiségű, kisebb molekulaméretű termékeket is kaptunk, amiktől a puffercsere során alkalmazott 30 kDa-os áteresztési méretű szűrőmembránnal sikerült megszabadulnunk. Az AgI/II affinitástisztításakor kevesebb célmolekulát láttunk a megfelelő magasságban a GbpC-hez képest, és jelentős mértékű fragmentálódást figyeltünk meg, ami feltételezhetően már intracellulárisan megkezdődött, hiszen a feltárási puffer tartalmazott proteázinhibitorokat. A puffercserét követően a célfehérje tisztasága ez esetben is jelentősen javult (19. ábra).



19. ábra: A GbpC és Antigen I/II fehérjék expressziójának és tisztításának ellenőrzése. A fehérjék termelését és a tisztítási lépések egyes frakcióit 12%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélben, 1xLaemmli pufferben választottuk el. Az elválasztást követően a fehérjéket Coomassie-festéssel tettük láthatóvá, és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: Fehérje marker; 1-4: GbpC (nyíl) expresszió indukálás előtt, indukálás után, affinitástisztítás után, puffercsere után; 5-8: AgI/II (nyíl) expresszió indukálás előtt, indukálás után, affinitástisztítás után, puffercsere után.

A 6xHis-jelölt fehérjék jelenlétét Western blot technikával is igazoltuk. Ehhez a transzfert követően anti-polihisztidin elsődleges antitestet, majd fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestet használtunk. A fluoreszcenciát mutató minták megerősítik, hogy a promotor indukálásával a fúziós fehérjék expressziója megtörtént, továbbá az affinitástisztítás eredményeképpen hatékonyan izoláltuk a fehérjéket. A feltételezett AgI/II fragmentálódást igazolni látszik, hogy a detektált fehérjék többsége 6xHis-jelölést

tartalmazott (20. ábra). Habár az AgI/II ekkora mértékű fragmentálódása nem ideális, az aptamerszelekció és a kötődésvizsgálatok során elfogadható, mivel több kontraszelektációs fragmentum bemutatásával növelhető a GbpC-szelektív aptamerek találati esélye. Ezen eredmények alapján a termelt és tisztított fehérjéket felhasználhatónak ítéltük a további funkcionális vizsgálatokhoz.



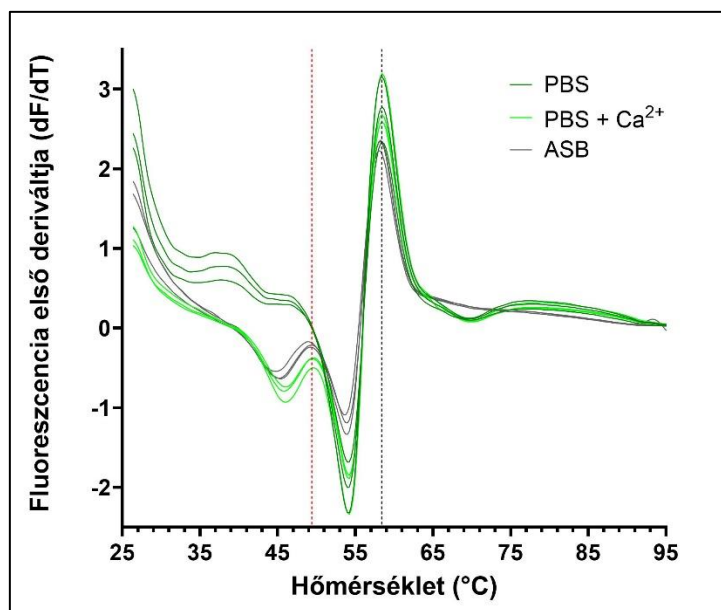
20. ábra: A GbpC és Antigen I/II fehérjék 6xHis-specifikus detektálása fluoreszcens immunoblottal. A fehérjék termelését és a tisztítási lépések egyes frakcióit 12%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélben, 1xLaemmli pufferben választottuk el. A Western blot-ot követően a fehérjéket vörös fluoreszkáló másodlagos antitestekkel tettük láthatóvá, és Odyssey készülékkel dokumentáltuk. M: Fehérje marker; 1-4: GbpC (nyíl) expresszió indukálás előtt, indukálás után, affinitástisztítás után, puffercsere után; 5-8: AgI/II (nyíl) expresszió indukálás előtt, indukálás után, affinitástisztítás után, puffercsere után.

4.3. A GbpC funkcionális vizsgálata

4.3.1. Termostabilitás Ca^{2+} jelenlétében

Mind az aptamerszelekcióhoz, mind a kölcsönhatás vizsgálatokhoz elengedhetetlen a funkcionális szerkezettel rendelkező fehérje, ezért kísérleteinket fiziológiásnak megfeleltethető mesterséges nyálpufferben végeztük. A kalciumion a GbpC ismert kofaktora, a megfelelő térszerkezet kialakulásának, így a glükánköti funkciójának szükséges feltétele. Azt, hogy a használt puffer, illetve a kalciumion jelenléte milyen hatással van a célfehérje stabilitására, termikus kihajtogatódási vizsgálatban (*thermal unfolding assay*) tanulmányoztuk.

A GbpC olvadási görbéinek analizéséből (21. ábra) megállapítható, hogy a fehérje olvadáspontja a vizsgált pufferoldatokban (PBS, PBS + Ca²⁺, 1xASB) számottevően nem változott, ezek rendre 58,4±0,1°C; 58,5±0,0°C és 58,2±0,1°C voltak. Azonban megfigyeltünk egy-egy különálló csúcsot is 49,6±0,1°C és 49,2±0,2°C-okon, amit kizárólag a kalciumion-tartalmú pufferek (PBS + Ca²⁺, 1xASB) mutattak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kalciumion jelenléte hozzájárul egy kisebb, de stabil szerkezeti egység kialakulásához, tehát a mesterséges nyáloldat megfelelően biztosítja a fehérje stabil, natívhoz közeli szerkezetét.

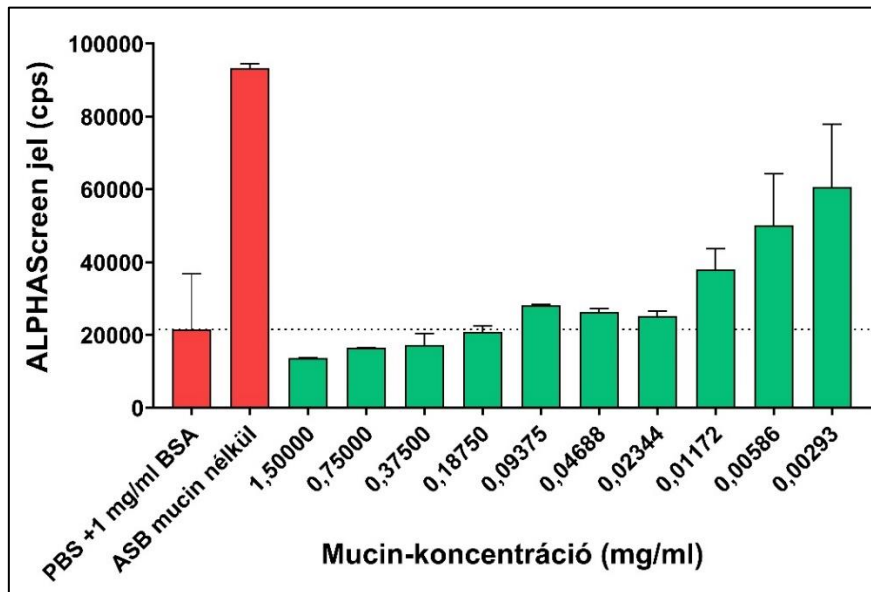


21. ábra: A GbpC fehérje olvadási görbéinek analízise. A hőmérséklet-emelkedés okozta fluoreszcencia-változást GloMelt festék jelenlétében QuantStudio 12K Flex RT-PCR készülékkel követtük nyomon. 10 µg GbpC fehérjét PBS (sötét zöld), PBS + Ca²⁺ (világos zöld) vagy ASB (szürke) pufferoldatokkal hígítottunk. A hőmérséklet szerinti első deriváltokról leolvasható a fehérje átlagos olvadáspontja $T_m = 58,4^\circ\text{C}$ -nál (fekete szaggatott), továbbá a Ca²⁺-jelenlétében megjelenő további csúcs $49,4^\circ\text{C}$ -nál (piros szaggatott). A diagram adatai a technikai ismétléseket ábrázolják (n=3).

4.3.2. Dextránkötő képesség

A GbpC funkcionális analizéséhez több kölcsönhatás-vizsgálati technikát is használtunk. Ehhez elsőként a munkacsoportunkba rutinszerűen alkalmazott ALPHAScreen eljárás egyes paramétereit kellett optimalizálnunk. Ilyen volt a mérések

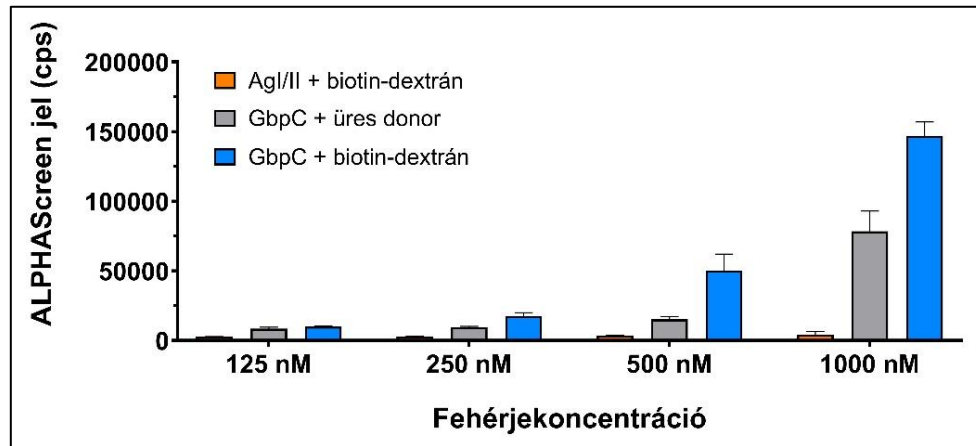
során használatos blokkoló fehérje koncentrációja. A blokkoló fehérje csökkenti a gyöngyök alapkölcsönhatása generálta fals pozitív háttérjelet, ezáltal javítja a jel/zaj arányt. A nyálalkotó mucin glikoproteinekből készített hígítási sorral összeállított mérésekben megállapítottuk, hogy a 0,1 mg/ml végkoncentrációban adott mucin a háttérrel olyannyira mérsékelte, mint amennyire a gyártói ajánlás szerinti 0,1% (1 mg/ml) BSA-tartalmú konvencionális PBS-puffer (22. ábra), így ez a beállítás optimálisnak bizonyult a következő mérésekhez.



22. ábra: A mucin-koncentráció optimalizálása ALPHA mérésekhez. A felező hígítási sor mucinból (1,5 mg/ml – 2,93 µg/ml) ASB-vel készítettünk. A keletkező kemilumineszcens jelet a donor és akceptor gyöngyökhöz 5 nM biotinilált-6xHis ligand hozzáadása után EnSpire készülékkel mértük. Piros: kontroll minták; zöld: mucin-tartalmú hígítási sor; szaggatott: PBS +1 mg/ml BSA-val mért jel. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=2).

Az ALPHA technikával végzett kísérletekben a GbpC funkcióképességét a természetes ligandját reprezentáló dextránnal (α -glükán) szemben mértük. Negatív kontrollként glükánkötő funkcióval nem rendelkező AgI/II fehérjét használtunk, aminek elsődleges szerkezete mérsékelt homológiát mutat a GbpC-vel (Függelék 12.1.). A kapott eredmények egyértelműen alátámasztották, hogy a kölcsönhatás GbpC-koncentrációfüggést mutat, míg a dextrán az AgI/II-vel alapjelet adott (23. ábra). Valamelyest meglepő volt, hogy dextrán hiányában, üres donor gyöngy esetén is

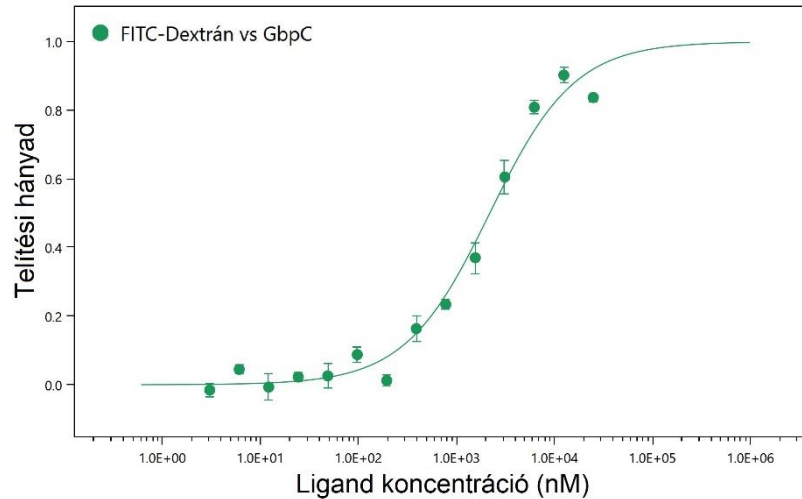
detektáltunk GbpC-függő kemilumineszcens jelnövekedést. Ezt a jelenséget megmagyarázhatja a gyártó szabadalmi leírásában [211] talált lehetséges összetevők felsorolása, miszerint a gyöngyök anyaga lehet többek között dextrans is.



23. ábra: A fehérjék dextransköti képességének vizsgálata ALPHA-val. A termelt és tisztított 6xHis-címkével rendelkező GbpC, valamint AgI/II fehérjék kölcsönhatását 15 nM biotinizált dextranszal szemben 0,1 mg/ml mucinnal kiegészített ASB-ben mértük. Az akceptor gyöngyök által generált kemilumineszcens jelet EnSpire készülékkel detektáltunk. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=2).

Ebből a technikai nehézségből adódóan célszerűnek láttuk a GbpC-dextrans kölcsönhatást további módszerekkel is jellemezni. Ilyen módszer volt a MST, amellyel immobilizálási és konjugálási lépések nélkül, natívhoz közeli körülmények között nyertünk információt a célfehérje dextrans iránti affinitásáról. A változó fehérjekoncentrációkhoz tartozó mérési pontokra illesztett görbe kismértékű szórással közel teljes telítésbe hajlik, így nagy biztonsággal megállapítható a kölcsönhatást jellemző egyensúlyi disszociációs állandó, ami $2,46 \pm 0,73 \mu\text{M}$ -nak adódott (24. ábra).

Ezen adatok együttesen megerősítették a tisztított célfehérje natív feltekeredését és aktív funkcióját, így lehetővé vált, hogy a GbpC-t, illetve az AgI/II-t mesterséges nyáloldatban előbb célfehérjeként a szelekcióhoz, majd azt követően az aptamerek vizsgálatához egyaránt alkalmazzuk.



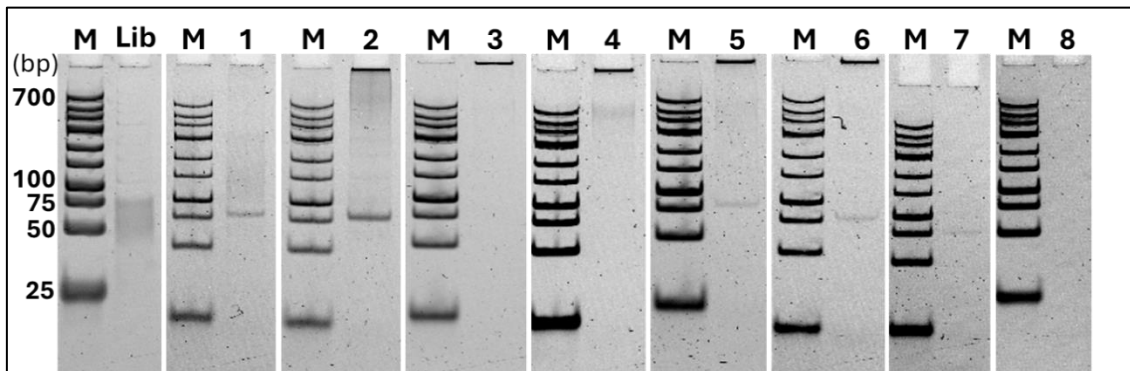
24. ábra: A GbpC-dextrán kölcsönhatás igazolása MST-vel. A GbpC fehérjéből készített hígítási sorral szemben mértük a FITC-jelölt dextránnal mutatott kölcsönhatást Monolith NT.115 készülékkel. A telítési görbe inflexiós pontjához tartozó fehérjekoncentráció érték az adott GbpC-dextrán kölcsönhatást jellemző disszociációs állandó ($K_D = 2,46 \pm 0,73 \mu\text{M}$) értékét adja meg. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják ($n=3$).

4.4. GbpC specifikus aptamerjelöltek szelekciója

A glükánkötő fehérje C a *Streptococcus mutans* sejtfalába rögzített, biofilmképzésében központi szerepet játszó szereplője. Az előbbieken bemutattuk a célfehérjeként felhasználni kívánt rekombináns változat stabilitását és funkcióképességét, amit a DNS aptamerszelekciónkhoz használtunk fel. A szelekciós körülményeket a fiziológiást imitáló környezethez igazítottuk, így különös figyelmet fordítottunk a szelekciós puffer (mesterséges nyáloldat) és a kontraszelekciós célpontok (Antigen I/II, *S. mutans* ΔGbpC törzs) megválasztására, mindezekkel elősegítve az aptamerek majdani felhasználhatóságát.

