

Növényi vírus detektálása aptamerek alkalmazásával

Doktori értekezés

Balogh Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola



Témavezető: **Dr. Mészáros Tamás**

Hivatalos bírálók: Dr. Berencsi György tudományos tanácsadó, kandidátus,
Dr. Ambrus Attila tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Machovich Raymund egyetemi tanár, D.Sc.

tagjai: Dr. Jemnitz Katalin tudományos főmunkatárs, Ph.D.,
Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2011

Tartalomjegyzék

1. Ábrák jegyzéke	5
2. Táblázatok jegyzéke	6
3. Rövidítések jegyzéke	7
4. Irodalmi háttér	11
4.1. Bevezetés	11
4.2. Az aptamerek felfedezése	12
4.3. Antitestek és aptamerek összehasonlítása	13
4.4. A SELEX folyamata	15
4.5. Célmolekulák	22
4.6. Random oligonukleotid könyvtár	25
4.7. Aptamerek stabilitása és módosítási lehetőségei	27
4.8. Aptamerek térszerkezete	32
4.9. Aptamerek terápiás célú felhasználása	34
4.10. Vírus-specifikus aptamerek	42
4.11. Az Apple Stem Pitting Virus (ASPV) jellemzése	49
5. Célkitűzések	52
6. Felhasznált anyagok	53
7. Módszerek	59
7.1. Az ASPV burokfehérjéket kódoló szekvenciák klónozása	59
7.2. ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszerben	60
7.3. Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója	61

7.4. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	63
7.5. Western-blot	64
7.6. Dot-Blot	65
7.7. ELISA és ELONA	66
7.8. ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel	66
7.9. ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel	67
8. Eredmények	69
8.1. A szelekció során alkalmazott burokfehérjék bemutatása és összehasonlító analízise	69
8.2. ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszer alkalmazásával	70
8.3. Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója	73
8.4. A burokfehérje-kötő aptamerek prediktív másodlagos szerkezete	74
8.5. Az aptamerek kötőképességének jellemzése felületi plazmon rezonancia (SPR) alkalmazásával	77
8.6. Western-blot analízis	77
8.7. Dot-blot analízis	78
8.8. ASPV kimutatása ELISA és ELONA módszerrel	80
8.9. ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel	81
8.10. ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel	83
9. Megbeszélés	85
9.1. ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszerben	85
9.2. Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója és analízise	87

9.3. A burokfehérje-kötő aptamerek prediktív másodlagos szerkezete	88
9.4. Az aptamerek disszociációs konstansa	90
9.5. Western-blot analízis aptamerek alkalmazásával	90
9.6. Dot-blot analízis aptamerek alkalmazásával	91
9.7. ASPV kimutatása ELISA és ELONA módszerrel	92
9.8. ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel	92
9.9. ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel	93
10. Következtetések	96
11. Összefoglalás	98
12. Summary	99
13. Saját publikációk jegyzéke	100
Köszönetnyilvánítás	100
Irodalomjegyzék	101

1. Ábrák jegyzéke

1. ábra	<i>A SELEX folyamatábrája.</i>	16
2. ábra	<i>Az oligonukleotidok lehetséges módosításai a nukleáz rezisztencia növelésére.</i>	29
3. ábra	<i>Aptamerek leggyakoribb másodlagos szerkezetei.</i>	33
4. ábra	<i>Négy guanin elrendeződése G-kvartett szerkezetben.</i>	34
5. ábra	<i>Aptamer-ellenszer kölcsönhatás sémája.</i>	36
6. ábra	<i>ASPV fertőzés tünetei az átoltott növényi részekben.</i>	49
7. ábra	<i>Elektronmikroszkópos felvétel a gradiens centrifugálással tisztított ASPV részecskékről.</i>	50
8. ábra	<i>Az ASPV felépítésének sematikus ábrája.</i>	51
9. ábra	<i>Az ASPV-izolátumok (MT32 és PSA-H) burokfehérjéinek összehasonlító analízise az aminosav szekvenciák feltüntetésével.</i>	69
10. ábra	<i>Túltermelt burokfehérjék kimutatása 10%-os SDS-PAGE módszerrel.</i>	71
11. ábra	<i>MT32 burokfehérje tisztítása His-Bind affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával.</i>	72
12. ábra	<i>PSA-H burokfehérje tisztítása His-Bind affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával.</i>	73
13. ábra	<i>20-20 MT32-, és PSA-H-specifikus szekvencia összehasonlító analízise.</i>	74
14. ábra	<i>Az MT32 aptamer prediktív másodlagos szerkezete a nukleotidok feltüntetésével.</i>	75
15. ábra	<i>A PSA-H aptamer prediktív másodlagos szerkezete a nukleotidok feltüntetésével.</i>	76
16. ábra	<i>Az aptamerek specifitásának igazolása Western-blot analízissel.</i>	78
17. ábra	<i>Az aptamerek Dot-blot analízise ACLSV-, APMV- és ASPV-fertőzött növényi kivonatokkal.</i>	79
18. ábra	<i>Az aptamerek és az anti-ASPV IgG összehasonlító vizsgálata dot-blot analízissel.</i>	79
19. ábra	<i>ASPV detektálása ELISA és ELONA módszer alkalmazásával.</i>	81

20. ábra <i>PSA-H</i> burokfehérje koncentráció meghatározása DOS-ELONA módszerrel.	82
21. ábra Vírusdetektálás DOS-ELONA módszerrel növényi kivonatokból.	84
22. ábra <i>BL21(DE3)pLysS</i> bakteriális fehérje túltermelő rendszer sematikus ábrája.	86
23. ábra $6\times His$ jelölő címke kötődése Ni-NTA agaróz affinitáskromatográfiás gyantára.	87

2. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat <i>SELEX</i> típusok.	21
2. táblázat Példák aptamer szelekcióra alkalmazott célmolekulákra a disszociációs konstansok (K_d) feltüntetésével.	24
3. táblázat Aptamer hatóanyagú terápiás szerek a klinikumban.	40
4. táblázat Vírusspecifikus aptamerek.	48
5. táblázat Felhasznált anyagok a gyártók feltüntetésével.	53
6. táblázat A kísérletek során felhasznált pufferek, oldatok az összetétel feltüntetésével.	55
7. táblázat A kísérletek során alkalmazott aptamerek és primerek szekvenciái.	57
8. táblázat 10%-os poliakrilamid gél összetétele SDS-PAGE-hez.	64

3. Rövidítések jegyzéke

1-MELM	1-Metilimidazol
ACLSV	„Apple Chlorotic Leaf Spot Virus”
AIDS	„Acquired Immune Deficiency Syndrome”
ALISA	„Sandwich Aptamer-linked Immobilized Sorbent Assay”
AP	Alkalikus Foszfátáz
APMV	„Apple Mosaic Virus”
Arg	Arginin
ASPV	„Apple Stem Pitting virus”
ATP	Adenozin-trifoszfát
BSA	„Bovine Serum Albumin”, szarvasmarha szérum albumin
cAMP	Ciklikus Adenozin Monofoszfát
CCL2	„Chemokine (C-C motif) ligand 2”
CE	„Capillary Electrophoresis”
CXCL12	„Chemokine (C-X-C motif) ligand 12”
DAS-ELISA	„Double Antibody Sandwich- Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
dATP	Dezoxi Adenozin-trifoszfát
dIdC	Poli-(dezoxi-inozin-dezoxi-citidin)
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	Dezoxi-ribonukleotid Trifoszfát
DTT	Ditiotreitol
DOS-ELONA	„Double Oligonucleotide Sandwich

	ELONA”
ECL	„Enhanced Chemiluminescence”
EDC	„1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide”
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
eIF3	„Eukaryotic Translation Initiation Factor 3”
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
ELONA	„Enzyme Linked Oligonucleotide Assay”
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay”
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FMN	Flavin-mononukleotid
HCV	Hepatitis C vírus
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography”
hTNF α	„Human Tumor Necrosis Factor α ”
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Izopropil-tiogalaktopiranozid
IRES	„Internal Ribosome Entry Site”
IU	„International Unit”
HRP	„Horseradish Peroxidase”
K_d	Disszociációs konstans
KOD polimeráz	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> polimeráz
LB	Luria-Bertani
Lys	Lizin
NF-IL6	„Nuclear Factor of IL-6 Gene”
NF κ B	„Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells”
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance”

NTA	„Nitrilotriacetic Acid”
PBS	„Phosphate Buffered Saline”
PCR	„Polymerase Chain Reaction”
PDGF	„Platelet-derived Growth Factor”
PEG	Polietilén-glikol
pNPP	<i>p</i> -Nitrofenil-foszfát
PO-dNTP	„Phosphodiester oligodeoxynucleotides”
PS-dNTP	„Phosphorothioate oligodeoxynucleotides”
PSPV	„Pear Stony Pit Virus”
PVDF	Polivinilidin-fluorid
PVYV	„Pear Vein Yellow Virus”
RNS	Ribonukleinsav
RSV	Rous Sarcoma vírus
RT	Reverz transzkriptáz enzim
RT-PCR	„Reverse transcription polymerase chain reaction”
SARS-COV	„Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus”
SDS	Na-lauril-szulfát
SDS-PAGE	Na-lauril-szulfát -Poliakrilamid- Gélelektroforézis
SELEX	„Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment”
SOB	„Super Optimal Broth”
SOC	„Super Optimal broth with Catabolite repression”

Tat	„Trans-Activator of Transcription”
TEMED	Tetrametil-etiléndiamin
VACV	Vaccinia vírus
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor”

4. Irodalmi háttér

4.1. Bevezetés

A genomikai kutatások segítségével megismerhettük a fehérjéket kódoló genetikai információt, és ennek analízisével a fenotípusra jellemző mutációkat, mintázatokat azonosíthattunk. A gének ismerete önmagában azonban nem elegendő egy élőlény aktuális állapotának jellemzésére, mivel a gének és fehérjék kifejeződését számtalan folyamat, és környezeti hatás szabályozza. A proteomika eszközei az expresszálandó fehérjék vizsgálatával a szervezet aktuális állapotáról nyújtanak információt, így fontos kiegészítői a genomikai és transzkriptomikai adatoknak. A kóros elváltozás hatására kifejeződő fehérjék fontos biológiai információt hordoznak, amelyet megismerve új diagnosztikai, terápiás vagy akár preventív eszközöket fejleszthetünk a gyógyászatban. A proteomika egyik nagy kihívását jelenti az új, patológiás állapotokra jellemző biomarkerek azonosítása, és ezt követően rutinszerű kimutatásukra alkalmas eljárások kidolgozása. A humán proteom körülbelül húszezer fehérjét és ezek változatos hasítási és poszttranszlációs variánsait foglalja magába, amelyek széles, a moláristól a pikomolárisig terjedő koncentrációtartományban lehetnek jelen. Mindezek következtében a proteomikai mérési módszereknek igen érzékenyeknek, specifikusaknak és pontosaknak kell lenniük, így a biomarkerek azonosítása és kvantifikálása nagy technikai kihívást jelent. A legelterjedtebb fehérjeanalitikai módszerek a tömegspektrometria, a kétdimenziós gélelektroforézis és az antitest alapú technikák, melyek közül az első kettő jelenleg nem alkalmas nagy áteresztőképességű vizsgálatokra. A rutin diagnosztikai módszerek közül az antitest alapúak a legérzékenyebbek, a célmolekulához való nagy affinitásuknak köszönhetően a fehérje kimutatási határuk akár pM alatti tartományban is lehet. Alkalmazásukat azonban az in vivo előállításból fakadó tényezők, illetve kémiai, fizikai hatásokra való érzékenységük korlátozzák. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy nagy mintaszámú proteomikai vizsgálatokhoz olyan új receptor molekulákra van szükség, amelyek az antitestekhez hasonlóan nagy affinitással és szelektivitással rendelkeznek, azonban gyorsan előállíthatóak és az ellenanyagoknál kedvezőbb kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek.