A szelekció során az amplifikációs lépéseket emulziós PCR-rel végeztük. A technika lényege, hogy az emulzióon belül különálló vizes mikrocseppekben biztosított a reakció lejátszódása, így a DNS templátok egymástól térben izolálva tudnak sokszorozódni. Ilyen módon hatékonyabb a részlegesen hasonló variábilis régióval rendelkező nukleinsav-szekvenciák amplifikálása a komplex DNS templátból kiinduló reakciókban. A SELEX során 8 pozitív szelekciós lépést végeztünk a GbpC célfehérjére, továbbá közbeiktattunk 2 esetben az AgI/II fehérjére és 1 esetben a ΔGbpC mutáns baktériumsejtekre végzett kontraszelekciós lépést. A specifikus aptamerjelöltek dúsulását

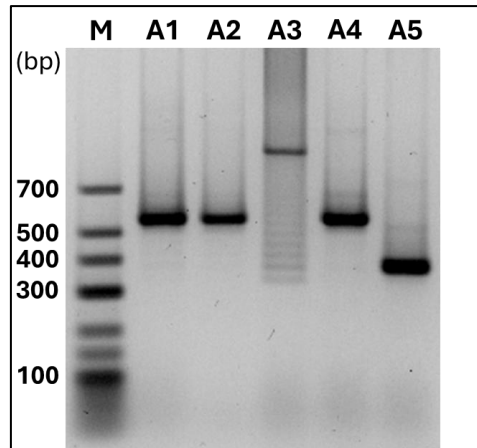
erősödő szelekciós nyomással biztosítottuk (Függelék 12.3.). A pozitív lépéseket követően a kettősszalú ePCR termékek mennyiségét spektrofotometriával, minőségét gélelektroforézissel ellenőriztük (25. ábra). A gélképek alapján megállapítható, hogy a várt 76 bázispár hosszú termékek a legtöbb ciklust követően detektálható mennyiségben megjelentek, míg erősebb szelekciós nyomás (3. ciklus), illetve egyes negatív lépések (4. és 8. ciklus) alkalmazása után csökkent mennyiségük, ami a szelekciós protokollunk jól tervezettségére utal.



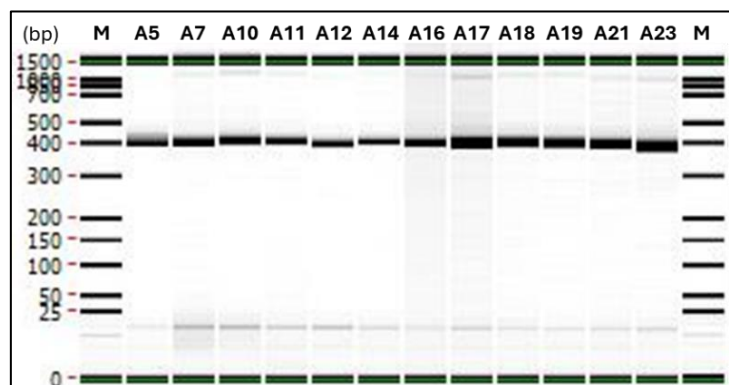
25. ábra: Az emulziós PCR termékek ellenőrzése poliakrilamid gélelektroforézissel. Minden pozitív szelekciós lépést követően a célmolekuláról eluált egyszálú aptamereket ePCR-ben amplifikáltuk, és a tisztított termékekből 5-5 μ l-t 10%-os poliakrilamid gélben, 1xTBE-ben választottunk el. Az elválasztást követően a gél GelGreen interkalálódó festékkel festettük, és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: Low Range DNS marker; Lib: kiindulási egyszálú DNS-könyvtár; 1-8: az egyes ciklusok után detektált 76 bp-os ePCR termékek.

Az utolsó ciklusokat követően a szűkített aptamerkönyvtárakat jelöletlen primerekkel, a nagy hűségű iProof DNS polimeráz segítségével amplifikáltuk, ezzel 3'-túlnyúló nukleotidmentes, tompavégű termékeket kaptunk, amiket pCR-Blunt II-TOPO vektorba klónoztunk. A megfelelő méretű kolónia PCR termékek alapján döntöttünk az adott kolónia, vagyis aptamerjelölt nukleinsav-szekvenálásra küldéséről. A pozitív klónok keresése során váratlan nehézségbe ütköztünk, ugyanis a SELEX-ből származó tesztelt kolóniák esetén 108-ból mindössze 70 mutatott megfelelő méretű terméket (26. ábra). Az agaróz gélben megfigyelhető mintázatok alapján a vektorok nem üresek voltak, hanem hibás méretű, repetitív szakaszokat tartalmazó termékeket mutattak. Ez az eredmény arra utal, hogy a hibás termékek már a klónozást megelőzően keletkeztek, aminek egy valószínű magyarázata, hogy az aptamerkönyvtár primerei a könyvtárral

részben komplementer szakaszokhoz tapadtak be és melléktermék-képződéshez vezettek. Az alacsony találati szám ellenére sikerült elegendő mennyiségű pozitív klónt detektálnunk a nagy mintaszám elemzésére alkalmas LabChip technikával (27. ábra), amik közül 55-öt Sanger-szekvenálásra küldtünk.



26. ábra: A TOPO-klónozás ellenőrzését bemutató reprezentatív agaróz gélkép. A kolónia PCR termék 5-5 µl-ét 1xTAE-val készített 2%-os agarózgélben elektroforézissel választottuk el. Az elválasztást követően a gél GelGreen interkalálódó festékkel festettük és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. Aptamer nem tartalmazó termék („üres” vektor) esetén 295 bp-os, míg megfelelő termék inszertálódása esetén 371 bp-os termékre számítottunk. M: Low Range DNS marker; A1;A2;A4: a számítottnál nagyobb, hibás méretű PCR termékek; A3: jellegzetes létrafokszerű, hibás méretű termék; A5: megfelelő méretű (371 bp) termék.



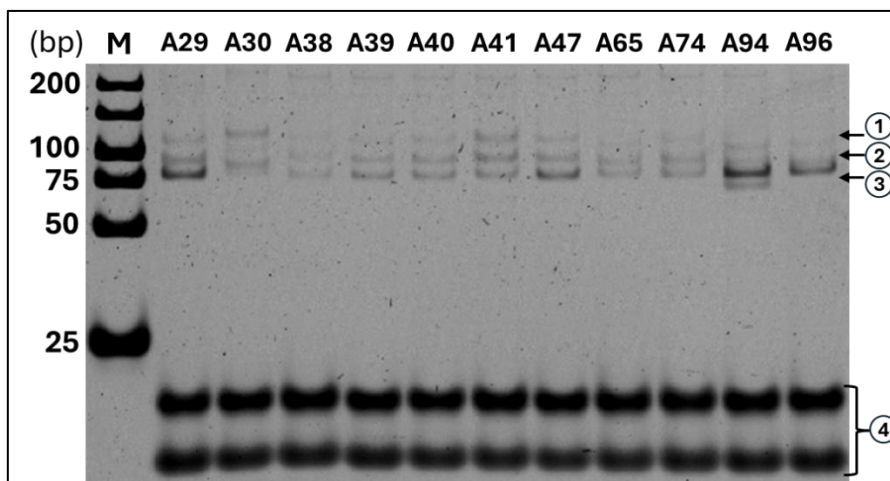
27. ábra: A megfelelő méretű kolónia PCR termékeket bemutató reprezentatív kapilláris elektroforézis eredménye. A szekvenálásra küldés előtt meggyőződünk az egyes aptamerjelöltek megfelelő méretéről. Praktikussági okokból ehhez a nagy áteresztő képességű LabChip készüléket használtuk.

A nukleinsav-szekvenálási eredmények elemzése során 42 egyedi nukleinsav-szekvenciát azonosítottunk. Ebből 6 (A32, A41, A49, A55, A57, A75) kétszer, 1 (A10) hatszor fordult elő. Ezeken túl megfigyeltük, hogy a kiindulási könyvtárból túlnyomóan citozinban gazdag oligonukleotidok dúsultak fel (Függelék 12.5.). A MEME online motívumkereső algoritmus megerősítette a könyvtárból nyert citozindús nukleinsav-szekvenciák felszaporodását, azonban kettőnél többször előforduló DNS motívumot nem találtunk.

Habár ezen nukleinsav-szekvenálási és motívumkeresési adatok az aptamerek dúsulását sugallják, további kvantitatív információt nem nyújtanak sem az aptamerjelöltek affinitásáról, sem azok szelektivitásáról. Annak érdekében, hogy meghatározzuk azokat a jelölteket, amelyek leginkább képesek specifikusan kötődni a GbpC-hez, *in vitro* kísérletekben teszteltük az összes egyedi nukleinsav-szekvenciával rendelkező oligonukleotidot.

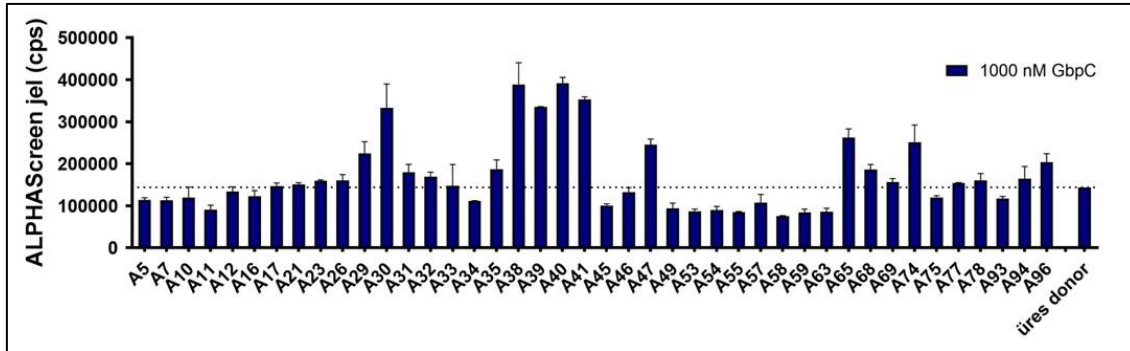
4.5. Aptamerjelöltek szűrése PBA-PCR-rel kombinált ALPHA-val

A teszteléséhez az összes egyedi aptamerjelöltet a munkacsoportunkban optimalizált és fejlesztett primer blokkolt aszimmetrikus PCR-rel állítottuk elő. A módszer nagy előnye, hogy az előszűrésekhez szükséges mennyiségben, laborkörülmények között, egyszerű és költséghatékony módon tudjuk létrehozni az egyszálú DNS molekulákat, a mérési technika igényétől függően gyakorlatilag bármilyen 5'-jelöléssel. A feleslegben adott reverz primer reverz komplementer (RC) oligonukleotidjának hozzáadásával biztosítható, hogy a PBA-PCR után az aptamer 3'-végéhez hibridizált blokkoló primer jelentős része disszociálódjon, ezáltal teljes hosszúságában egyszálú terméket kapunk, ami így a szelekció során kialakuló konformációját veheti fel a célmolekula jelenlétében.



28. ábra: PBA-PCR-rel előállított aptamerjelöltek reverz komplementer hozzáadását követően. Az amplifikált termékek 3-3 μ l-ét 10%-os poliakrilamid gélben, 1xTBE-ben elektroforézissel választottuk el. Az elválasztást követően a gél GelGreen interkalálódó festékkel festettük, és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: Low Range DNS marker; A29-A96: aptamerjelöltek PBA-PCR termékei. ①: részlegesen egyszálú DNS, ②: teljesen egyszálú DNS, ③: kétszálú DNS, ④: primerek, dimerek.

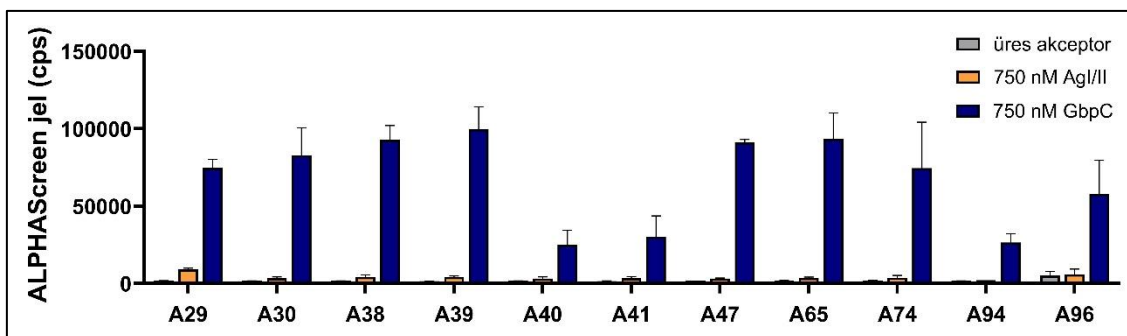
Munkacsoportunkban mára rutinszerűen használt ALPHA mérésekhez a tesztelni kívánt aptamerjelölteket 5'-biotin forward primerekkel, továbbfejlesztett PBA-PCR segítségével állítottuk elő. A reverz komplementer oligonukleotid feleslegben történt hozzáadása után rendszerint tapasztalható, hogy a blokkoló primer leszorítása nem teljes, így a gélelektroforézist követően részlegesen egyszálú PBA-PCR termék is detektálható. Ez a jelenség szekvenciafüggő mintázatot eredményezett a gélképen (28. ábra), ami összhangban volt korábbi megfigyeléseinkkel (Függelék 12.4.). Tervezett ALPHA méréseinkben 42 egyedi szekvencia affinitását mértük 500 nM és 1000 nM GbpC-vel szemben. Az affinitásokat bemutató oszlopdiaagramból kitűnik, hogy a vizsgált 42 szekvenciából 11 (A29, A30, A38, A39, A40, A41, A47, A65, A74, A94, A96) erősebb kötődést mutatott a célmolekula iránt, mint a szekvenálás után kapott többi jelölt (29. ábra). Ez az erősebb kötődés a GbpC funkcionális tesztelése során, az üres donor gyönggyel tapasztalt kölcsönhatást meghaladó kötődés volt, így ezektől az aptamerjelöltektől valós és jelentős affinitást vártunk.



29. ábra: Az összes egyedi szekvencia affinitásvizsgálata ALPHA-val. A 6xHis-címkével rendelkező GbpC kölcsönhatását PBA-PCR-rel előállított aptamerrel szemben mértük. Az akceptor gyöngyök által generált kemilumineszcens jelet EnSpire készülékkel detektáltunk. A szaggatott vonal a GbpC üres donor gyönggyel adott jelet mutatja. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=2).

Az affinitásuk mellett kíváncsiak voltunk arra is, hogy mennyire szelektívek az előszűrt aptamerjelöltek. Ebből kifolyólag a legjobb tizenegy jelölt specifikusságát újabb ALPHA mérésekben vetettük össze. A GbpC célmolekula mellett a biofilmképződésben szintén résztvevő, kontraszelektív AgI/II fehérjét, továbbá fehérje nélküli Ni^{2+} -borított akceptor gyöngyöket használtuk negatív kontrollként. Az eredmények tanúsága szerint az aptamerjelöltek egyértelműen, nagyságrendekkel erősebb affinitást mutattak a GbpC célmolekula iránt, mint a szerkezetileg analóg AgI/II-vel vagy a csupasz Ni^{2+} -akceptor gyönggyel (30. ábra).

A PBA-PCR-rel kombinált ALPHAScreen mérési eredményeink megerősítették az Antigen I/II-t használó kontraszelektív lépéseink relevanciáját és sikerét a szelekció során, továbbá rámutattak arra a 11 aptamerre, amelyek érdemesek további karakterizálási vizsgálatokra és végül alkalmassá válhatnak a biofilmképződés gátlására.



30. ábra: A legjobban kötődő aptamerjelöltek specifikusság vizsgálata ALPHA-val. A 6xHis-címkével rendelkező GbpC (kék), AgI/II (narancs) és fehérje nélküli kontroll (szürke) kölcsönhatásokat PBA-PCR-rel előállított aptamerekkel szemben mértük. Az akceptor gyöngyök által generált kemilumineszcens jelet EnSpire készülékkel detektáltunk. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=2).

4.6. Aptamerek karakterizálása

4.6.1. Kinetikai vizsgálatok

Az előszűréseket követően meghatároztuk azokat az aptamerjelölteket, amiket további, az ALPHA-tól eltérő kölcsönhatás vizsgálati technikával is karakterizálni kívántunk. Az (A30, A39, A65, A96) jól és (A58) gyengén kötő aptamerek kötődési kinetikájának meghatározásához BLI méréseket végeztünk. A mérésekhez 5'-biotin-TEG jelöléssel ellátott, szintetikus úton előállított aptamereket használtunk, amiket sztreptavidinnel borított szenzorfelületre immobilizáltunk. Az aptamerrel módosított szenzorokat ezután GbpC hígítási sorozatot tartalmazó oldatba merítettük, és követtük az asszociációs, disszociációs és mosási lépések alatt mérhető rétegvastagság-változását. A kinetikai paramétereket (14. táblázat) elemezve megállapítottuk, hogy a vizsgált aptamerek többsége (A30, A39, A65, A96), továbbá a természetes ligandnak tekintett biotinizált dextrán esetén a kölcsönhatásokat jellemző asszociációs sebességi állandók egy nagyságrendbe esnek (k_a : $1,177e(+3)$ – $5,363e(+3)$ [1/Ms]), vagyis a GbpC megkötése hasonlóan nagy sebességgel történik. A K_D -t meghatározó másik tagban, a disszociációs sebességi állandóban az aptamerek alig különböznek (k_d : $2,362e(-3)$ – $9,974e(-3)$ [1/s]), alacsony mikromólos K_D -értékeket eredményezve. Ezekből jelentősen eltér az A58-as szekvencia asszociációs kinetikája (k_a : $6,47e(+1)$ [1/Ms]), ami egybevág az aptamerek előszűrésénél mért alacsony affinitásával és a BLI-vel mért relatíve magas K_D értékével ($K_D(A58)$: 139 μ M). A dextránnal mérték szerint egységnyi idő alatt arról

több fehérjemolekula disszociálódik, ami a legjobban kötő aptamerekhez képest ($K_D(\text{A39})$: 5,7 μM és $K_D(\text{A96})$: 0,4 μM) magasabb K_D -hoz vezetett ($K_D(\text{dextrán})$: 13,69 μM).