4.2. Az aptamerek felfedezése

Az aptamer kifejezés az aptus és meros, illeszkedés, illetve részecske jelentésű görög szavakból származik. Az elnevezés olyan rövid, egyszálú DNS vagy RNS molekulákat jelöl, amelyek specifikus és komplex térbeli szerkezetük következtében nagy affinitással kötődnek a célmolekuláikhoz. Az első aptamereket mintegy húsz éve írták le, és habár napjainkra már több mint ezer aptamer szekvencia ismert, a terület robbanásszerű fejlődése az utóbbi öt évre tehető, a közelmúltban megjelent publikációk száma és jelentősége alapján pedig kijelenthető, hogy ez minden bizonnyal még csak a kezdet.

1990-ben Tuerk és Gold egy olyan új módszert írt le, amivel random oligonukleotid könyvtárból fehérje célmolekulára szelektáltak erősen és szelektíven kötődő RNS aptamereket. Kísérletük során a Gp43 T4 DNS polimerázhoz kapcsolódó RNS szekvencia nyolc nukleotid hosszúságú szakaszát randomizálva, egy ~65000 különböző oligonukleotidot tartalmazó könyvtárat hoztak létre, hogy újabb, nagy affinitással kötődő RNS szekvenciákat azonosítsanak. A szelekcióhoz a fehérjét nitrocellulóz membránon immobilizálták, és a teljes random RNS könyvtárral kölcsönhatásba hozták. A kialakult polimeráz-RNS komplex oligonukleotidjait amplifikálták, majd meghatározták Gp43 kötőképességüket. Az inkubációs és amplifikációs lépések többszöri ismétlését követően az eredeti szekvencia mellett egy másik megegyező affinitású, de négy nukleotidban eltérő Gp43 specifikus szekvenciát azonosítottak. Munkájuk igazi jelentőségét az adja, hogy felismerték az eljárás általános alkalmazhatóságát, és nekik köszönhető a módszer SELEX-nek (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) történő elnevezése is (1).

Szinte teljesen egy időben két másik kutató, Ellington és Szostak hasonló szelekciós módszer alkalmazásával, random RNS könyvtárból kiindulva olyan stabil térbeli szerkezettel rendelkező szekvenciákat azonosítottak, amelyek zsebszerű kötőhelyet alkotva képesek kismolekulájú festékek (Cibacron Blue, Reactive Blue 4) specifikus megkötésére. A módszerben rejlő lehetőséget és annak általános alkalmazhatóságát ez a két szerző is felismerte, és tőlük származik a célmolekulához specifikusan kötődő oligonukleotidokra alkalmazott aptamer elnevezés (2). Két évvel később ugyanez a szerzőpáros azt is igazolta, hogy nem csak RNS molekulák

funkcionálhatnak aptamerként, ugyanis random DNS könyvtárból kiindulva is sikeresen szelektáltak szerves festékekre specifikus aptamereket (3).

Az aptamerek szerkezetileg nagyon hasonló molekulákat is megkülönböztetnek, és specifitásuk lehetővé teszi, hogy különbséget tegyenek királis molekulák enantiomerjei között is (4, 5). Az aptamerek analitikai és diagnosztikai felhasználása nagyon sokrétű lehet. Alkalmasak többek között fehérjék és kis molekulatömegű anyagok elválasztására és tisztítására. Újfajta receptor molekulákként alkalmazhatóak affinitás kromatográfiában (6), affinitáson alapuló kapilláris elektroforézisben (7), áramlásos citometriában (8) és különböző bioszenzorokban is. (9, 10).

4.3. Antitestek és aptamerek összehasonlítása

Az aptamerekre elsősorban, mint az ellenanyagok lehetséges alternatíváira tekinthetünk, így érdemes összevetni a két molekula típus előnyös és hátrányos tulajdonságait. Az antitestek fehérjék specifikus detektálására történő első alkalmazása a múlt század ötvenes éveire datálható, és az 1970-es évekre immunizált állatok poliklonális szérumának ilyen irányú felhasználása már rutinszerűvé vált. Az immunológiai módszereken alapuló fehérje és kismolekula detekciós módszerek fejlesztésének további lendületet adott a monoklonális antitestek nagy mennyiségű, reprodukálható előállítására lehetőséget teremtő hibridóma technológia megjelenése (11). Habár ennek a technológiának köszönhetően napjainkra elméletileg bármekkora antitestigényt ki lehet elégíteni, valójában a megfelelő hibridóma sejtvonalak szelekciója és fenntartása idő- és költségigényes folyamat (12).