Összességében, a BLI-vel kapott adatok azt mutatták, hogy a legtöbb vizsgált aptamer erősebb komplexet alkotott a célfehérjével, mint a dextrán, továbbá megerősítést nyertek a PBA-PCR-rel kombinált ALPHA technikával kapott előszűrési eredményeink.

14. táblázat: A dextrán-GbpC és az aptamer-GbpC kölcsönhatások kinetikai paraméterei.

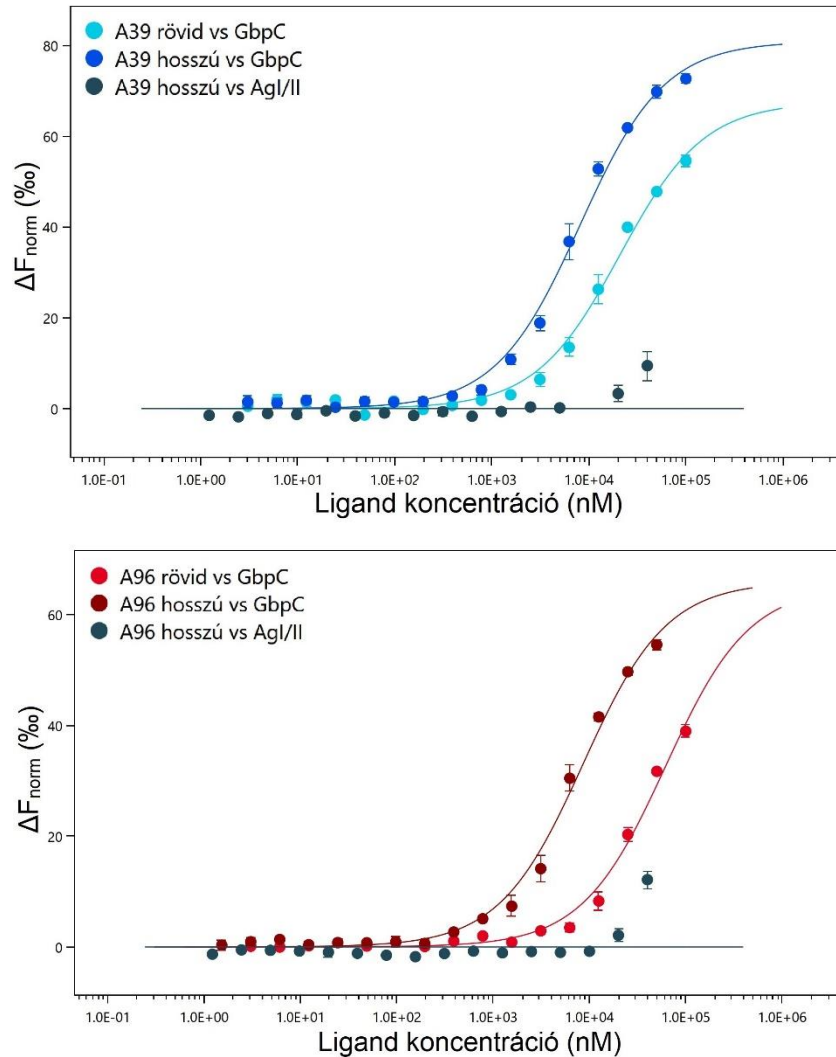
A mért asszociációs (k_a) és disszociációs (k_d) sebességi állandók és a hányadosukból számított egyensúlyi disszociációs állandók (K_D) megerősítik a vizsgált biomolekulák és a GbpC közötti kölcsönhatást, mérsékelt eltérések (error) és magas görbeillesztési pontosság (R^2) mellett.

	k_a [1/Ms]	k_a error	k_d [1/s]	k_d error	R^2	K_D [M]
dextrán	1.177e(+3)	6.37e(-3)	1.612e(-2)	4.271e(+2)	0.9931	1.369e(-5)
A30	1.629e(+3)	4.5e(+1)	9.974e(-3)	1.785e(-4)	0.9935	6.122e(-6)
A39	1.472e(+3)	3.824e(+1)	8.371e(-3)	2.11e(-4)	0.9954	5.687e(-6)
A65	1.229e(+3)	3.955e(+1)	9.335e(-3)	1.897e(-4)	0.9932	7.598e(-6)
A96	5.363e(+3)	1.495e(+2)	2.362e(-3)	1.09e(-4)	0.992	4.405e(-7)
A58	6.47e(+1)	1.486e(+1)	8.963e(-3)	1.782e(-4)	0.9876	1.385e(-4)

4.6.2. Primerrégiók hatása és kompetíciós vizsgálatok

Mind az ALPHA, mind a BLI legalább az egyik kölcsönható partner immobilizálását igényli, ami hatással lehet az aptamerek konformációjának kialakulására. Ez okból úgy döntöttünk, hogy a BLI mérések alapján legígéretesebb aptamerek (A39, A96) és a célmolekulák (GbpC, Antigen I/II) között kialakuló kölcsönhatást MST módszerrel is demonstráljuk. Ezekben a kísérletekben arra is választ kerestünk, hogy a teljes, 76 bázishosszúságú aptamer vagy annak primerrégiók nélküli, rövidebb formája rendelkezik-e nagyobb affinitással a GbpC iránt. Ugyanis egyes aptamer-célmolekula kölcsönhatás kialakulásakor ismert jelenség, hogy a kötődésért az aptamer variábilis régiójában megtalálható DNS-motívum a felelős és a primerrégióknak nincs hatása a kötődésre. A motívumok azonosításával esély nyílik a kötőhelyek feltérképezésére, a kötődési mechanizmus jellemzésére és adott esetben az affinitás növelésére, amelyek mind hozzájárulhatnak a funkcionális aptamerek hatékonyabb felhasználásához.

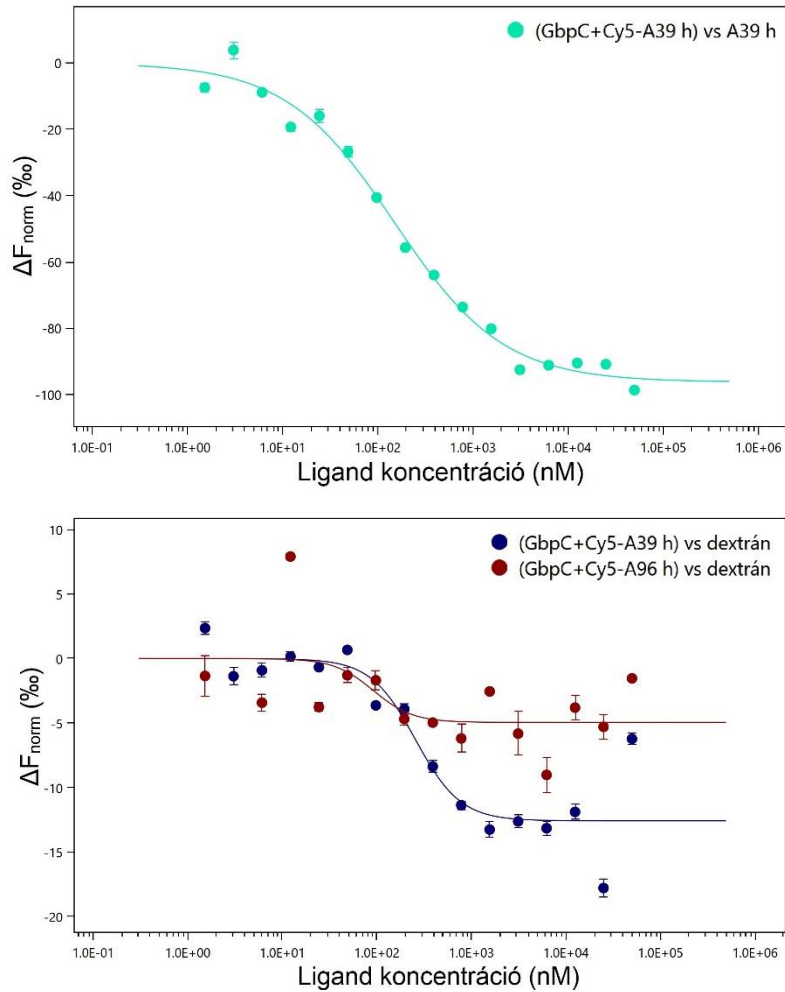
Az MST mérésekhez 5'-Cy5 fluoreszcens módosítással ellátott aptamereket és azok primerrégiók nélküli, rövidebb változatát használtuk. Kötődésüket GbpC és Antigen I/II hígítási sorokkal szemben mértük (31. ábra). A telítési görbék tanúsága szerint mindkét aptamer (A39, A96) kötődik a GbpC-hez, azonban az AgI/II-vel nem detektáltunk kötődést adott mérési körülmények között. Következésképp kijelenthető, hogy a vizsgált aptamerek szelektíven felismerik a célmolekulát, ami az aptamerszelekciók sikerességét jelzi, valamint megerősíti a korábbi ALPHA és BLI mérésekből származó eredményeinket. Az illesztett görbék inflexiós pontjaiból leolvasható K_D -értékek összehasonlítása azt is sejteti, hogy az aptamerek primerrégiói jelentős szerepet játszanak a célfehérjéhez való kötődésben, vagyis jelenlétük lényeges eleme lehet az aptamer-fehérje komplex kialakulásának. Ezt a feltételezést az bizonyítja, hogy az egyensúlyi disszociációs állandók primerrégiók hiányában az A39 esetén $8,09 \pm 0,68 \mu\text{M}$ -ról $19,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$ -ra, az A96 esetén $8,50 \pm 0,88 \mu\text{M}$ -ról $66,9 \pm 11,9 \mu\text{M}$ -ra nőttek.



31. ábra: Az A39 és A96 aptamerek affinitásának vizsgálata MST-vel. A GbpC és AgI/II fehérjékből készített hígítási sorokkal szemben mértük a Cy5-jelölt hosszú és primerrégiók nélküli rövid szintetizált aptamerekkel mutatott kölcsönhatást Monolith NT.115 készülékkel. A telítési görbe inflexiós pontjához tartozó fehérjekoncentráció érték az adott kölcsönhatást jellemző disszociációs állandó (K_D) értékét adja meg. A GbpC-vel szemben számított K_D értékek az A39 hosszú és rövid (fent, sötét és világos kék) esetén rendre $8,09 \pm 0,68 \mu\text{M}$ és $19,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$, míg az A96 hosszú és rövid (lent, sötét és világos vörös) esetén rendre $8,50 \pm 0,88 \mu\text{M}$ és $66,9 \pm 11,9 \mu\text{M}$. Az AgI/II-vel (szürke) nem detektáltunk kölcsönhatást. A diagramok adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják ($n=3$).

A MST technika lehetőséget kínál kompetíciós kísérletek összeállítására is. Ezekben már igazolt kölcsönható partnerek ugyanazon célmolekulához történő egyidejű kötődését detektálhatjuk. Tekintve, hogy eddigi eredményeink alapján mind a dextrán, mind az A39 és A96 aptamerek szelektíven kötődtek a GbpC-hez, ily módon az előbbi feltételnek eleget tesznek, ezért megkíséreltük igazolni a molekulák versengését. Ehhez elsőként a már bizonyítottan kötődő A39-es aptamer autokompetícióját vizsgáltuk, amihez a Cy5-jelölt primerrégiókkal rendelkező (hosszú) aptamert konstans mennyiségben előinkubáltuk GbpC-vel, majd a kialakult komplexet jelöletlen A39-es (hosszú) aptamer hígítási sorral szemben titráltuk (32. ábra, fent). A telítési görbe lefutása igazolta, hogy a jelöletlen A39 koncentrációfüggő változást okoz a fluoreszcens aptamer és GbpC komplex termoforetikus tulajdonságaiban, vagyis megtörténik a jelöletlen A39 kötődése, és így az kompetícióban áll a fluoreszcensen jelölt változatával.

Az autokompetíciós előkísérletek sikere után megvizsgáltuk azt is, hogy a fluoreszcensen jelölt A39 vagy A96 aptamerrel előinkubált GbpC-re milyen hatással van a dextránnal történő titrálás (32. ábra, lent). A telítési görbéken megfigyelhető enyhe csökkenés a dextrán kötődését jelzi, azaz mind az adott aptamer, mind a dextrán verseng a GbpC-ért, ami a vizsgált aptamerek glükánkötést gátló potenciálját vetíti elő. Bár ezek az eredmények azt mutatják, hogy az aptamerek képesek lehetnek csökkenteni a GbpC glükánkötő képességét, ezáltal mérsékelhetik a biofilmképződést, további vizsgálatokra van szükség a gátlás módjának tisztázásához és az aptamerek pontos kötőhelyének azonosításához.



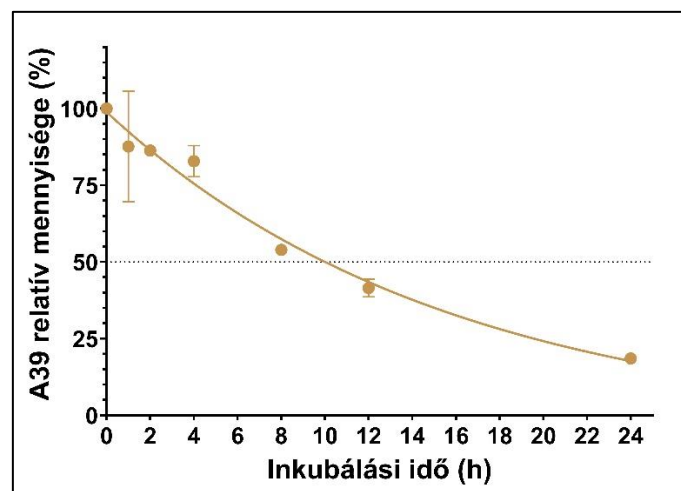
32. ábra: Kompetíciós vizsgálatok MST-vel. Az A39 aptamerrel igazolt autokompetíció (fent, türkíz) után az A39 és az A96 (lent, kék és vörös) aptamerek a dextránnal szemben mutattak versengést a GbpC iránt, ami a szelektált aptamerek glükánkötést gátló potenciáljára utal. A diagramok adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=3).

4.6.3. A39-es aptamer stabilitása

A választott jól kötődő aptamerek funkcionális vizsgálatát megelőzően szeretnénk volna képet kapni arról, hogy a szelektált aptamereink biológiai rendszerben mennyire maradnak intaktak. Az aptamerek a biofilm gátlási vizsgálatokban több órán keresztül inkubálódnak együtt baktériumokkal, szaporodáshoz és biofilmképződéshez ideális körülmények között, ennek köszönhetően kitéttek az anyagcserefolyamatok, illetve az extracelluláris nukleázok hatásainak.

A stabilitásvizsgálathoz az A39-es aptamert terminális jelölések nélkül $2 \mu\text{M}$ -os végkoncentrációban vad típusú *S. mutans* UA130 törzsszel beoltott biofilmképző

tápoldatban inkubáltuk – a *biofilm assay*-vel megegyező módon – és adott időközönként egységnyi térfogatú mintákat vettünk, amikből az aptamer relatív mennyiségét qPCR-rel határoztuk meg. Az inkubálás kezdetén vett mintából nyert mennyiséget tekintettük 100%-nak, amihez viszonyítottuk az időben később vett minták aptamertartalmát (33. ábra). A nem-lineáris regressziót követően meghatározott A39-féléletidő 10,86 óra volt, ami azt jelenti, hogy a 16 órás biofilm gátlási kísérletek túlnyomó része alatt elegendő mennyiségben volt jelen az aptamer, vagyis biztonsággal használható volt az aptamerek biofilmgátló hatásának vizsgálatát célzó kísérleteinkhez.



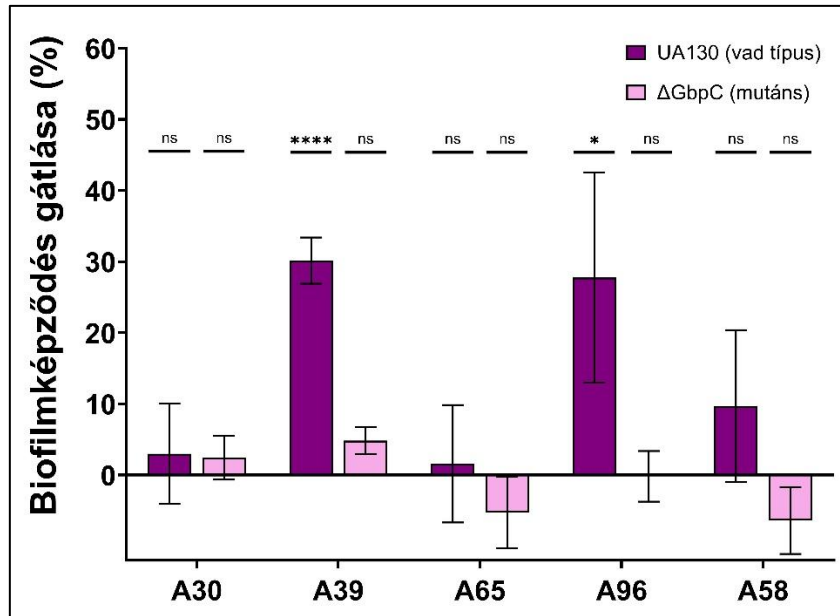
33. ábra: Az A39 aptamer stabilitásának vizsgálata sejtes rendszerben. Az aptamer mennyiségét vad típusú *S. mutans*-szal beoltott biofilmképző tápoldatból vett mintákból $t_0 + 1$ h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h időpontokban QuantStudio 3 qPCR készülékkel mértük. A 2 μ M-os kiindulási oligonukleotid féleletideje adott körülmények között 10,86 óra volt. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják. A görbeillesztéshez és a féleletidő meghatározáshoz egyfázisú bomlási modellt használtunk ($n=3$).