A monoklonális ellenanyag termelés biztosítja az azonos minőségű, homogén antitestek folyamatos elérhetőségét, azonban in vivo jellegének következtében, nem nyújt megoldást a toxikus illetve alacsony antigenitású anyagok elleni antitestek előállítására. Az antitestek olyan, négy alegységből felépülő, nagyméretű, mintegy 150 kDa-os fehérjék, amelyek denaturációjuk során elvesztik funkcionalitásukat, így csak a fiziológiás viszonyokhoz közeli körülmények között alkalmazhatóak, és tárolásuk is nagy gondosságot igényel. Az ellenanyagok in vivo szelekciós folyamat eredményei, ezért antigén kötődésük kinetikai paraméterei nem választhatóak meg szabadon, affinitásuk a célmolekulához nem szabályozható. Az antitesteket állati eredetű sejtek

termelik, ami terápiás alkalmazásukat is megnehezíti, mivel az emberi szervezetbe juttatva immunválaszt válthatnak ki (13). Az elmúlt évtizedben az *in vitro* létrehozott, tervezett antitestek és antitest fragmentumok felülmúlják a hibridóma technológiával előállítottakat, de ezek nagy mennyiségű előállítását még nem sikerült gazdaságosan megoldani (14).

Az antitesteknél felsorolt problémák jelentős része kiküszöbölhető, ha a célmolekulák specifikus felismerésére és megkötésére szintetikus receptor molekulákat hozunk létre. Az *in vitro* szelekciónak és előállításnak köszönhetően az aptamerek ígéretes szintetikus receptor molekulák (15).

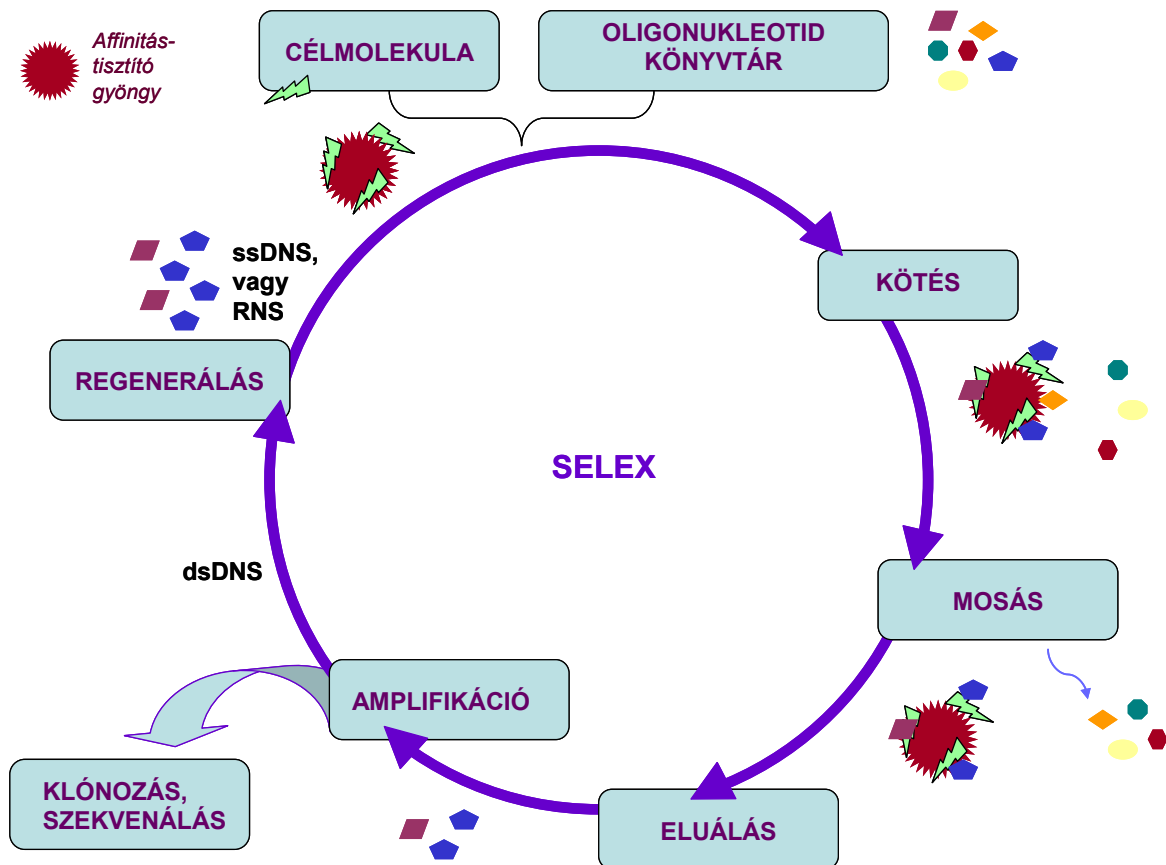
Az aptamerek előnyeinek hátterében a szelekciójuk *in vitro* jellege és kémiai szerkezetük áll. Előállításuk nem igényel élő állatot, sejtvonalat, így elméletileg bármilyen toxikus vagy alacsony immunogenitású célmolekulára szelektálható aptamer. Ráadásul a szelekció körülményei viszonylag szabadon választhatóak, úgy alakíthatóak, hogy optimálisak legyenek a későbbi *in vitro* diagnosztikai meghatározásokhoz, melyek körülményei sok esetben távol állnak a fiziológiás viszonyoktól. A szelektált aptamerek nukleotid szekvenciája pontosan ismert, így kémiai szintézissel bármikor nagy tisztaságban reprodukálhatóak (12). Az *in vitro* szelekció további előnye, hogy automatizálható, így az aptamer előállítása nagyszámú célmolekulára is rövid időn belül kivitelezhető (16-19).

Az aptamerek kémiai szerkezete egyszerűbb, mérete pedig kisebb az antitestekénél, ennek ellenére affinitásuk és specifitásuk is igen nagy lehet, a disszociációs konstansuk az antitestekhez hasonlóan μM - pM tartományba esik (20). A foszfodiészter kötéseknek, és a denaturációt követő regenerálhatóságuknak köszönhetően hosszú távon stabilabbak, a hőmérsékletváltozásra kevésbé érzékenyek, mint az antitestek. Nukleinsavak lévén könnyen, irányíthatóan módosíthatóak különböző funkciós csoportokkal vagy jelölő molekulákkal.

Az aptamerek további előnyös tulajdonságai, hogy szemben az ellenanyagokkal a szervezetbe juttatva nem váltanak ki immunválaszt, ezért terápiás célokra is alkalmazhatóak, egyszerűen előállítható oligonukleotid ellenszerükkel (komplementer szekvenciájukkal) pedig terápiás hatásuk fel is függeszthető (21, 22). Az aptamerek a sejtekbe is bejuttathatóak, így alkalmasak lehetnek intracelluláris célmolekulák detektálására, gátlására (23) és sejtek vizualizálására is.

4.4. A SELEX folyamata

A SELEX egy iteratív módszer, amiben az in vitro szelekciós és amplifikációs lépések váltják egymást. A tipikus SELEX módszer kiindulási alapja egy kémiai úton szintetizált random oligonukleotid könyvtár. Ez a könyvtár általában 10^{13} - 10^{15} -féle különböző oligonukleotidból áll és ebből a darwini szelekcióhoz hasonlóan, szelekciós nyomás hatására viszonylag kisszámú, optimalizált szerkezeti elemekkel rendelkező szekvenciához lehet jutni (24). Az oligonukleotid könyvtárból az affinitással rendelkező szekvenciák a szelekció során alkalmazott célmolekulához kötődnek, elválasztják őket a nem kötődött szekvenciáktól, majd amplifikálásra kerülnek. Az így nyert, célmolekulakötő képességét tekintve feldúsított oligonukleotid könyvtárat használják a következő SELEX ciklusban. Az iteratív módszer eredményeként az eredeti random oligonukleotid könyvtár viszonylag kevés szekvenciára redukálódik, amelyek a legnagyobb affinitással, és legspecifikusabban kötődnek a célmolekulához (1. ábra). A SELEX módszer alkalmazásával sok aptamer esetében a monoklonális antitestekéhez hasonló affinitást értek el.



1. ábra: A SELEX folyamatábrája.

A SELEX módszer egyik legfontosabb lépése a nem kötődött szekvenciák hatékony eltávolítása a kötődöttektől. Ebben nyújt segítséget a célmolekula immobilizálása valamilyen hordozó mátrix felületén, úgymint mikrotiter tálcán, affinitástisztító gyantán, membránon vagy mágneses gyöngyökön. A kapcsolás egyaránt történhet elsőrendű, illetve másodrendű kémiai kötések keresztül. Az egyik legelterjedtebb immobilizálási módszer a jelölő címkével (Ni^{2+} , biotin, GST stb.) ellátott rekombináns fehérjék kapcsolása a megfelelő módon módosított felületre (25). Az affinitástisztításra alkalmazható motívumot leggyakrabban sepharose vagy agaróz gyöngyök hordozzák (26). A megközelítés hátránya, hogy a technikailag kezelhető mennyiségű gyanta előállításához nagyobb mennyiségű célmolekulára van szükség és a szelekció kivitelezése is körülményesebb. A SELEX-et gyakran ultrafiltrálással, nitrocellulóz membrán alkalmazásával (27) oldják meg, mivel a megfelelően kiválasztott membránokhoz a fehérjék nem specifikusan kötődnek, a nukleinsavak

viszont nem lépnek vele kölcsönhatásba. Ennél a megközelítésnél a fehérje típusú célmolekulával telítik a membránt, majd inkubálják az oligonukleotid könyvtárral, és a kötődött szekvenciákat a mosási lépések után eluálják (1, 28, 29). A módszer hátránya, hogy nem alkalmazható kisméretű célmolekulák esetén. Az immobilizálás megoldható megfelelően módosított mágneses hordozó részecskék felületén is (30-33). A módszer előnye, hogy a szelekcióhoz nagyon kis mennyiségű célmolekula is elegendő, és alkalmazásukkal elhagyható a centrifugálás, szűrés és más elválasztási lépések, illetve egyszerűen kezelhetők, moshatók mágneses állvány segítségével. Nagy műszerigényű elválasztási technikák is ismertek, amelyek lehetővé teszik a kötő szekvenciák feldúsulásának folyamatos megfigyelését. A felületi plazmon rezonanciás mérőeszköz (SPR) (34), az evaneszcens fény változásának detektálásával képes a szenzorfelületen zajló biomolekuláris kölcsönhatások valós idejű vizsgálatára. A szenzor chip-en rögzített humán influenza A/Panama (H3N2) vírusra szelektáltak ezzel a módszerrel RNS aptamert (34). Az SPR-rel végzett szelekció előnyei, hogy az immobilizált célmolekulák újrahasznosíthatóak, és információ nyerhető az oligonukleotidok célmolekula kötőképességéről még a szelekció folyamata közben is (25).

Ismertek olyan technikák is, amelyekkel a nem kötődő oligonukleotidok elválasztása megoldható a célmolekula immobilizálása nélkül. Ilyen módszer a kapilláris elektroforézis (CE SELEX) (35-37), az Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (38) és a centrifugálás (39).