4.7. Aptamerek biofilmgátló hatásának vizsgálata

A GbpC szerepe a *S. mutans* biofilm poliszacharid vázának integritásában esszenciális, ezért kiválóan alkalmas olyan aptamerszelekció célpontjának, aminek célja a biofilmképződés gátlása. Eddigi eredményeink igazolták, hogy a GbpC-re szelektált aptamerek szelektíven, jó affinitással ismerik fel ezt a célmolekulát, továbbá néhányuk kompetícióban van a fehérje természetes ligandjával. Ezek a tulajdonságok azonban csak szükséges feltételei egy gátló aptamer azonosításának. A gátló hatás teszteléséhez

funkcionálisan is jól teljesítő aptamerekre volt szükségünk, amiket biofilm gátlási kísérletekben (*biofilm assay*) vizsgáltunk. A képződött biofilm mennyiségét klasszikus festési eljárással ellenőriztük. A kristályibolyát hagyományosan a Gram-festés elsődleges reagenseként használják, ami kálium-jodidos jódoldattal történő kezelés után csapdába esik a baktériumsejt peptidoglikán rétegeiben, és onnan Gram-pozitív baktérium esetén alkoholos mosást követően sem mosódik ki. A biofilmképző baktériumok esetén a kristályibolya a sejtfa komponensein kívül egyéb extracelluláris mátrixalkotókhoz is kötődik, ezáltal általánosan alkalmazható festék biofilmképződés kvantifikálására.

A biofilm gátlási kísérletekhez négy jól (A30, A39, A65, A96) és egy gyengén (A58) kötődő aptamert választottunk és adtuk szacharózzal kiegészített, *S. mutans* vad típusú vagy GbpC-hiányos mutáns törzset tartalmazó tápoldathoz, majd a festési protokollt követően a mért abszorbancia értékeket a kezeletlen mintáéhoz viszonyítottuk (34. ábra). A normalizált eredmények alapján megfigyeltük, hogy az A39 és A96 – a kölcsönhatás vizsgálatokban legjobban teljesítő – aptamerek számottevően, csaknem 30%-kal csökkentették a vad típusú *S. mutans* biofilm mennyiségét a kezeletlen mintákhoz képest. Ezzel szemben az A30, A65 és A58 aptamerek nem mutattak szignifikáns gátló hatást, aminek egy lehetséges magyarázata, hogy az előbbiektől eltérő kötőhelyekre szelektálódtak, illetve degradálódtak a sejtekkel történő inkubáció során. Kiemelendő, hogy a Δ GbpC mutáns törzs kezelése során egyik aptamernek sem volt szignifikáns gátló hatása a biofilmképződésre, ami a kiválasztott aptamerek nagyfokú specifikusságát jelzi.

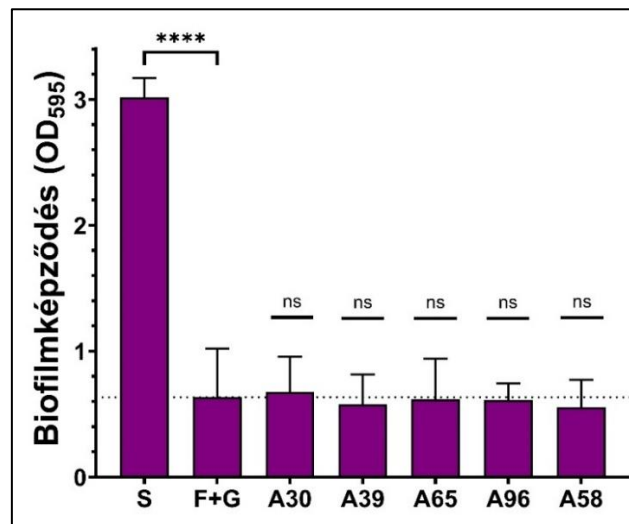


34. ábra: Az aptamerek hatása a biofilmképződésre szacharóz jelenlétében. Biofilmképző tápoldatban növesztett *S. mutans* vad típusú vagy GbpC-hiányos mutáns törzsekhez aptamereket adtunk, majd kristályibolyával végzett festés után a biofilm mennyiségével arányos abszorbanciát ClarioStar készülékkel mértük. Az A39 és A96 aptamerek közel 30%-kal csökkentették a biofilm mennyiségét kezeletlen mintához képest. A diagram adatai a biológiai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=5). A statisztikai elemzést kétmintás t-próbával végeztük ([ns]: nem szignifikáns; [*]: $p < 0,05$; [****]: $p < 0,0001$)

Tekintettel a kompetíciós vizsgálataink eredményeire, amelyek azt mutatták, hogy a vizsgált aptamerek a GbpC glükánkötő-képességét csökkentő potenciállal rendelkeznek, azt feltételeztük, hogy az aptamerek szacharóz hiányában nem képesek hatékonyan gátolni a biofilmképződést, mivel ebben a tápközegben a baktériumsejtek glükózil-transzferáza által biztosított glükántermelés minimális. Ennek a feltételezésnek az igazolására a fent említett biofilmgátlási vizsgálatot vad típusú sejtekkel szacharóz hiányában, fruktóz- és glükóztartalmú tápoldatban is elvégeztük. A mérési eredmények alapján a kezeletlen szacharóztartalmú tápoldathoz képest közel ötödére csökkent a biofilm mennyisége a fruktóz- és glükóztartalmú kezeletlen mintában, ami jelzi a diszacharid jelenlétének fontosságát a glükánalapú biofilm felépítésében. Az aptamerek hozzáadása azonban nem mutatott további szignifikáns csökkenést a biofilmképződésben a fruktóz- és glükóztartalmú kezeletlen mintákhoz képest (35. ábra). Ez azt sugallja, hogy az A39 és A96 aptamerek a glükán-GbpC kölcsönhatás befolyásolásával gátolhatják a

biofilmképződést. Elméletünk maradéktalan kísérletes bizonyítását azonban egzakt szerkezetvizsgálati mérésekben – úgymint röntgenkristallográfia vagy krio-elektronmikroszkópia – látjuk megvalósíthatónak.

A funkcionális vizsgálatokból nyert adatok alátámasztották az aptamerszelekciók sikerességét, ezenfelül rávilágítottak a szelektált aptamerek alapos elemzésének fontosságára, ami által azonosítani tudtuk az alkalmazás szempontjából leghatékonyabban működő szekvenciákat. Jóllehet, ezek az eredmények a biológiai rendszerekre jellemző szórással rendelkeznek, a megelőző kölcsönhatás vizsgálatok eredményeinek fényében az A39 és A96 aptamerek gátló hatásának potenciálját alátámasztottnak látjuk.



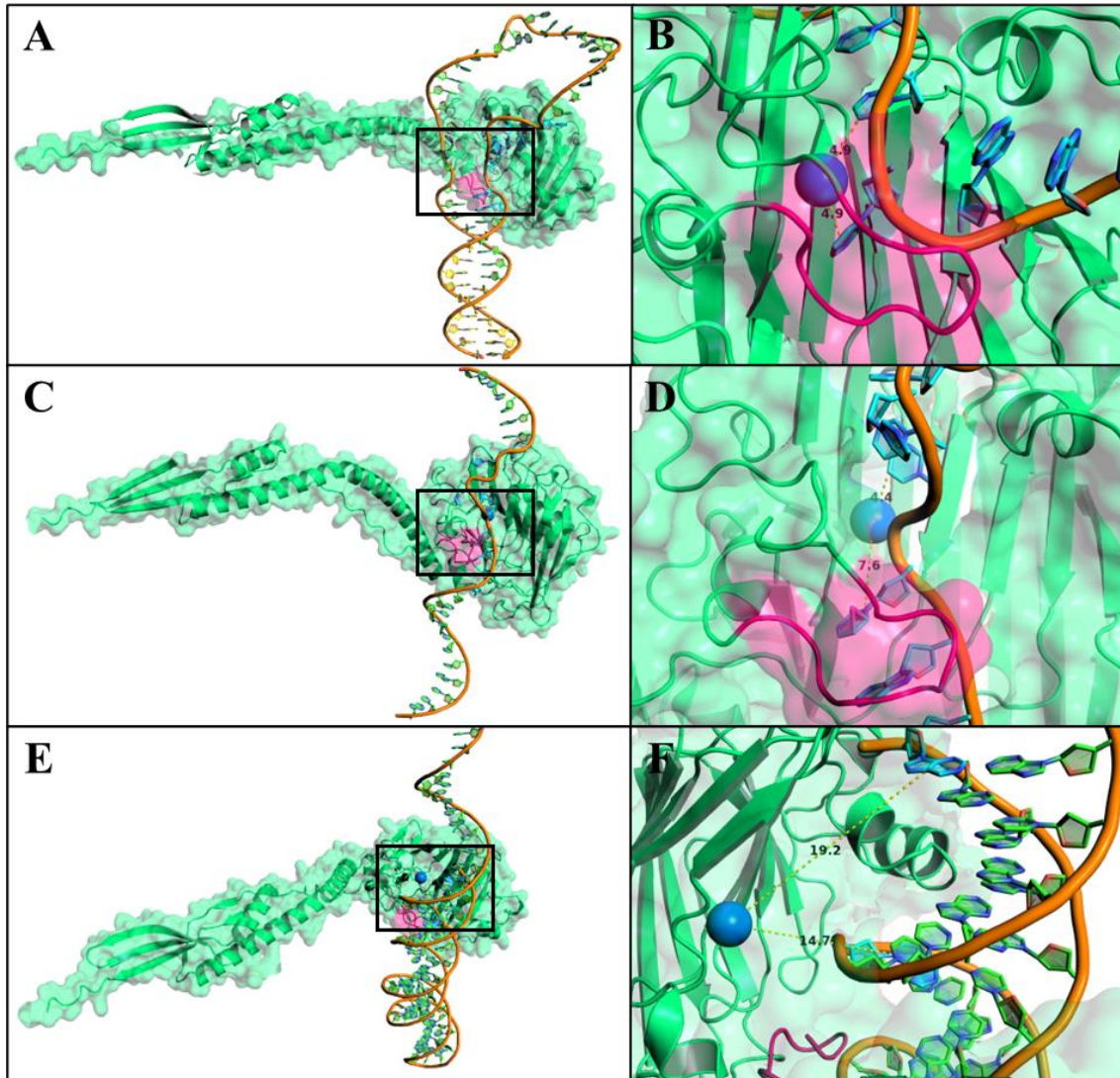
35. ábra: Az aptamerek hatása a biofilmképződésre szacharóz hiányában. Fruktózzal és glükózzal kiegészített BHI tápoldatban növesztett *S. mutans* vad típusú törzset aptamerekkel kezeltünk, majd kristályibolyával végzett festés után a biofilm mennyiségével arányos abszorbanciát ClarioStar készülékkel mértük. A szacharóztartalmú kezeletlen mintához (S) képest a fruktóz- és glükóztartalmú kezeletlen tápoldatban (F+G) szignifikánsan kisebb biofilm mennyiséget tapasztaltunk, azonban ezt nem csökkentette tovább egyik aptamer hozzáadása sem. A diagram adatai a technikai ismétlések átlagait és azok szórását ábrázolják (n=4). A statisztikai elemzést kétmintás t-próbával végeztük ([ns]: nem szignifikáns; [****]: p < 0,0001)

4.8. GbpC-aptamer prediktált modellek értékelése

A biomolekulák szerkezetét modellező mai modern számítógépes alkalmazások segítségével prediktálhatóvá, illetve vizsgálhatóvá váltak egyes kölcsönható partnerek mindeddig megfejtetlen komplexei. Az elemzést megkönnyíti, hogy a hozzáférés online, általában ingyenes, a felület átlátható és programozói tudást nem igényel, továbbá a számítást végző algoritmusok esetenként gépi tanulással folyamatosan fejlesztés alatt vannak. Az AlphaFold 3 minden eddiginél nagyobb pontossággal képes fehérje-ligand, fehérje-fehérje, illetve fehérje-nukliensav kölcsönhatások modellezésére, amely tulajdonságát munkánk során a GbpC-aptamer komplexek vizsgálatára használtuk fel. A molekulakomplexek felderítésével az előzetes méréseink eredményeiből adódó kérdéseinkre szerettünk volna választ kapni; mi lehet az oka annak, hogy az aptamerek rövid, illetve hosszú formája között jelentős affinitásbeli különbséget mértünk, továbbá mi magyarázhatja azt, hogy egy jól kötődő aptamer nem produkált biofilmképződést gátló hatást?

Az A39 rövid, illetve hosszú variánsok GbpC-vel közös szerkezetpredikációjából kitűnt, hogy az aptamerek egyes szakaszai a GbpC Ca^{2+} -kötőhelyéhez közel alakítanak ki kapcsolatot a fehérjével (36/A,B,C,D. ábra). A kalciumion kötése a feltételezett glükánkötő zsebben történik, ebből fakadóan az aptamerek közelsége ehhez a régióhoz potenciálisan hozzájárul mind a GbpC-aptamer kölcsönhatás, mind a biofilmgátló hatás kialakulásához. Feltűnt számunkra az is, hogy amíg a teljes hosszúságú A39-es aptamer kötőmotívumán kívül eső bázisok egymással részlegesen hibridizálnak és ezzel egy stabilabb hajtú szerkezetet hoznak létre, addig a rövidebb változat egyszálú formában, jóval mobilisebb struktúrát vesz fel. A rövid változat ezzel kevésbé stabil komplexet alkot a GbpC-vel, amit az MST-vel kapott K_D -értékek tükrében igazoltnak látunk.

Megvizsgálva az A30-GbpC prediktált komplexet azt találtuk, hogy ez esetben az aptamer 3'-túlnyúló véggel rendelkező helikális szerkezetet vesz fel, amely szerkezet a glükánkötő zseben kívül és a Ca^{2+} -kötőhelytől távolabb helyezkedik el (36/E,F. ábra). Habár méréseink alapján az A30 is specifikus és jó affinitást mutató aptamer, a biofilm képződésére nem volt hatással, amit alátámasztani látszik a glükánkötő zsebtől becsült távolabbi pozíciója. Ez összhangban van sejtésünkkel is, miszerint az A30 kölcsönhatásban résztvevő DNS-szakasza a GbpC vélhetően más epitópjához kötődik.



36. ábra: A GbpC-aptamer komplexek prediktált szerkezete. Az aptamerek (narancs) közül az A39 hosszú (A) és rövid (C), valamint az A30 (E) GbpC-vel (zöld) alkotott közös komplexét ábráztuk. A nagyított régiókban (keretezett) a glükánkötő zsebet fedő hurokstruktúra (magenta) közelében található Ca^{2+} (kék) és az aptamerbázisok közötti legrövidebb becült távolságokat jelöltük, amik az A39 hosszú (B) és rövid (D) szekvenciák esetén rendre 4.9 Å, illetve 4.4-7.6 Å, míg az A30 (F) esetén 14.7-19.2 Å közé estek. A predikciókat AlphaFold 3-mal készítettük és a kapott szerkezeteket PyMol (v3.1) programmal vizualizáltuk.

A prediktált molekulakomplex-szerkezetek jóságát az AlphaFold szerver számítása több pontszámmal is jellemezi [65]. Ezek közül a pTM (*predicted Template Modelling*) megadja, hogy a teljes predikció mennyire lehet hasonló a valós szerkezethez képest. Amennyiben a pTM > 0.5, a jósolt komplex szerkezete nagy valószínűséggel hasonlít az elméletileg valós komplex szerkezetére. A GbpC-aptamer prediktált

komplexek mindegyikére igaz, hogy $pTM \in [0.65;0.70] > 0.5$, tehát valamennyi szerkezetjósítás megfelelő biztonsággal hasonlítható a valódihoz. Egy további pontérték a pLDDT (*predicted Local Distance Difference Test*), ami a molekulát alkotó monomerek (aminosav vagy nukleotid) lokális megbízhatóságának 0-100 közötti mérőszáma. A predikciókban a GbpC monomerjei általánosan magas-nagyon magas (70-100) pLDDT-vel voltak jellemezhetőek, azonban az A39 aptamer esetén ez az érték csak alacsony-közepesen magas (50-90), míg az A30 aptamer esetén nagyon alacsony-alacsony értéket (0-70) mutatott. Az alacsonyabb pLDDT értékek arra utalnak, hogy az adott molekularégió vagy rendezetlen szerkezetű, vagy az AlphaFold nem rendelkezik elegendő információval ahhoz, hogy megbízható predikciót készítsen.

Összességében a predikciókból kapott adatokról elmondható, hogy a vizsgált GbpC-aptamer komplexek felderítését támogató szerkezeti modelleket kaptunk, amelyek kísérletes eredményeinken alapuló feltevéseinket megerősítették. A jelenleg elérhető AlphaFold 3-as verziója az összetett pontozási rendszerével a kísérletes szerkezetfelderítést ugyan nem helyettesíti, mindazonáltal a jövőbeni fejlesztésektől minőségi javulást várhatunk, amik az aptamerszelekció utáni vizsgálatokat is új szintre emelhetik.

5. Megbeszélés

5.1. A megfelelő szelekciós célmolekula alkalmazásának jelentősége

A legelső aptamerek előállítását leíró tudományos közleményben a T4 bakteriofág DNS-polimeráza volt a felismerni kívánt célmolekula. Habár a választott célmolekulától funkciójából adódóan joggal várható, hogy nukleinsavak megkötésére alkalmas legyen, ezt ténylegesen csak a megfelelően hajtogatódott aktív konformáció megléte esetén fogja maradéktalanul teljesíteni. A fehérjék szerkezetét felépítő mintegy húsz különböző aminosav oldallánc méretük, polarizáltságuk, valamint a harmadlagos struktúrában elfoglalt pozíciójuk függvényében szolgáltatnak aptamerköötődésre alkalmas építőpot. Épp ezért a célfehérje megfelelő szakaszának megválasztása és annak funkcionális szerkezete döntően határozza meg az aptamerszelekció sikerességét, valamint a gyakorlati alkalmazhatósággal is bíró aptamerek azonosítását. Mindezek fényében munkánk első fázisában különös hangsúlyt fektettünk az aptamerszelekció célmolekulájának funkcionális karakterizálására.