A kapilláris elektroforézis során a célmolekula natív állapotban, szabadon van jelen az oldatban, így kizárható az immobilizációból fakadó szerkezetváltozás. A célmolekulát a random oligonukleotid könyvtárral inkubálják, ekkor kialakul az aptamerekkel alkotott komplex, amely a kapillárisban feszültségkülönbség hatására elválasztható a nem kötődött szekvenciáktól. A mobilitási különbség alapján történő elválasztás után, UV detektálás segítségével külön frakcióba gyűjthető az aptamer-célmolekula komplex. A CE SELEX számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a többi szeparációs technikához viszonyítva. Ide sorolhatók a gyorsaság, az elválasztás hatékonysága, a minimális mintatérfogat és, hogy néhány kilodaltonos peptidekre is alkalmazható (40). A CE alkalmazásával kevesebb, akár néhány szelekciós ciklus elvégzésével is nagy affinitású aptamerek nyerhetőek (35). A CE SELEX-hez hasonlóan az EMSA módszerben is a mobilitási különbséget használják ki, azzal az eltéréssel,

hogy itt a méret és töltés szerint, poliakrilamid gélben történik az elválasztás. A gélből az elválasztás után kivágják a komplexet tartalmazó részt és a következő szelekciós ciklusra kitisztítják a célmolekulához kötődött oligonukleotidokat.

A SELEX célja a célmolekulát legnagyobb affinitással és specifitással kötő szekvenciák izolálása a random oligonukleotid könyvtárból, ezért az egymást követő lépések során különböző megközelítésekkel fokozatosan növelik a szelekciós nyomást. A kiindulási könyvtár elméletileg minden egyedi oligonukleotidot egyetlen kópiában tartalmaz, így az egyes szekvenciák elvesztésének esélye az első szelekciós ciklusoknál a legnagyobb. Ezt elkerülendő, általában nagyobb célmolekula/oligonukleotid aránnyal kezdik a szelekciót, és a ciklusok során a célmolekula mennyiségének fokozatos csökkentésével dúsítják a nagy affinitással rendelkező szekvenciákat (41). Hasonló logikát követve, az oligonukleotid-célmolekula inkubációs idő csökkentésével és az egyre intenzívebb mosási körülményekkel is növelhető a nagy affinitással rendelkező oligonukleotidok száma. Ez utóbbi a gyakorlatban a mosási idő illetve a mosó puffer térfogatának növelésével, valamint a puffer összetételének változtatásával egyszerűen kivitelezhető (42).

Az aptamerek nagyfokú specifitását biztosítják a SELEX ciklusok közé beiktatható negatív és kontraszelekciós (Counter SELEX) lépések. A negatív szelekciós lépésben eliminálják azokat a szekvenciákat, amelyek a szelekció során alkalmazott hordozó anyagokhoz és felületekhez nem specifikusan kötődnek (3), a kontraszelekciós lépésben pedig a célmolekulához szerkezetileg nagyon hasonló analógot alkalmaznak, és az ehhez kötődő szekvenciákat eliminálják (4). A kontraszelekciós lépések teremtik meg a lehetőséget a nagyfokú homológiát mutató fehérjékre vagy akár csak egyetlen funkció csoportban különböző kismolekulákra specifikus aptamerek előállítására. Napjainkban egyre elterjedtebben alkalmazzák ezt a megközelítést sejtekre, baktériumokra, vírusokra specifikus aptamerek szelekciójára. Ezekben az esetekben az oligonukleotidot kötő, tulajdonképpen célmolekula a kiinduláskor ismeretlen. A módszert többek között sikeresen használták glioma sejteket felismerő aptamerek izolálására. A kísérlet során U87MG glioma sejtekkel inkubálták az oligonukleotid könyvtárat, a kontraszelekciós lépésekhez pedig a kevésbé malignáns T98G glioma sejteket használtak, és a két sejtvonal megkülönböztetésére képes aptamereket nyertek (43) (12).

A SELEX-ben a nem kötődött szekvenciák eliminálását a kötődött oligonukleotidok amplifikációja követi, amelyet megelőzhet azok elúciója a célmolekuláról, de ez nem feltétlenül szükséges. Ha sor kerül rá, az elúciós módszer lehet denaturáció, ami történhet hővel (30) vagy vegyszer, például SDS, karbamid vagy EDTA hozzáadásával (28, 44, 45). Az amplifikáció célja, hogy csak a célmolekulához kötődött szekvenciák sokszorozódjanak, és létrejöjjön egy kötőképeség szempontjából feldúsított oligonukleotid könyvtár. Az amplifikáció során módosítások is bevezethetőek speciális primerek segítségével. Így plusz funkciós csoportok kapcsolhatók a DNS-hez detektáláshoz, immobilizáláshoz vagy méretnöveléshez. A DNS aptamerek (DNS SELEX) amplifikációs lépése egyszerűbb, mivel ez csupán egy PCR reakciót jelent, amihez templátként elúció nélkül közvetlenül is alkalmazható a célmolekula-oligonukleotid komplexe, akár affinitás-kromatográfiás gyantán immobilizálva is. Az RNS aptamerek (RNS SELEX) amplifikációjához először egy reverz transzkripció lépésre van szükség, majd az ebben szintetizálódott cDNS-t 5' végén T7 promóterrel ellátott forward primerrel kell amplifikálni PCR segítségével.