A *Streptococcus mutans* humán normálflóra alkotó baktérium biofilmképzésében kulcsfontossággal bír a sejtfalába horgonyzott glükánköötő fehérje C. A GbpC szerepe, hogy a termelt homopoliszacharidot felismerve a glükánhálózathoz kösse a baktériumsejtet, ezzel szoros kapcsolatot kialakítva a sejt és a biofilm struktúra között. Az extracelluláris fehérje – további glükánköötő fehérjékhez hasonlóan – tehát a biofilmérésének esszenciális komponense, amit bizonyítanak a fehérjehiányos mutáns törzsekkel végzett csökkent biomassza mennyiséget eredményező kísérletek [175]. A GbpC részletekbe menő szerkezetvizsgálati elemzése óta ismert, hogy milyen egységek építik fel a fehérje másodlagos és harmadlagos struktúráját, továbbá, hogy ezek az egységek hogyan befolyásolják a glükánköötést [177]. Ezek alapján a funkcionális fehérje vizsgálataihoz sok esetben elegendő a fehérje extracelluláris doménjait reprezentáló 111-522 aminosavakat tartalmazó rekombináns fehérje előállítása, mivel az N-terminális rendezetlen régió és a C-terminális sejtfalba irányított fehérjeszakasz nem vesz részt a glükán megkötésében. A fehérje glükánköötő funkciójához szükséges továbbá egy kalciumion a fehérje központi régiójában, ami stabil magként tartja össze a glükánköötő sebz egységét egy hozzásimuló hurok régióval együtt.

A megfejtt fehérjeszerkezet és az aptamerszelekció sajátosságait figyelembe véve munkánk során elsőként rekombináns GbpC-t termeltettünk bakteriális rendszerben,

majd affinitástisztítással izoláltuk a funkcionális vizsgálatokhoz. Tekintve, hogy célkitűzésünk szerint sejtek felszínén jelenlévő, natív glükánkötő fehérjék gátlását kívántuk elérni, a rekombináns GbpC glükánkötését a valóságost legjobban imitáló közegben, mesterséges nyálpufferben teszteltük. A foszfát-puffer alapú steril oldatban megtalálható valamennyi nyálalkotó ion, így a kalciumion is. A kalciumion GbpC-térszerkezetét befolyásoló hatása detektálható volt a fehérje olvadási görbéjén megjelenő különálló csúccsal, azonban a fehérje nagyobb részének átlagosan $T_m = 58,4^\circ\text{C}$ -os olvadási hőmérsékletét az nem változtatta meg. Felhasználva ezt a megfigyelést a GbpC glükánkötésének ellenőrzését konvencionális mérőoldatok helyett kizárólag a fiziológiához legközelebbi, mesterséges nyálpufferben végeztük. Két, eltérő elvű kölcsönhatási technikával, úgymint BLI-vel és MST-vel meghatároztuk, hogy ilyen körülmények között a GbpC fehérje és a glükán ligandját reprezentáló 10 kDa-os dextrans kölcsönhatását jellemző K_D -értékek rendre $13,69 \mu\text{M}$ és $2,46 \mu\text{M}$, amik összemérhetők a közölt izotermális titrációs kalorimetriával mért $84,7 \mu\text{M}$ értékkel [177]. A különböző mérési eljárások egyhangúan arra utaltak, hogy az aptamerszelekciónk során használt rekombináns GbpC fehérje natív szerkezettel rendelkezik.

A SELEX technika megjelenésével már a kezdetektől fogva fontos szempont volt a szelektív aptamerek kinyerése és az aspecifikus szekvenciák kizárása [6]. Ezt elősegítő számos az eredetihez képest módosított típusa terjedt el a SELEX-nek. Ezek közül a counter-SELEX során a célmolekulához hasonló szerkezeti analógokra történő úgynevezett kontraszelekciós lépésekkel kisselektálhatóak a közös szerkezeti motívumokat felismerő aptamerek jelentős része, így a visszamaradó szekvenciák nagyobb specifikusságot mutathatnak a célmolekulára. A *S. mutans* szacharózfüggetlen adhéziójában szerepet játszó, szintén extracelluláris Antigen I/II fehérje figyelemre méltó mértékű homológiát mutat a GbpC-vel, ami alkalmassá teszi kontraszelekciós célpontnak. A létrehozott GbpC¹¹¹⁻⁵²² és AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ rekombináns fehérje-fragmensek 31,4%-os aminosav szintű homológiája egyrészt alapját adta a specifikus aptamerek szelekciójának, másrészt a glükánt nem kötő AgI/II fontos negatív kontroll fehérjeként szolgált a kölcsönhatás vizsgálatokban.

5.2. A GbpC-specifikus aptamerek szelekciója és karakterizálása

Az aptamerek ellenanyagokkal szemben tapasztalható korlátozott elterjedését egyfelől meghatározta az, hogy a tudományos közösség csak jóval az antitestek előállítására és számos ellenanyagokra optimalizált metodika kifejlesztése után ismerhette meg a bennük rejlő potenciált. Másfelől csökkentette az aptamerekbe vetett bizalmat, hogy *in situ* alkalmazás esetén az aptamerek sorra kudarcot vallottak, mivel a szelekciójukhoz választott körülmények a valós felhasználási körülményektől alapvetően eltértek. A mai aptamerszelekciókat közlő szakirodalomban továbbra is fellelhetők olyan aptamerek, amiknek pontos szelekciós és karakterizálási körülményei hiányosak vagy nem ismertek, és ennek következtében alkalmazásukkor gyakorlatilag funkcióképtelenek. Ezt megelőzendő a Nemzetközi Aptamer Társaság (INSOAP) képviselőinek irányelve szerint mind az aptamerszelekció részletes paramétereit, mind a karakterizálási körülményeket a felhasználási célok szerint kívánatos közölni, hogy a jövőben megbízható és reprodukálható eredmények születhessenek az aptamerekkel [16].

A gyakorlati jelentőséggel bíró aptamerek előállításának egyik további kulcseleme – az előzőekben ismertettet célmolekulához kapcsolódó kérdéskörön túl –, hogy nem csak a SELEX után elvégzett, aptamerek teljesítményét monitorozó karakterizálási kísérleteket, hanem már magát az aptamerszelekciót is a tervezett felhasználási körülményekhez hasonló közegben végezzük. A fehérjék és az aptamerek intermolekuláris kölcsönhatásait meghatározza a közeg hőmérséklete, ionösszetétele, a makromolekulák osztályozása, így ezek állandó értéken tartásával jelentősen növelhető a szelekciók sikerrátája. Munkánk során úgy találtuk, hogy az aptamerszelekció és a kölcsönhatás vizsgálatok kivitelezéséhez célravezető, ha mesterséges nyálpufferoldatot használunk, amiben a célfehérjén kívül a szelektív aptamerek is megfelelő térszerkezetet tudnak kialakítani, így növelve a valós körülmények közötti alkalmazásuk esélyét.

A biológiai fluidumok összetettségén túl nagy kihívás az aptamerek specifikusságának növelése is, amit a SELEX tervezésekor számításba kellett vennünk. Az általunk végrehajtott aptamerszelekciós eljárás ötvözte a paramágneses affinitásgyöngyön immobilizált célmolekulákat használó FluMag-SELEX, a szerkezeti analóg AgI/II, illetve a GbpC-t ki nem fejező *S. mutans* sejtek ellen végzett counter-, és cell-SELEX sajátosságait. Ezáltal és a releváns szelekciós puffer alkalmazásával kívántuk elérni az aptamerek minél nagyobb szelektivitását. Az aptamerszelekció végeztével a

Sanger-szekvenálást követően 55-ből 42 egyedi szekvenciát azonosítottunk, amiknek GbpC iránti affinitását egyenként vizsgáltuk a munkacsoportunkban fejlesztett PBA-PCR-rel kombinált ALPHAScreen kölcsönhatás vizsgálati módszerrel.

Az egyszálú oligonukleotidok előállítására alkalmas technikák (aszimmetrikus PCR, λ -exonukleázos kezelés, alkalikus denaturálás) mindegyike rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal [18], azonban az általunk használt nagy áteresztő képességű affinitástesztelés szempontjából fontos kitétel volt, hogy az egyszálú aptamerek 5'-biotin jelöléssel, viszonylag nagy mennyiségben és költséghatékony előállítást követően álljanak rendelkezésünkre. Ezeknek a kívánalmaknak megfelelt a korábban munkacsoportunkban optimalizált primer blokkolt aszimmetrikus PCR [210] továbbfejlesztett változata. A továbbfejlesztést az az elméleti megfontolása indokolta, hogy a korábbi PBA-PCR termékeinek vezetőszálán a 3'-primerrégióhoz a blokkoló reverz primer a reakció után is kötve maradt, ami egy részlegesen kétszálú aptamert eredményezett, ezzel korlátozva az egyszálú aptamer szelekció alatt felvett térszerkezetének kialakulását és a célmolekulával alkotott komplex létrejöttét. A részlegesen kétszálú PBA-PCR termék kiküszöbölésére a reverz primerrel komplementer oligonukleotidot feleslegben adtunk a reakció után a keverékhez, ami leszorította a blokkoló primert, és lehetővé tette az immár teljesen egyszálú aptamer specifikus szerkezetének hajtogatódását.

A reverz komplementerrel kiegészített, 5'-biotinnal jelölt PBA-PCR termékek ezzel a megközelítéssel alkalmasak voltak ALPHAScreen mérésekre, amiknek az eredménye alapján azonosítottuk a 11 legnagyobb affinitással kötődő aptamerjelöltet. Megjegyzendő, hogy a GbpC fehérje maga is mutatott mérsékelt kötődést az ALPHA donor gyöngy anyaga iránt, ami valószínűleg a termék szabadalmaztatott polimer komponense miatt volt tapasztalható [211]. Ennek ellenére a tovább vizsgált aptamerek specifikusságát bizonyította, hogy amíg a szerkezetanalóg Antigen I/II-vel gyakorlatilag alapjelet kaptunk, a 11 legjobban teljesítő aptamer a GbpC-vel nagyságrendekkel magasabb kemilumineszcens jelet adott, ami az AgI/II-t alkalmazó kontraszelekciós lépések relevanciáját és sikerességét igazolta. A BLI és MST mérési technikákkal végzett vizsgálataink eredményei szintén megerősítették az aptamerjelöltek affinitását és specifikusságát a GbpC irányába, amik így alacsony μM -os egyensúlyi disszociációs

állandókat eredményeztek, és biztos alapot adtak a biofilmgátló funkcionális tesztek tervezéséhez.

Az aptamerek optimalizálása során bevett eljárás, hogy a fix primerrégiók eltávolításával csupán a random régiót magában foglaló, rövidebb aptamerszekvenciát használják funkcionális tesztelésekhez [212–216]. Ez a módosítás egyrészt költséghatékonyságot, másrészt affinitásnövekedést eredményező megoldás lehet. Sok esetben a konstans jelenlévő primereknek csak az amplifikációs lépésben van elengedhetetlen szerepük, és a célmolekulával kialakított kölcsönhatásért az aptamer randomrégiójának egy rövidebb motívuma vagy szerkezeti egysége a felelős. Esetünkben két szekvencia, az A39 és A96 aptamerek rövidebb és hosszabb változatának GbpC iránti affinitását is megvizsgáltuk MST technikával. Az eredményeink azt igazolták, hogy a specifikus aptamerszerkezet kialakulásában szerepe van a primerrégióknak, vagyis azok jelenléte szükséges az erősebb GbpC-aptamer komplex kialakulásához. Ebből adódóan a biofilmgátló kísérleteinkben a primerrégiókkal rendelkező, teljes hosszúságú aptamereket használtuk.

5.3. A szelektált aptamerek funkcionális vizsgálata

Az aptamerek terápiás alkalmazásának potenciálját már az első DNS aptamer szelekciójakor felismerték, aminek következtében napjainkra tucatnál is több gyógyszerjelölt került klinikai vizsgálatokba, és ezek közül kettőt azóta törzskönyveztek is. Terápiás szerként történő felhasználásukra okot ad számos kedvező tulajdonságuk, amik közül kiemelendő az ellenanyagokkal összemérhető specifikus célmolekula felismerő képességük. A terápiás célú aptamerek fejlesztése gyakran sejtfelszíni receptorok, jelátviteli molekulák vagy enzimek gátlására irányulnak, amivel átmenetileg vagy hosszabb távon felfüggeszthető az adott fehérje funkciója egy bizonyos élettani folyamatban. Munkám során az aptamerek gátló potenciálját kiaknázandó a *S. mutans* baktérium sejtfelszíni fehérjéjét, a glükánköti fehérje C-t választottuk gátolandó célpontnak, amivel a biofilmképződésének mérséklését kívántuk elérni.

Habár karakterizált aptamereink legtöbbször K_D értéke az átlagos diagnosztikus és terápiás céllal fejlesztett aptamerekéhez képest valamelyest magasabb, a GbpC természetes ligandját reprezentáló dextránnal összevetve egy nagyságrendbe esik, így jó eséllyel alkalmasak biofilmgátlásra. A választott 4 jól kötődő és 1 gyengén kötő aptamer

közül kettő, az A39 és A96 közel 30%-os biofilmképződés csökkenést mutattak vad típusú *S. mutans* sejteken kristályiboláival történő festést követően, míg a GbpC-hiányos mutáns törzs biofilmképzését egyik aptamer sem gátolta szignifikánsan. Ez utóbbi jelenség megerősíti, hogy az AgI/II-vel és Δ GbpC *S. mutans* sejtekkel kombinált SELEX stratégiánk specifikus aptamerek szelekciójához vezetett, amit a kölcsönhatás vizsgálati eredményeink is alátámasztottak.

Némiképp meglepő volt, hogy a biofilmgátló A39 és A96 aptamerekhez képest hasonlóan nagy affinitással rendelkező A30 és A65 szekvenciák nem mutattak gátló hatást. Feltételezésünk szerint, ez az ellentmondás eredhet vagy az aptamerek baktériumok jelenlétében tanúsított stabilitási különbözőségéből, vagy abból, hogy az aptamerek a GbpC eltérő epitópjához kötődnek. Az aptamerek instabilitására vonatkozó elgondolásunkat kísérletesen nem vizsgáltuk. Az utóbbi hipotézisünket az AlphaFold3 segítségével kíséreltük megvizsgálni. A predikciós eredmények arra utaltak, hogy az A30 aptamer a GbpC fehérje kalciumionot tartalmazó glükánköti zsebétől távolabb helyezkedik el, mint az A39 rövid, illetve hosszú változata, vagyis az eltérő epitóphoz való kötődés valószínű magyarázata lehet a tapasztalt ellentmondásnak. A teljeskörű igazoláshoz azonban további szerkezetfelderítési kísérletek elvégzése szükséges.

Az eddig publikált kis számú bakteriosztatikus aptamereket javarészt cell-SELEX-et alkalmazva, teljes sejtekre szelektálták [217]. Ennek a megközelítésnek az lehet a hátul ütője, hogy az aptamer célpontja az intakt sejt felületén bármilyen képlet, makromolekula vagy ezek összessége lehet, így az aptamerek pontos hatásmechanizmusát szinte lehetetlen megfejteni. Éppen csak néhány olyan közleményt találni, amiben konkrét célmolekulára történt az aptamerszelekció. Ezekre példa a *Salmonella Invasion Protein A* (SipA) vagy a *Pseudomonas aeruginosa* QS-rendszerét működtető C4-HSL autoinduktor molekulákat célzó aptamerek [190,191]. A *S. mutans* GbpC-t célzó aptamereink tesztelése során megállapítottuk, hogy a fruktóz-, és glükóztartalmú tápoldatban – amiben szacharóz hiányában nem termelődik glükán, és így a biofilmképződés is csökkent – nem volt tapasztalható biofilmgátlás, ami arra utal, hogy aptamereink valóban a szelekciós célmolekulájukon keresztül fejtik ki hatásukat.

A dolgozatban bemutatott aptamereink biofilmgátló hatásfoka jól összemérhető azzal a 20-40%-os gátlással, amit hasonló célú tanulmányokban közöltek [217]. Noha terápiás célokra az általunk megállapított 30%-os gátlás csekély lehet, az aptamerek

konjugálása pl. antibakteriális molekulákkal, grafén-oxiddal vagy ezüst nanorészecskékkel szinergisztikus hatást fejthet ki, ahogy azt *P. aeruginosa* [218], *S. typhimurium* [219], *S. aureus* [192], vagy *S. mutans* [220] esetében tapasztalták.

Összességében elmondható, hogy szelektált aptamereink specifikusan mérséklék a *S. mutans* GbpC fehérje által közvetített biofilmképződést, így ígéretes jelöltjei lehetnek a dentális plakk minimalizálását célzó új fejlesztéseknek. Jövőbeli terveink közt szerepel a GbpC aptamerköltő epitópjának kísérletes azonosítása, továbbá az aptamerek sejtek és biofilmek morfológiájára gyakorolt hatásának nagy felbontású mikroszkópos vizsgálata. Szándékunk szerint az általunk bemutatott aptamerszelekciós stratégia szélesebb körben is értékesnek bizonyulhat, és hozzájárulhat számos orvosi releváns kórokozó ellen tervezett aptameralapú terápia kidolgozásához.

6. Következtetések

Munkám során elsődleges célként tűztük ki olyan DNS aptamerek előállítását és vizsgálatát, amelyek alkalmasak lehetnek a *Streptococcus mutans* glükánkötő fehérje C-hez kötődve a biofilmképződést specifikusan gátolni.