Az oligonukleotid könyvtárak regenerálásához, a következő SELEX ciklus elvégzése előtt szükséges még az úgynevezett kondicionálási lépés. RNS aptamerek esetében ez in vitro transzkripciót jelent T7 polimerázzal, és a szintetizált RNS-ek képezik az új könyvtárat. A DNS aptamerek esetében a PCR amplifikáció kétszálú oligonukleotidokat eredményez, amiből vissza kell nyerni a szelekciós lépésben alkalmazott egyszálú szekvenciákat. A szálak szeparálására több módszer is alkalmazható, sok esetben ribózzal, hexaetilénlikollal és adeninekkel módosítják, vagy más módon megnövelik annak a szálnak a méretét, amire később már nincs szükség, majd gélelektroforézissel, kihasználva a méretkülönbséget, elválasztják a kétféle szálakat (46-48). Egy másik megoldásban a biotinilált szálakat sztreptavidinnel módosított mikrotiter tálca vagy gyanta felületéhez kötik, és a kétszálú DNS denaturációjával választják külön a szálakat (49). További lehetőség az aszimmetrikus PCR, amelyben az egyik primerből sokkal többet alkalmaznak, mint a másiktól, és ezzel eltolják a termékképződést a kívánt szál termelésének irányába (50). Az egyik primer 5' végét foszfát csoporttal is módosíthatják, majd a PCR-t követően a kétszálú DNS-t fág λ endonukleázzal kezelik, ami csak a foszforilált szálakat hasítja (51).

A szelekció kezdetén a szekvenciák átlagos affinitása a ciklusok számával exponenciálisan nő (29, 52, 53), majd egy bizonyos ciklusszám után elér egy maximális értéket. Ezért a legbiztosabb módszer a szükséges ciklusszám meghatározására, a szelektált szekvenciák kötőképességének analízise egy-egy elvégzett szelekciós ciklus után (29). Ekkor a kötőképesség „telítődése” jelzi, hogy a szelekció befejeződött. Egy sikeres aptamer szelekció általában 5-15 ciklusból áll, bár néhány esetben már az első pár szelekciós ciklus után megfigyelhető a célmolekula-specifikus szekvenciák felszaporodása az oligonukleotid könyvtárban (28, 51, 54).

Az utolsó SELEX ciklusban a kötőképesség alapján feldúsított oligonukleotidok, azaz aptamerek bázissorrendjét szekvenálással határozzák meg, és a szekvenciák összehasonlító analízise alapján kiválasztják a leggyakrabban előforduló vagy hasonló szerkezeti elemmel rendelkező szekvenciákat. A kiválasztott szekvenciákat ezután kötőképesség, affinitás és specifikusság szempontjából jellemezik. A szekvenálás egyik módja, hogy az utolsó ciklusban nyert szekvenciákat klónozó vektorba illesztik, baktériumokba klónozzák, majd az egyedi, csak egyféle szekvenciát tartalmazó kolóniákat szekvenálják. Ekkor általában 50 vagy ennél több kolóniát szekvenálnak és analizálnak. Emellett ismertek nagy áteresztőképességű szekvenálási eljárások is, amikor az utolsó ciklusban nyert összes oligonukleotid bázissorrendjét meghatározzák (55). Ezzel a módszerrel szekvenálással nyomon követhető az egyes szekvenciák feldúsulása, kevesebb szelekciós ciklusra van szükség, és nagyobb affinitású aptamerek nyerhetők ($K_d \approx 3$ nM). A PDGF-BB növekedési faktorra specifikus aptamerek szelekciójához mindössze három ciklust végeztek el, és az aptamerek affinitása 3-8-szorosa volt a hagyományos klónozással szelektált aptamerekéhez képest. Mindhárom ciklusban $\sim 2-9 \times 10^6$ szekvenciához jutottak a Genome Analyzer II (Illumina) nagy áteresztőképességű szekvenátorral, melyek közül szoftveres kiértékeléssel választották ki a leginkább feldúsult szekvenciákat (55).

A szelekció végeztével a szekvenciákat összehasonlító analízisnek vetik alá, hogy megállapítsák a közöttük lévő homológiát. Az összehasonlító analízisre különböző programok, és interneten elérhető alkalmazások állnak rendelkezésre (56, 57). A programok segítségével felderíthetőek az azonos szekvenciák vagy konzervált szekvencia részletek, és ezáltal meghatározható a szelektált szekvenciák közötti homológia. Az aptamereket szelekció után csonkolhatják, és bizonyos esetekben a

szekvencia lerövidítése a kötésért felelős régióra az affinitás növekedését eredményezheti (58-60). A szelektált aptamerek tulajdonságai tovább optimalizálhatók egy második szelektációs folyamattal, melynek során kiinduló lépésként az aptamerekből mutagenézissel vagy irányított módosításokkal új könyvtárat hoznak létre (61, 62).

Az alábbi táblázat a legáltalánosabban alkalmazott szelektációs eljárásokat összegzi (1. táblázat).

1. táblázat: SELEX típusok (15)

SELEX módszer	Jellemző	Alkalmazás	Referencia
Tailored SELEX	Fix szekvenciák nélküli oligonukleotid könyvtár alkalmazása.	Az aptamer méretének minimalizálása.	(63)
Tükörképi SELEX (Spiegelmer technika)	A természetes molekulák enantiomerjének alkalmazása a szelekció során.	Spiegelmerek- nukleáz rezisztens aptamerek létrehozása L ribóz, vagy L dezoxi-ribóz tartalmú nukleotidokkal.	(64) (65)
Kovalens, vagy Photo SELEX	UV fény hatására kovalens kötést kialakító oligonukleotidok szelekciója.	Fotoaptamerek létrehozása.	(66)
Toggle SELEX	A fehérje típusú célmolekula analógok váltogatása a szelekció során.	Több célmolekulára, különböző mértékű specifitással bíró aptamerek szelekciója.	(67)
Counter SELEX (Kontraszelekció)	A célmolekula analógjának alkalmazása a szelekció során.	A célmolekulára nagyon specifikus, kis szerkezeti különbségeket is megkülönböztető aptamerek szelekciója.	(4)
Negatív SELEX	A szelekció során felhasznált anyagok, hordozók alkalmazása a szelekció során.	A háttérhez kötődő szekvenciák eliminálására beiktatott lépés a SELEX folyamatába.	(3)