Eredményeink alapján az alábbi megállapítások tehetők:

1. A GbpC bakteriális sejt felszíni fehérje ideális célpont mesterséges nyálpufferben végzett aptamerszelekciók kivitelezésére.
2. A munkacsoportunkban továbbfejlesztett PBA-PCR-rel kombinált ALPHAScreen technika alternatívát nyújt a teljesen egyszálú aptamerjelöltek gyors és hatékony előállítására és affinitásuk vizsgálatára. A technika alkalmazásával azonosítani tudtuk a SELEX után kapott jól kötő aptamerjelölteket, amiket további módszerekkel történt karakterizálás után használhattunk biofilmképződés gátlására.
3. A szelektált aptamerekkel a GbpC célmolekulát az azzal jelentős homológiát mutató Antigen I/II-vel szemben is nagy szelektivitással ki tudtuk mutatni, ami az alkalmazott SELEX eljárásunk lépéseinek jól tervezettségét igazolja.
4. A szelektív aptamerek a GbpC természetes ligandját reprezentáló dextránnal összemérhető affinitást mutattak a célmolekula iránt, ami lehetőséget ad a fehérje glükánkötésének aptamerekkel történő gátlására.
5. Az MST eredmények fényében elmondható, hogy a vizsgált aptamerek GbpC-re specifikus térszerkezetük kialakításához szükséges a vizsgált aptamerek primerrégióinak jelenléte.
6. Az inhibitorhatású aptamerek összetett tápoldatban a vad típusú *S. mutans* sejtek biofilmjét szignifikáns mértékben csökkentették, míg a GbpC-hiányos *S. mutans* sejtek biofilmképződésére nem voltak ilyen hatással.
7. A specifikus aptamerek közül nem mindegyik szekvencia mutatott biofilmképződést gátló hatást a *S. mutans* vad típusú sejtekkel, ami valószínűsíthetően az aptamerek eltérő GbpC-epitópokhoz való kötődésével magyarázható.

7. Összefoglalás

A mikrobiális biofilmek védett környezetet biztosítanak a legtöbb prokarióta és néhány egysejtű eukarióta faj mindennapi túléléséhez. Komplex felépítésük és finoman szabályozott működésük napjainkban számos kutatás központi témáját adja, mivel a humán patogén mikroorganizmusok biofilmképződése jelentős egészségügyi következményekkel jár. A tudóstársadalom igyekszik egyre közelebb kerülni a biofilmképződés molekuláris szintű megértéséhez, mi több tudását gyakorlati megoldások kidolgozására fordítani, amivel az okozott megbetegedések enyhíthetők, vagy akár megelőzhetők lehetnek.

A humán mikrobiom alkotó *Streptococcus mutans* elsődleges felelőse a fogszuvasodás kialakulásának, továbbá újabb kutatások szerint szerepe van egyes belgyógyászati és neurológiai kórképek progressziójában. A *S. mutans* biofilmképzésében kulcsszereppel bíró glükánkötő fehérje C közelmúltban megfejtt kristályszerkezete lehetőséget adott a kutatóknak célzott gátlómolekulák fejlesztésére. Doktori dolgozatomban a *S. mutans* biofilmképződésének szelektív gátlására alkalmas DNS aptamerek előállítását és működésük vizsgálatát mutattam be, ami egy új megközelítés lehet a baktérium virulenciájának mérséklésére. Eredményeink alapján elmondható, hogy a szelektált aptamerek megbízható affinitással és nagy szelektivitással ismerik fel a GbpC célmolekulát, aminek háttérében a SELEX körültekintő megtervezése, valamint a fiziológiához közel álló szelekciós és karakterizálási körülmények megválasztása áll. A munkacsoportunkban fejlesztett PBA-PCR megfelelő technika volt az aptamerjelöltek hatékony előállításához, és hozzájárult, hogy felismerjük a primerrégiók szerepét a funkcionális aptamerek szerkezetének kialakulásában. Az előállított aptamerek alkalmazhatóságát komplex tápoldatban végzett biofilmgátlási vizsgálataink bizonyították.

Összegezve, szelektált aptamereink ígéretes jelöltjei lehetnek a dentális plakk minimalizálását célzó újabb fejlesztéseknek. Továbbá, reményeink szerint az általunk bemutatott aptamerszelekciós stratégia, kiegészülve a modern bioinformatika adta eszközökkel szélesebb körben is értékesnek bizonyulhat, és hozzájárulhat számos orvosilag releváns aptameralapú terápia kidolgozásához.

8. Summary

Microbial biofilms provide a protective environment for the daily survival of most prokaryotic and some unicellular eukaryotic species. Their complex structure and finely regulated function are the focus of much research nowadays, as biofilm formation by human pathogenic microorganisms has important health consequences. The scientific community is striving to get closer to understanding biofilm formation at the molecular level, and to apply their knowledge to the development of practical solutions to mitigate or even prevent the diseases caused.

Streptococcus mutans, a member of the human microbiome, is primarily responsible for the development of dental caries and recent research has found it to be involved in the progression of certain internal and neurological diseases. The recently deciphered crystal structure of the glucan-binding protein C, which plays a key role in *S. mutans* biofilm formation, has provided the researchers with an opportunity to develop targeted inhibitory molecules. In my PhD thesis, I presented the production and the functionality of DNA aptamers to selectively inhibit biofilm formation in *S. mutans*, which could be a new approach to mitigate the virulence of the bacterium. Our results show that the selected aptamers recognize the target GbpC molecule with reliable affinity and high selectivity, which is due to the well-considered design of SELEX and the choice of selection and characterization conditions close to physiology. The PBA-PCR developed in our group was an appropriate technique for efficient generation of aptamer candidates and contributed to our understanding of the importance of primer regions in the structure of functional aptamers. The applicability of the selected aptamers was demonstrated by our biofilm inhibition assays in complex culture medium.

In summary, our selected aptamers could be promising candidates for new developments aimed at reducing dental plaque. Furthermore, it is hoped that our presented aptamer selection strategy, complemented with the tools provided by modern bioinformatics, may prove to be of value to a broader community and contribute to the development of a number of medically relevant aptamer-based therapies.

9. Irodalomjegyzék

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* (1979) 1990;249:505–10. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
- [2] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990;346:818–22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- [3] Famulok M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr Opin Struct Biol* 1999;9:324–9. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80043-8).
- [4] Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* 2002;9:1043–9. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00224-7).
- [5] Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH, et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic Di-GMP. *Science* (1979) 2008;321:411–3. <https://doi.org/10.1126/science.1159519>.
- [6] Ellington AD, Szostak JW. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 1992;355:850–2. <https://doi.org/10.1038/355850a0>.
- [7] Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *PNAS* 1988;85:7652–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7652>.
- [8] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* 2007;24:381–403. <https://doi.org/10.1016/J.BIOENG.2007.06.001>.
- [9] Aptagen Llc. Apta-Index (Aptamer Database) n.d. <https://www.aptagen.com/aptamer-index> (accessed May 12, 2025).
- [10] McKeague M, McConnell EM, Cruz-Toledo J, Bernard ED, Pach A, Mastronardi E, et al. Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *J Mol Evol* 2015;81:150–61. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9708-6>.

- [11] Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem* 2017;1:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076>.
- [12] Komarova N, Kuznetsov A. Inside the black box: What makes Selex better? *Molecules* 2019;24:3598. <https://doi.org/10.3390/molecules24193598>.
- [13] Mayer G, editor. *Nucleic Acid Aptamers: 1st Selection, Characterization, and Application Methods in Molecular Biology*. 1st ed. Springer Protocols; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3197-2>.
- [14] Mayer G, Menger MM. *Nucleic Acid Aptamers 2nd: Selection, Characterization, and Application Methods in Molecular Biology*. Springer Protocols; 2023. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2695-5>.
- [15] Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem* 2022;69:1771–92. <https://doi.org/10.1002/BAB.2244>.
- [16] Mckeague M, Calzada V, Cerchia L, Derosa M, Heemstra JM, Janjic N, et al. The minimum aptamer publication standards (MAPS guidelines) for de novo aptamer selection. *Aptamers* 2022;6:10–8.
- [17] Svobodová M, Pinto A, Nadal P, O’ Sullivan CK. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Anal Bioanal Chem* 2012:1–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6183-4>.
- [18] Pino V, Kalogiouri N, Garanin A, Shalaev A, Zabegina L, Kadantseva E, et al. Specific Aspects of SELEX Protocol: Different Approaches for ssDNA Generation. *Methods and Protocols (MDPI)* 2025;8:36. <https://doi.org/10.3390/MPS8020036>.
- [19] Higuchi RG, Ochman H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989;17. <https://doi.org/10.1093/nar/17.14.5865>.
- [20] Komarova N V., Glukhov SI, Andrianova MS, Kuznetsov AE. Use of the Cy3 and Cy5 Fluorescent Labels to Protect a DNA Strand from Degradation under λ

- Exonuclease Treatment. *Moscow University Chemistry Bulletin* 2018;73:19–26. <https://doi.org/10.3103/S0027131418020062>.
- [21] Brewster JL, Tolun G. Half a century of bacteriophage lambda recombinase: In vitro studies of lambda exonuclease and Red-beta annealase. *IUBMB Life* 2020;72:1622–33. <https://doi.org/10.1002/IUB.2343>.
- [22] Citartan M, Tang TH, Tan SC, Gopinath SCB. Conditions optimized for the preparation of single-stranded DNA (ssDNA) employing lambda exonuclease digestion in generating DNA aptamer. *World J Microbiol Biotechnol* 2011;27:1167–73. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0563-8>.
- [23] Wochner A, Cech B, Menger M, Erdmann VA, Glökler J. Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling. *Biotechniques* 2007;43:344–53. <https://doi.org/10.2144/000112532>.
- [24] Breuers S, Bryant LL, Legen T, Mayer G. Robotic assisted generation of 2'-deoxy-2'-fluoro-modified RNA aptamers – High performance enabling strategies in aptamer selection. *Methods* 2019;161:3–9. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2019.05.022>.
- [25] Ahmad KM, Oh SS, Kim S, McClellan FM, Xiao Y, Soh HT. Probing the Limits of Aptamer Affinity with a Microfluidic SELEX Platform. *PLoS One* 2011;6:e27051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027051>.
- [26] Blind M, Blank M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015;4:e223. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.74>.
- [27] Poolsup S, Zaripov E, Hüttmann N, Minic Z, Artyushenko P V., Shchugoreva IA, et al. Discovery of DNA aptamers targeting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and protein-binding epitopes for label-free COVID-19 diagnostics. *Mol Ther Nucleic Acids* 2023;31:731–43. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.02.010>.
- [28] Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv* 2015;33:1141–61. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.02.008>.

- [29] Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science* (1979) 1994;263:1425–9. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>.
- [30] Klussmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Fürste JP. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol* 1996;14:1112–5. <https://doi.org/10.1038/nbt0996-1112>.
- [31] Burke DH, Willis JH. Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX. *RNA* 1998;4:1165–75. <https://doi.org/10.1017/S1355838298980542>.
- [32] Hicke BJ, Marion C, Chang YF, Gould T, Lynott CK, Parma D, et al. Tenascin-C Aptamers Are Generated Using Tumor Cells and Purified Protein. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:48644–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.m104651200>.
- [33] White R, Rusconi C, Scardino E, Wolberg A, Lawson J, Hoffman M, et al. Generation of species cross-reactive aptamers using “toggle” SELEX. *Molecular Therapy* 2001;4:567–73. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0495>.
- [34] Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15416. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2136683100>.
- [35] Vater A, Jarosch F, Buchner K, Klussmann S. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e130. <https://doi.org/10.1093/nar/gng130>.
- [36] Murphy MB, Fuller ST, Richardson PM, Doyle SA. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e110–e110. <https://doi.org/10.1093/NAR/GNG110>.

- [37] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* 2005;383:83–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>.
- [38] Mayer G, Ahmed MSL, Dolf A, Endl E, Knolle PA, Famulok M. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nat Protoc* 2010;5:1993–2004. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.163>.
- [39] Nutiu R, Li Y. In vitro selection of structure-switching signaling aptamers. *Angewandte Chemie - International Edition* 2005;44:1061–5. <https://doi.org/10.1002/anie.200461848>.
- [40] Stoltenburg R, Nikolaus N, Strehlitz B. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J Anal Methods Chem* 2012;2012:415697. <https://doi.org/10.1155/2012/415697>.
- [41] Yu H, Canoura J, Byrd C, Alkhamis O, Bacon A, Yan A, et al. Improving Aptamer Affinity and Determining Sequence-Activity Relationships via Motif-SELEX. *J Am Chem Soc* 2025;147:9472–86. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c17041>.
- [42] Hoogsteen K. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr* 1963;16:907–16. <https://doi.org/10.1107/S0365110X63002437>.
- [43] Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3745–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3745>.
- [44] Roxo C, Kotkowiak W, Pasternak A. G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* 2019, Vol 24, Page 3781 2019;24:3781. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24203781>.
- [45] Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics* 2012 13:11 2012;13:770–80. <https://doi.org/10.1038/nrg3296>.

- [46] Patel DJ, Suri AK, Jiang F, Jiang L, Fan P, Kumar RA, et al. Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J Mol Biol* 1997;272:645–64. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1281>.
- [47] Gopinath SCB. Mapping of RNA-protein interactions. *Anal Chim Acta* 2009;636:117–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.052>.
- [48] Bernat V, Disney MD. RNA Structures as Mediators of Neurological Diseases and as Drug Targets. *Neuron* 2015;87:28–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.012>.
- [49] Huizenga DE, Szostak JW. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* 1995;34:656–65. <https://doi.org/10.1021/bi00002a033>.
- [50] Entzian C, Schubert T. Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *Methods* 2016;97:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.08.023>.
- [51] McKeague M, Velu R, Hill K, Bardóczy V, Mészáros T, DeRosa MC. Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins (Basel)* 2014;6:2435–52. <https://doi.org/10.3390/toxins6082435>.
- [52] Zhang N, Chen Z, Liu D, Jiang H, Zhang Z-K, Lu A, et al. Structural Biology for the Molecular Insight between Aptamers and Target Proteins. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22084093>.
- [53] Gelinas AD, Davies DR, Edwards TE, Rohloff JC, Carter JD, Zhang C, et al. Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand. *Journal of Biological Chemistry* 2014;289:8720–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532697>.
- [54] Gelinas AD, Davies DR, Janjic N. Embracing proteins: structural themes in aptamer–protein complexes. *Curr Opin Struct Biol* 2016;36:122–32. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2016.01.009>.

- [55] Gold L, Ayers D, Bertino J, Bock C, Bock A, Brody EN, et al. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLoS One* 2010;5:e15004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015004>.
- [56] Percze K, Tolnai ZJ, Eleveld M, Ou L, Du H, Olia AS, et al. Tryptophan-like side chain holding aptamers inhibit respiratory syncytial virus infection of lung epithelial cells. *Sci Rep* 2023;13:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36428-2>.
- [57] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3406–15. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG595>.
- [58] Kikin O, D’Antonio L, Bagga PS. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 2006;34:W676–82. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL253>.
- [59] Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* 2015;43:W39–49. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV416>.
- [60] Hoinka J, Backofen R, Przytycka TM. AptaSUITE: A Full-Featured Bioinformatics Framework for the Comprehensive Analysis of Aptamers from HT-SELEX Experiments. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018;11:515–7. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.006>.
- [61] Caroli J, Forcato M, Bicciato S. APTANI2: update of aptamer selection through sequence-structure analysis. *Bioinformatics* 2020;36:2266–8. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTZ897>.
- [62] Doan THP, Fried JP, Tang W, Hagness DE, Wu Y, Tilley RD, et al. Optical Nanopore Blockade Sensors for Multiplexed Detection of Proteins. *Nano Lett* 2025;25:3233–9. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.4c05934>.
- [63] Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 596:7873 2021;596:583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [64] Service RF. “The game has changed.” AI triumphs at protein folding: In milestone, software predictions finally match structures calculated from

- experimental data. *Science* (1979) 2020;370:1144–5.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.370.6521.1144>,
- [65] Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 2024;630:493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- [66] The Nobel Committee for Chemistry. Scientific Background to the Nobel Prize in Chemistry 2024. The Royal Swedish Academy of Sciences 2024.
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/advanced-information/>
(accessed May 1, 2025).
- [67] Plach M, Schubert T. Biophysical Characterization of Aptamer-Target Interactions. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2020;174:1–15.
https://doi.org/10.1007/10_2019_103.
- [68] McKeague M, De Girolamo A, Valenzano S, Pascale M, Ruscito A, Velu R, et al. Comprehensive Analytical Comparison of Strategies Used for Small Molecule Aptamer Evaluation. *Anal Chem* 2015;87:8608–12.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02102>.
- [69] Stoltenburg R, Schubert T, Strehlitz B. In vitro Selection and Interaction Studies of a DNA Aptamer Targeting Protein A. *PLoS One* 2015;10:e0134403.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0134403>.
- [70] Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, Wu ZP, Irvin BR, Pease JS, et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5426–30.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5426>.
- [71] Revvity. User's guide: Alpha protein:protein interaction assays 2024.
<https://resources.revvity.com/pdfs/gde-users-guide-alpha-protein-protein-interaction-assays.pdf> (accessed May 1, 2025).
- [72] Concepcion J, Witte K, Wartchow C, Choo S, Yao D, Persson H, et al. Label-Free Detection of Biomolecular Interactions Using BioLayer Interferometry for

- Kinetic Characterization. *Comb Chem High Throughput Screen* 2009;12:791–800. <https://doi.org/10.2174/138620709789104915>.
- [73] Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* 2010;1:1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>.
- [74] Baaske P, Wienken CJ, Reineck P, Duhr S, Braun D. Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding. *Angewandte Chemie International Edition* 2010;49:2238–41. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200903998>.
- [75] The Nobel Assembly of Karolinska Institutet. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984 - Press release 1984. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1984/press-release/> (accessed May 2, 2025).
- [76] BasePair Biotechnologies Inc. Aptamers vs. Antibodies n.d. <https://www.basepairbio.com/aptamers-vs-antibodies/> (accessed May 12, 2025).
- [77] Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:537–50. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>.
- [78] Nichols NM, Tanner NA. Using aptamers to control enzyme activities: Hot Start Taq and beyond (NEB) 2022. <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/feature-articles/using-aptamers-to-control-enzyme-activities-hot-start-taq-and-beyond> (accessed May 3, 2025).
- [79] Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* 2018;8:4016–32. <https://doi.org/10.7150/THNO.25958>.
- [80] Cruz-Aguado JA, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J Agric Food Chem* 2008;56:10456–61. <https://doi.org/10.1021/jf801957h>.
- [81] Szeitner Z, Lautner G, Nagy SK, Gyurcsányi RE, Mészáros T. A rational approach for generating cardiac troponin I selective spiegelmers. *Chemical Communications* 2014;50:6801–4. <https://doi.org/10.1039/c4cc00447g>.

- [82] Szeitner Z, Doleschall A, Varga M, Keltai K, Révész K, Gyurcsányi RE, et al. Spiegelmers as potential receptors for cTnI diagnostics. *Analytical Methods* 2017;9:5091–3. <https://doi.org/10.1039/c7ay01777d>.
- [83] Tolnai ZJ, András J, Szeitner Z, Percze K, Simon LF, Gyurcsányi RE, et al. Spiegelmer-Based Sandwich Assay for Cardiac Troponin I Detection. *Int J Mol Sci* 2020;21:4963. <https://doi.org/10.3390/ijms21144963>.
- [84] Komarova N, Panova O, Titov A, Kuznetsov A. Aptamers Targeting Cardiac Biomarkers as an Analytical Tool for the Diagnostics of Cardiovascular Diseases: A Review. *Biomedicines* 2022;10:1085. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10051085>.
- [85] Jung YJ, Katilius E, Ostroff RM, Kim Y, Seok M, Lee S, et al. Development of a Protein Biomarker Panel to Detect Non–Small-Cell Lung Cancer in Korea. *Clin Lung Cancer* 2017;18:e99–107. <https://doi.org/10.1016/J.CLLC.2016.09.012>.
- [86] Rohloff JC, Gelinas AD, Jarvis TC, Ochsner UA, Schneider DJ, Gold L, et al. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e201. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.49>.
- [87] Sun BB, Maranville JC, Peters JE, Stacey D, Staley JR, Blackshaw J, et al. Genomic atlas of the human plasma proteome. *Nature* 2018;558:73–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0175-2>.
- [88] Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:123–32. <https://doi.org/10.1038/nrd1955>.
- [89] Di Mauro V, Lauta FC, Modica J, Appleton SL, De Franciscis V, Catalucci D. Diagnostic and Therapeutic Aptamers: A Promising Pathway to Improved Cardiovascular Disease Management. *JACC Basic Transl Sci* 2024;9:260–77. <https://doi.org/10.1016/J.JACBTS.2023.06.013>.
- [90] Ganson NJ, Povsic TJ, Sullenger BA, Alexander JH, Zelenkofske SL, Sailstad JM, et al. Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure

- allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;137:1610-1613.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.034>.
- [91] Kang C. Avacincaptad Pegol: First Approval. *Drugs* 2023;83:1447–53.
<https://doi.org/10.1007/S40265-023-01948-8>.
- [92] Haßel SK, Mayer · G. Aptamers as Therapeutic Agents: Has the Initial Euphoria Subsided? *Mol Diagn Ther* 2019;23:301–9. <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00400-6>.
- [93] Kramer MJ, Roth IL. Electron microscopic evidence for a double hair-like nap appearing at low frequency on *Bacillus anthracis* Sterne spores. *Can J Microbiol* 1969;15:1247–8. <https://doi.org/10.1139/M69-226>.
- [94] Bennett HS. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1963;11:14–23. <https://doi.org/10.1177/11.1.14>.
- [95] Martínez-Palomo A. The Surface Coats of Animal Cells. *Int Rev Cytol* 1970;29:29–75. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60032-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60032-7).
- [96] Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. How Bacteria Stick. *Sci Am* 1978;238:86–95.
- [97] Costerton JW, Irvin RT, Cheng K-J. The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease. *Annual Reviews in Microbiology* 1981;35:299–324.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.35.100181.001503>.
- [98] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187–209.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>.
- [99] Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, William Costerton J, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *J Bacteriol* 2002;184:1140–54. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1140-1154.2002>.

- [100] De Angelis M, Siragusa S, Campanella D, Di Cagno R, Gobbetti M. Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Lactobacillus plantarum* DB200. *Proteomics* 2015;15:2244–57. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201400363>.
- [101] Wasfi R, Abd El-Rahman OA, Zafer MM, Ashour HM. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *J Cell Mol Med* 2018;22:1972–83. <https://doi.org/10.1111/JCMM.13496>.
- [102] Jefferson K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004;2:163–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>.
- [103] Hornby JM, Jensen EC, Lisek AD, Tasto JJ, Jahnke † Brandon, Shoemaker ‡ Richard, et al. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2982–92. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001>.
- [104] Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol* 2012;50:337–45. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>.
- [105] Dragoš A, Kiesevalter H, Martin M, Hsu CY, Hartmann R, Wechsler T, et al. Division of Labor during Biofilm Matrix Production. *Current Biology* 2018;28:1903-1913.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.046>.
- [106] Liu X, Zou L, Li B, Di Martino P, Rittschof D, Yang JL, et al. Chemical signaling in biofilm-mediated biofouling. *Nature Chemical Biology* 2024 20:11 2024;20:1406–19. <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01740-z>.
- [107] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 1987;325:279–81. <https://doi.org/10.1038/325279a0>.
- [108] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Jiang B-L, He Y-Q, Feng J-X, et al. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* 2007;63:429–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05531.x>.

- [109] Ryan RP. Fleming Prize Lecture 2013 Correspondence Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology (N Y)* 2013;159:1286–97. <https://doi.org/10.1099/mic.0.068189-0>.
- [110] Townsley L, Yildiz FH. Temperature affects c-di-GMP signaling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol* 2015;17:4290. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12799>.
- [111] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology* 2017 15:5 2017;15:271–84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.
- [112] Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J Bacteriol* 1970;313–22. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>.
- [113] Kaiser D, Losick R. How and why bacteria talk to each other. *Cell* 1993;73:873–85. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90268-U](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90268-U).
- [114] Surette MG, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 1998;95:7046–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7046>.
- [115] Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:582–7. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00025-9).
- [116] Fuqua WC, Winans SC, Peter Greenberg E. MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J Bacteriol* 1994;176:269–75. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>.
- [117] Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2000;2:450–64. <https://doi.org/10.1046/J.1462-2920.2000.00128.X>.

- [118] Prigent-Combaret C, Lejeune P. Monitoring gene expression in biofilms. *Methods Enzymol* 1999;310:56–79. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10006-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10006-5).
- [119] De Araujo C, Balestrino D, Roth L, Charbonnel N, Forestier C. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol* 2010;161:595–603. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2010.05.014>.
- [120] Balestrino D, Haagensen JAJ, Rich C, Forestier C. Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. *J Bacteriol* 2005;187:2870–80. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2870-2880.2005>.
- [121] José Salas-Jara M, Ilabaca A, Vega M, García A. Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* 2016;4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030035>.
- [122] Maldonado-Barragán A, West SA. The cost and benefit of quorum sensing-controlled bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *J Evol Biol* 2020;33:101–11. <https://doi.org/10.1111/JEB.13551>.
- [123] Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes Requires Cell-to-Cell Communication. *Science (1979)* 1993;260:1127–30. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8493556>.
- [124] Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey1 GG. Exopolysaccharide Production in Biofilms: Substratum Activation of Alginate Gene Expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1181–6. <https://doi.org/10.1128/aem.59.4.1181-1186.1993>.
- [125] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00038>.

- [126] Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2003;14:89–99. <https://doi.org/10.1177/154411130301400203>.
- [127] Li Y-H, Tang N, Aspiras MB, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP, et al. A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* Is Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol* 2002;184:2699–708. <https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2699-2708.2002>.
- [128] Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2003;50:101–4. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03688.X>.
- [129] Lorek J, Pöggeler S, Weide MR, Breves R, Bockmühl DP. Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger*. *J Basic Microbiol* 2008;48:99–103. <https://doi.org/10.1002/JOBM.200700292>.
- [130] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385–94. <https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001>.
- [131] Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5048–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401416101>.
- [132] Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols 2006. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>.
- [133] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623–33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- [134] Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience* 2004;9:1267–77. <https://doi.org/10.2741/1305>.
- [135] Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:644–8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>.

- [136] Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH, et al. Genetic and Biochemical Analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl Exopolysaccharide Reveal Overlapping Roles for Polysaccharide Synthesis Enzymes in Psl and LPS Production HHS Public Access. *Mol Microbiol* 2009;73:622–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x>.
- [137] Shima M. Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:242–7. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00206-8).
- [138] Busalmen JP, Vázquez M, De Sánchez SR. New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion. *Electrochim Acta* 2002;47:1857–65. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(01\)00899-4](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(01)00899-4).
- [139] Loto CA. Microbiological corrosion: mechanism, control and impact—a review. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 2017;92:4241–52. <https://doi.org/10.1007/s00170-017-0494-8>.
- [140] Vilain S, Pretorius JM, Theron J, Brözel VS. DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms †. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:2861–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01317-08>.
- [141] Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (N Y)* 2007;153:1318–28. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004911-0>.
- [142] Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:470–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.02073-07>.
- [143] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res* 1996;30:1749–58. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00323-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1).
- [144] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and

- biofilms. *Mol Microbiol* 2006;59:1114–28. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.05008.X>.
- [145] Jurcisek JA, Bakaletz LO. Biofilms Formed by Nontypeable *Haemophilus influenzae* In Vivo Contain both Double-Stranded DNA and Type IV Pilin Protein. *J Bacteriol* 2007;189:3868–75. <https://doi.org/10.1128/JB.01935-06>.
- [146] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (1979)* 2002;295:1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>.
- [147] Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in Single-and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5404–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5404-5410.2005>.
- [148] Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, Neu TR, Wecke J, Lawrence JR, et al. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol Lett* 2006;262:31–8. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00361.X>.
- [149] Michaelis C, Grohmann E. Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. *Antibiotics (Basel)* 2023;12. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020328>.
- [150] Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* 2020;9:59. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9020059>.
- [151] Sawicki MP, Samara G, Hurwitz M, Passaro E. Human Genome Project. *The American Journal of Surgery* 1993;165:258–64. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(05\)80522-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(05)80522-7).
- [152] Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters LR. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science (1979)* 1998;282:682–9. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.682>.

- [153] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature* 2007 449:7164 2007;449:804–10. <https://doi.org/10.1038/nature06244>.
- [154] Nelson KE, Weinstock GM, Highlander SK, Worley KC, Creasy HH, Wortman JR, et al. HMP - A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science* (1979) 2010;328:994–9. <https://doi.org/10.1126/science.1183605>.
- [155] Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353–80. <https://doi.org/10.1128/mr.50.4.353-380.1986>.
- [156] Bürgers R, Witecy C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol* 2012;57:940–7. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2012.01.015>.
- [157] Persson GR, Renvert S. Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2014;16:783–93. <https://doi.org/10.1111/CID.12052>.
- [158] Cui Z, Wang P, Gao W. Microbial dysbiosis in periodontitis and peri-implantitis: pathogenesis, immune responses, and therapeutic. *Front Cell Infect Microbiol* 2025;15:1517154. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1517154>.
- [159] Sun W, Huang S, Yang X, Luo Y, Liu L, Wu D. The oral microbiome of patients with ischemic stroke predicts their severity and prognosis. *Front Immunol* 2023;14:1171898. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1171898>.
- [160] Leonov G, Salikhova D, Starodubova A, Vasilyev A, Makhnach O, Fatkhudinov T, et al. Oral Microbiome Dysbiosis as a Risk Factor for Stroke: A Comprehensive Review. *Microorganisms* 2024;12. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12081732>.
- [161] Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, Malamud D, Rosan3 B. Salivary-Agglutinin-Mediated Adherence of *Streptococcus mutans* to Early Plaque Bacteria. *Infect Immun* 1991;59:3446–50. <https://doi.org/10.1128/iai.59.10.3446-3450.1991>.

- [162] Kitten T, Munro CL, Michalek SM, Macrina FL. Genetic Characterization of a *Streptococcus mutans* LraI Family Operon and Role in Virulence. *Infect Immun* 2000;68:4441–51. <https://doi.org/10.1128/iai.68.8.4441-4451.2000>.
- [163] Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: From Tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 2003;1:219–30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro771>.
- [164] Waldman LJ, Butera T, Boyd JD, Grady ME. Sucrose-mediated formation and adhesion strength of *Streptococcus mutans* biofilms on titanium. *Biofilm* 2023;6:100143. <https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2023.100143>.
- [165] Gibbons RJ, Berman KS, Knoettner P, Kapsimalis B. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch Oral Biol* 1966;11:549–63. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(66\)90220-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(66)90220-2).
- [166] Russell RRB. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. *J Gen Microbiol* 1979;112:197–201. <https://doi.org/10.1099/00221287-112-1-197>.
- [167] Banas JA, Russell RRB, Ferrettil JJ. Sequence Analysis of the Gene for the Glucan-Binding Protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun* 1990;58:667–73. <https://doi.org/10.1128/iai.58.3.667-673.1990>.
- [168] Hazlett KRO, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Inactivation of the gbpA Gene of *Streptococcus mutans* Alters Structural and Functional Aspects of Plaque Biofilm Which Are Compensated by Recombination of the gtfB and gtfC Genes. *Infect Immun* 1999;67:3909–14. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3909-3914.1999>.
- [169] Matsumura M, Izumi T, Matsumoto M, Tsuji M, Fujiwara T, Ooshima T. The Role of Glucan-Binding Proteins in the Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* 2003;47:213–5. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2003.TB03389.X>.
- [170] Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and Antigenicity of a Novel Glucan-Binding Protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1994;62:2545–52. <https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2545-2552.1994>.

- [171] Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun* 2001;69:6931–41. <https://doi.org/10.1128/iai.69.11.6931-6941.2001>.
- [172] Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Cloning and Sequence Analysis of the *gbpC* Gene Encoding a Novel Glucan-Binding Protein of *Streptococcus mutans*. vol. 65. 1997. <https://doi.org/10.1128/iai.65.2.668-675.1997>.
- [173] Igarashi T, Asaga E, Goto N. The sortase of *Streptococcus mutans* mediates cell wall anchoring of a surface protein antigen. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:266–9. <https://doi.org/10.1034/J.1399-302X.2003.00076.X>.
- [174] Idone V, Brendtro S, Gillespie R, Kocaj S, Peterson E, Rendi M, et al. Effect of an Orphan Response Regulator on *Streptococcus mutans* Sucrose-Dependent Adherence and Cariogenesis. *Infect Immun* 2003;71:4351–60. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4351-4360.2003>.
- [175] Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett* 2007;268:158–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00576.x>.
- [176] Lynch DJ, Michalek SM, Zhu M, Drake D, Qian F, Banas JA. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* Glucan-Binding Protein Deletion Mutants. *Oral Health Dent Manag* 2013;12:191. <https://doi.org/https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4437697/>.
- [177] Mieher JL, Larson MR, Schormann N, Purushotham S, Wu R, Rajashankar KR, et al. Glucan binding protein C of *Streptococcus mutans* mediates both sucrose-independent and sucrose-dependent adherence. *Infect Immun* 2018;86. <https://doi.org/10.1128/IAI.00146-18>.
- [178] Shah DSH, Correspondence RRBR, Russell RRB. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology (N Y)* 2004;150:1947–56. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26955-0>.

- [179] de Dios R, Proctor CR, Maslova E, Dzalbe S, Rudolph CJ, McCarthy RR. Artificial sweeteners inhibit multidrug-resistant pathogen growth and potentiate antibiotic activity. *EMBO Mol Med* 2022. <https://doi.org/10.15252/EMMM.202216397>.
- [180] AlKanderi S, AlFreeh M, Bhardwaj RG, Karched M. Sugar Substitute Stevia Inhibits Biofilm Formation, Exopolysaccharide Production, and Downregulates the Expression of Streptococcal Genes Involved in Exopolysaccharide Synthesis. *Dent J (Basel)* 2023;11. <https://doi.org/10.3390/DJ11120267>.
- [181] Suez J, Cohen Y, Vald e R, Stein-Thoeringer CK, Segal E, Elinav E. Personalized microbiome-driven effects of non-nutritive sweeteners on human glucose tolerance In brief. *Cell* 2022;185:3307–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.016>.
- [182] Dias SA, Pinto SN, Silva-Herdade AS, Cheneval O, Craik DJ, Coutinho A, et al. A designed cyclic analogue of gomesin has potent activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2022;77:3256–64. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac309>.
- [183] Dias SA, Pinto SN, Silva-Herdade AS, Cavaco M, Neves V, Tavares L, et al. Quantitative Imaging of the Action of vCPP2319, an Antimicrobial Peptide from a Viral Scaffold, against *Staphylococcus aureus* Biofilms of a Clinical Isolate. *ACS Infect Dis* 2023;9:1889–900. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00195>.
- [184] Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (S-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage. *Infect Immun* 1992;60:5057–64. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.12.5057-5064.1992>.
- [185] Raafat D, Otto M, Reppschl ager K, Iqbal J, Holtfreter S. Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies. *Trends Microbiol* 2019;27:303–22. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.12.009>.

- [186] Savory N, Lednor D, Tsukakoshi K, Abe K, Yoshida W, Ferri S, et al. In silico maturation of binding-specificity of DNA aptamers against *Proteus mirabilis*. *Biotechnol Bioeng* 2013;110:2573–80. <https://doi.org/10.1002/bit.24922>.
- [187] Savory N, Takahashi Y, Tsukakoshi K, Hasegawa H, Takase M, Abe K, et al. Simultaneous improvement of specificity and affinity of aptamers against *Streptococcus mutans* by in silico maturation for biosensor development. *Biotechnol Bioeng* 2014;111:454–61. <https://doi.org/10.1002/BIT.25111>.
- [188] Oroh SB, Mustopa AZ, Budiarti S, Budiarto BR. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation by DNA aptamer. *Mol Biol Rep* 2020;47:7567–73. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05822-8>.
- [189] Matchawong A, Srisawat C, Sangboonruang S, Tharinjaroen CS. The Ability of Nuclease-Resistant RNA Aptamer against *Streptococcus suis* Serotype 2, Strain P1/7 to Reduce Biofilm Formation In Vitro. *Molecules* 2022;27:3894. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27123894/S1>.
- [190] Shatila F, Yaçın HT, Özyurt C, Evran S, Çakır B, Yaşa İ, et al. Single-stranded DNA (ssDNA) Aptamer targeting SipA protein inhibits *Salmonella Enteritidis* invasion of intestinal epithelial cells. *Int J Biol Macromol* 2020;148:518–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.132>.
- [191] Zhao M, Li W, Liu K, Li H, Lan X. C4-HSL aptamers for blocking quorum sensing and inhibiting biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and its structure prediction and analysis. *PLoS One* 2019;14:e0212041. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212041>.
- [192] Ning Y, Wang X, Chen P, Liu S, Hu J, Xiao R, et al. Targeted inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation by a graphene oxide-loaded aptamer/berberine bifunctional complex. *Drug Deliv* 2022;29:1675–83. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2079768>.
- [193] Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:627–34. <https://doi.org/10.1007/S10295-006-0139-7>.

- [194] Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection* 2006;64:313–25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>.
- [195] Stobie N, Duffy B, McCormack DE, Colreavy J, Hidalgo M, McHale P, et al. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating. *Biomaterials* 2008;29:963–9. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.10.057>.
- [196] Kostenko V, Lyczak J, Turner K, Martinuzzi RJ. Impact of Silver-Containing Wound Dressings on Bacterial Biofilm Viability and Susceptibility to Antibiotics during Prolonged Treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5120–31. <https://doi.org/10.1128/AAC.00825-10>.
- [197] Khardori N, Yassien M. Biofilms in device-related infections. *J Ind Microbiol* 1995;15:141–7. <https://doi.org/10.1007/bf01569817>.
- [198] Venkatesan N, Shroff S, Jayachandran K, Doble M. Polymers as Ureteral Stents. *J Endourol* 2010;24:191–8. <https://doi.org/10.1089/END.2009.0516>.
- [199] Széll T, Köves B, Tenke P, Nyirády P. Biofilmképződés húgyvezetékstent felületén = Biofilm formation on the surfaces of ureter stents. *Magyar Urológia* 2020;32:91–6. <https://doi.org/10.22591/magyuro.2020.3.szellt.91>.
- [200] Navarro S, Sherman E, Colmer-Hamood JA, Nelius T, Myntti M, Hamood AN. Urinary Catheters Coated with a Novel Biofilm Preventative Agent Inhibit Biofilm Development by Diverse Bacterial Uropathogens. *Antibiotics* 2022;11:1514. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11111514/S1>.
- [201] Lamret F, Lemaire A, Lagoutte M, Varin-Simon J, Abraham L, Colin M, et al. Approaching prosthesis infection environment: Development of an innovative in vitro *Staphylococcus aureus* biofilm model. *Biofilm* 2023;5:100120. <https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2023.100120>.
- [202] Sunnerhagen T, Bjarnsholt T, Qvortrup K, Bundgaard H, Moser C. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) prostheses in vitro - biofilm formation and

- antibiotic effects. *Biofilm* 2024;8:100236.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2024.100236>.
- [203] Rebeka V, Zita C, Katalin N, Péter K. Guided Biofilm Therapy. *Magyar Fogorvos* 2016;5:238–41.
<https://doi.org/http://repo.lib.semmelweis.hu//handle/123456789/4027>.
- [204] Shrivastava D, Natoli V, Srivastava KC, Alzoubi IA, Nagy AI, Hamza MO, et al. Novel Approach to Dental Biofilm Management through Guided Biofilm Therapy (GBT): A Review. *Microorganisms* 2021;9:1–17.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9091966>.
- [205] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 2005;41:207–34.
<https://doi.org/10.1016/J.PEP.2005.01.016>.
- [206] GloMelt™ Thermal Shift Protein Stability Kit - Biotium n.d.
<https://biotium.com/product/glomelt-thermal-shift-protein-stability-kit/> (accessed May 12, 2025).
- [207] Biolayer Interferometry (BLI) Services | 2bind n.d.
<https://2bind.com/technologies/bli/#technology> (accessed May 11, 2025).
- [208] Entzian C, Schubert T. Mapping the Binding Site of an Aptamer on ATP Using MicroScale Thermophoresis. *J Vis Exp* 2017:1–9. <https://doi.org/10.3791/55070>.
- [209] Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005;150:119–31.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026>.
- [210] Tolnai Z, Harkai Á, Szeitner Z, Scholz É, Percze K, Gyurkovics A, et al. A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR. *Anal Chim Acta* 2019;1047:225–30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.017>.
- [211] Perkin Elmer Patent - US10677735B2. Hollow polymer fiber optic system for single analyte and multiplexed analyte detection 2016.
<https://doi.org/https://patents.google.com/patent/US10677735B2/en>.

- [212] Cowperthwaite MC, Ellington AD. Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures. *J Mol Evol* 2008;67:95–102. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9130-4>.
- [213] Rockey WM, Hernandez FJ, Huang SY, Cao S, Howell CA, Thomas GS, et al. Rational truncation of an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen using computational structural modeling. *Nucleic Acid Ther* 2011;21:299–314. <https://doi.org/10.1089/nat.2011.0313>.
- [214] Nadal P, Svobodova M, Mairal T, O’Sullivan CK. Probing high-affinity 11-mer DNA aptamer against Lup an 1 (β -conglutin). *Anal Bioanal Chem* 2013;405:9343–9. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7385-0>.
- [215] Le TT, Chumphukam O, Cass AEG. Determination of minimal sequence for binding of an aptamer. A comparison of truncation and hybridization inhibition methods. *RSC Adv* 2014;4:47227–33. <https://doi.org/10.1039/C4RA08243E>.
- [216] Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L. Post-SELEX optimization of aptamers. *Anal Bioanal Chem* 2016;408:4567–73. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9556-2>.
- [217] Sousa AM, Ferreira D, Rodrigues LR, Pereira MO. Aptamer-based therapy for fighting biofilm-associated infections. *Journal of Controlled Release* 2024;367:522–39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.061>.
- [218] Wang S, Mao B, Wu M, Liang J, Deng L. Influence of aptamer-targeted antibiofilm agents for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2018;111:199–208. <https://doi.org/10.1007/S10482-017-0941-4>.
- [219] Mao B, Cheng L, Wang S, Zhou J, Deng L. Combat biofilm by bacteriostatic aptamer-functionalized graphene oxide. *Biotechnol Appl Biochem* 2018;65:355–61. <https://doi.org/10.1002/BAB.1631>.
- [220] Hosseini B, Behbahani M, Dini G, Mohabatkar H, Keyhanfar M. Investigating the anti-streptococcal biofilm effect of ssDNA aptamer-silver nanoparticles complex on a titanium-based substrate. *RSC Adv* 2022;12:24876–86. <https://doi.org/10.1039/D2RA04112J>.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Ákos Harkai, Yoon Kee Beck, Anna Tory, Tamás Mészáros. (2025) Selection of streptococcal glucan-binding protein C specific DNA aptamers to inhibit biofilm formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 288, 138579, 12p. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138579>

IF: 8,5 (D1)

Krisztina Percze, **Ákos Harkai**, Tamás Mészáros. (2024) A Cost-Effective Approach for Single-Stranded DNA Amplification Using Primer-Blocked Asymmetric PCR. *Current Protocols*, 4 (9) e1125, 21p.

<https://doi.org/10.1002/cpz1.1125>

IF: 2,2 (D1)

Egyéb közlemények:

Zoltán Tolnai, **Ákos Harkai**, Zsuzsanna Szeitner, Éva Nagyné Scholz, Krisztina Percze, Anna Gyurkovics, Tamás Mészáros. (2019) A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR. *Analytica Chimica Acta*, 1047, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.017>

IF: 5,977 (Q1)

11. Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok, amiért biomérnökként a Semmelweis Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végezhettem nemcsak tudományos diákköri, hanem doktori munkámat is. Köszönettel tartozom az Intézet vezetőségének, *Prof. Csanády Lászlónak*, *Prof. Csala Miklósnak* és *Prof. Rónai Zsoltnak*, amiért helyet és teret biztosítottak számomra PhD-képzésemet követően is, és támogatták mind kutatói, mind oktatói előmeneteletem.

Köszönöm témavezetőmnek, *Prof. Mészáros Tamásnak*, hogy már a kezdetektől fogva megtisztelt bizalmával, és ezzel lehetőséget adott tudományos ambícióim megvalósítására. Köszönöm, hogy mindig nyitott volt kérdéseimre, javaslataimra, aggodalmaimra és azok megvitatására. Hálás vagyok, amiért folyamatosan biztosította számunkra a színvonalas kutatáshoz, az együttműködésekhez és a szakmai fejlődéshez szükséges feltételeket.

Köszönöm továbbá az *In vitro biológia* munkacsoport valamennyi korábbi és jelenlegi tagjának; *Annának*, *Alexának*, *Briginek*, *Évának*, *Juditnak*, *Julinak*, *Krisztinek*, *Szilvinek*, *Zolinak* és *Zsuzsinak* a tanácsát, segítségét, türelmét és figyelmét – főleg, amiket a nehéz napokon tanúsítottak –, és hogy mindig volt valami vigasztaló finomság a nasipolcon. Külön köszönöm *Tory Anna* TDK hallgatónknak, hogy lelkes és szorgalmas munkájával hozzájárult kutatásom olykor csak pislákoló lángjához. I am also grateful to *Yoon Kee Beck* for his persistent participation in the experimental work of my dissertation.

Köszönöm *Dr. Jeffrey A. Banas*, *Dr. Dobay Orsolya*, a *2bind GmbH*, az *Enzimológiai Intézet* (HUN-REN TTK), *Prof. Vértessy G. Beáta* és *Prof. Kellermayer Miklós* együttműködéseinkben nyújtott szakmai támogatását.

Ezúton mondok köszönetet a lehetetlent jól ismerő, ám mégis leküzdő beszerzési és logisztikai specialistáinknak; *Valinak*, *Marikának*, *Beának* és *Gyöngyinek*.

Hálásan köszönöm *Dr. Kereszturi Éva* házi bírálatát és meglátásait, amikkel szignifikánsan hozzájárult munkám és gondolkodásom minőségéhez.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni *Szeretteimnek*, amiért hittek bennem, és kitartóan támogattak utamon. Külön köszönöm mindezt *Édesanyámnak*, *Bátyámnak*, *Nagymamámnak* és néhai *Nagypapámnak*.

12. Függlék

12.1. A GbpC¹¹¹⁻⁵²² és AgI/II⁴⁵⁷⁻⁹⁹³ fehérjék aminosav-szekvenciáinak illesztése

GbpC(111-522)	AADADNKAQAQTINTAVADYQKAKAEFPQKQEYQNKDFEKYQSDVKEYEAQKAAAYEQYKKEVAQGLAS---	88
AgI/II(457-993)	-----QADLAKYQKDLADYPVKLKAAYEDEQASIKAAALAELEK	37
GbpC(111-522)	-----G--RVEKAAQGLVFINPEAKLSIEGVNQYLTKEARQKH-----ATEDILQQYNTD-----	116
AgI/II(457-993)	HKNEDEGNLTEPSAQNLYDLNANLSLTTDGGKFKASAVDDAFSKSTSKAKYDQKILQLDDLDITNLEQS	108
GbpC(111-522)	NYTAS-----DFTQANPY-----DPKEDTWF--KMKVGDQISVITYDNIVNSKYNDKKISKVKINYTLNSS	174
AgI/II(457-993)	NDVASSMELYGNFGDKAGWSTTVSNNSQVKGWSVLLERQSSATATYTNLQNSYNGKKISKIVYKYTVDPK	179
GbpC(111-522)	TNNEGS-ALVNLFDPTKTIFFIGAQTSNAGRNDKISVTMQIFDYDENGNEIDLSGNNAIMSLSLNHWTTK	244
AgI/II(457-993)	SKFQGQKVWLGIFTDPTLGVFASAYTGQVEKNTSFIKNEFTFYDEDEGKPIINFDN--ALLSVASLNREN--	246
GbpC(111-522)	YGDHVEKVNLDGNEFVKIPGSSVDLHGNEYSAKDNQYKANG--A-----TFNGDGADGWDVAVNADGTPRA	308
AgI/II(457-993)	--NSIEMAKDYTGKFKISGSSIGEKNGMIYATDTLFRQGGGARWTMYTRASEPGSGWSS-----DA	309
GbpC(111-522)	ATAYYGAGAMTYKGEPTFFIVGGNDQN-----LPTTIWFATNSAV--AVPKDPGAKPTPPE	362
AgI/II(457-993)	PNSWYGAGAIRMSGPNNSVILGAISSTLVVPADPTMAIETGKKPNLWYSLNGKIRAVNVKVTKEKPTPPV	380
GbpC(111-522)	KPELKK-PTVTWHKNLVVET--KTEEVPVTPPTTPDEPTPEKPTPE-----DPQSP	412
AgI/II(457-993)	KPTAPTPTIYETEKPLKPAVPAPNYEKERTPPTPTPDQAEPNKPPTPTIYETEKPLEPAPVPEPSYEAERTP	451
GbpC(111-522)	-----	412
AgI/II(457-993)	TRTPDQAEPNKPPTPTIYETEKPLEPAPVPEPSYEAERTPPTPTPDQPEPNKPVPEPTYEVIPPTDPVYQDL	522
GbpC(111-522)	-----	412
AgI/II(457-993)	PTPPSVPTVHFHYFK	537

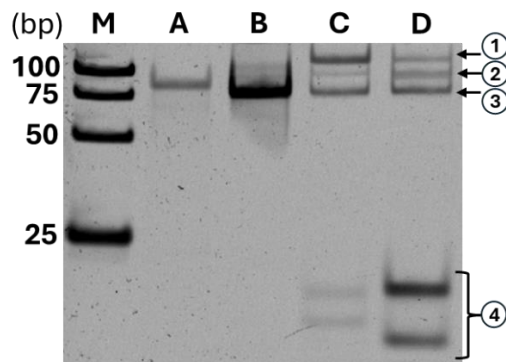
12.2. A mesterséges nyálpuffer (1xASB) összetétele mucin nélkül

Komponens	Koncentráció		Molekulatömeg
Nátrium-klorid	0.88 g/L	15.06 mmol/L	58.44 g/mol
0.2 M Kálium-dihidrogén-foszfát	7.7 mL/L	1.54 mmol/L	136.1 g/mol
0.2 M Dikálium-hidrogén-foszfát	12.3 mL/L	2.46 mmol/L	174.2 g/mol
Kálium-klorid	1.04 g/L	13.95 mmol/L	74.55 g/mol
Kálium-tiocianát	0.19 g/L	1.96 mmol/L	97.2 g/mol
Kalcium-klorid-monohidrát	0.13 g/L	1.01 mmol/L	129 g/mol
Magnézium-klorid-heptahidrát	0.04 g/L	0.18 mmol/L	221.2 g/mol
Ammónium-klorid	0.11 g/L	2.06 mmol/L	53.5 g/mol
Nátrium-hidrogén-karbonát	0.42 g/L	5.00 mmol/L	84 g/mol
Urea (karbamid)	0.12 g/L	2.00 mmol/L	60.1 g/mol
ProClin™ 300	0.3 mL/L	1.17 mmol/L	264.8 g/mol
pH =	7.00		

12.3. Az alkalmazott SELEX folyamatának paramétere

Ciklus	Célmolekula mennyisége	Kapcsolási puffer	Inkubálás	Mosó puffer	Mosási idő
1	600 pmol GbpC	1xASB	60 min, 25°C	1x 300 µl 1xASB	1x 5 min
2	450 pmol GbpC	1xASB +0.01 µg/ml lazacsperma DNS	60 min, 25°C	2x 300 µl 1xASB	2x 5 min
3	300 pmol GbpC	1xASB +0.01 µg/ml lazacsperma DNS	30 min, 25°C	2x 300 µl 1xASB, 1x 300 µl 1xASB +0.01% Tween20	3x 5 min
C1	600 pmol AgI/II	1xASB	30 min, 25°C	-	-
4	600 pmol GbpC	1xASB +0.1 µg/ml lazacsperma DNS	30 min, 25°C	3x 300 µl 1xASB	3x 5 min
5	300 pmol GbpC	1xASB +0.1 mg/ml mucin +0.1 µg/ml lazacsperma DNS	30 min, 25°C	3x 300 µl 1xASB +0.01% Tween20	3x 10 min
C2	kb. 8×10^8 CFU/ml <i>S. mutans</i> Δ GbpC sejt	1xASB	15 min, 25°C	-	-
6	600 pmol GbpC	1xASB +0.1 µg/ml lazacsperma DNS	30 min, 25°C	3x 300 µl 1xASB +0.05% Tween20	3x 5 min
7	300 pmol GbpC	1xASB +0.1 mg/ml mucin +0.1 µg/ml lazacsperma DNS	30 min, 25°C	3x 300 µl 1xASB +0.1 mM dextrán szulfát	3x 5 min
C3	600 pmol AgI/II	1xASB	30 min, 25°C	-	-
8	300 pmol GbpC	1xASB +0.1 mg/ml mucin +0.5 µg/ml lazacsperma DNS	45 min, 25°C	3x 300 µl 1xASB +0.1 mM dextrán szulfát	3x 10 min

12.4. A PBA-PCR termékek elemzése



Az amplifikált A39 aptamer 3-3 µl-ét 10%-os poliakrilamid gélben, 1xTBE-ben elektroforézissel választottuk el, majd GelRed interkalálódó festékkel festettük, és GelDoc készülékkel dokumentáltuk. M: Low Range DNS marker, A: 50 ng egyszálú templát, B: hagyományos PCR, C: PBA-PCR, D: PBA-PCR+RC. Detektálható termékek: ①: részlegesen egyszálú DNS, ②: teljesen egyszálú DNS, ③: kétszálú DNS, ④: primerek, dimerek.