CE SELEX	A célmolekula nincs hordozóhoz kötve a kapillárisban végzett szelekció során.	Rövid idő alatt, kis ciklusszámmal, nagy affinitású aptamerek szelekciója.	(35)
Blended SELEX	A nukleinsavak méretének növelése nem nukleinsav anyagokkal, amelyek a célmolekulával kölcsönhatásba lépnek.	A kötőképesség mellett új tulajdonságokkal ruházza fel az aptamereket.	(68)

4.5. Célmolekulák

1990-óta sokféle célmolekulára szelektáltak aptamereket. Többek között szervetlen anyagokra, szerves kismolekulákra, peptidekre, fehérjékre, szénhidrátokra, antibiotikumokra és célmolekulák komplex keverékére is (24, 69, 70). Aptamerek szelektálhatóak nukleinsavakhoz kapcsolódó molekulákra, például nukleotidokra, kofaktorokra, nukleinsav-kötő fehérjékre, polimerázokra vagy szabályozó fehérjékre, de olyan molekulákra is, amelyek a természetben nem kötődnek nukleinsavakhoz (71, 72).

Az aptamereket az alap- és alkalmazott kutatásban nukleinsavak és fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatára, fehérjék detektálására és specifikus inhibitorok kifejlesztésére (73-76) is alkalmazzák. Utóbbi esetben különböző növekedési faktorok, hormonok, enzimek, sejtfelszíni receptorok, toxinok, vírusok és patogén mikroorganizmusok fehérjéi lehetnek a szelekciós célpontok, és az így kifejlesztett inhibitorok segítségével később funkcionális tanulmányokat végezhetnek, vagy új gyógyszereket fejleszthetnek (21, 77-80).

A fehérjék igen nagy, több funkciós csoportot tartalmazó felületekkel rendelkeznek, emiatt a szelekció optimális célmolekulái. A legtöbb aptamert fehérjékre vagy a vizsgált fehérje egy epitópját képező peptidre szelektálták. Ezek közül is a trombinra szelektált, G-quadruplex struktúrát kialakító aptamert (74) tanulmányozták eddig a legtöbbet, és alkalmazták leggyakrabban modellként új aptamer alapú technikák kifejlesztésében.

Egy meghatározott célmolekulán túl célmolekulák keverékére, teljes sejtekre, szövetekre, baktériumokra és vírusokra is alkalmazható a SELEX. Ezek közül a leggyakoribb komplex szelekciós célpont valamilyen sejt, aminek a sejtfelszíni molekuláira, gyakran fehérjéire kötődnek az aptamerek. Az aptamerek alkalmasak lehetnek például környezeti hatásokra vagy kóros elváltozás hatására megváltozó sejtfelszíni molekulák felismerésére (24, 81, 82). A SELEX-ben alkalmazott oligonukleotid könyvtár változatosságából adódik, hogy aptamerek elméletileg bármire szelektálhatóak, azonban a szelekció során alkalmazott célmolekulák rendelkezhetnek olyan tulajdonságokkal, amelyek elősegítik, hogy a szelektált aptamerek nagy affinitással és specifikusan kötődjenek hozzájuk. Ezek a tulajdonságok az aptamer-célmolekula intermolekuláris komplex kialakulásában fontosak, amiért elsősorban a pozitív töltésű csoportok (pl.: primer amino-csoportok), a hidrogénhid-kötésben részt vevő donorok és akceptorok valamint az aromás komponensek felelősek (22, 70). Mindez azonban nem jelenti azt, hogy hidrofób tulajdonságú vagy negatív töltésű anyagok nem szolgálhatnak az aptamer szelekció célmolekuláiként. A farnezilált Ras peptid farnezil csoportjára szelektált aptamer (83), a Moenomycin A antibiotikum apoláros lipid oldalláncához ($K_d \approx 400 \text{ nM}$) (84) és a bakteriális lipopoliszacharid lipid A részéhez kötődő nagy affinitású aptamerek bizonyítják, hogy hidrofób molekulákra is izolálható aptamer (85). A valin és izoleucin alifás aminosavak és az ezekre specifikus aptamerek kölcsönhatását tanulmányozták, minek alapján valószínűsítik, hogy az aptamer hidrofób kötőhelyének kialakításáért az RNS molekulában konzervált G/U motívumok felelősek (86). Más források szerint az aptamer timidineken keresztül képes kölcsönhatásba lépni apoláros molekulákkal (85). Negatív töltésű célmolekulára példaként említhető a neutrális pH-n negatív töltésű (pI=5,52) Neuropeptid Y peptid, amelyre nanomoláris affinitású aptamert szelektáltak ($K_d \approx 800 \text{ nM}$) (40).

Az alkalmazás szempontjából az aptamer-célmolekula disszociációs konstans (K_d) értéke az aptamer egyik legfontosabb tulajdonsága. A K_d általánosságban a fehérjék esetében alacsonyabb, a 10^{-11} - 10^{-8} M tartományba esik. Kismolekulák esetében ez az érték 10^{-6} - 10^{-7} M körül van, mivel itt kevesebb lehetőség van az aptamer és a célmolekula közötti kölcsönhatások kialakulására (73). A specifitás és affinitás meghatározására rendszerint az egyedi szekvenciákat tesztelik, de arra is van lehetőség, hogy a SELEX utolsó ciklusában kapott, feldúsított oligonukleotid elegy

kötőképességét vizsgálják. Az aptamerek igen specifikusak, képesek egy funkció csoport különbséggel, például metil (4, 87) vagy hidroxil (88, 89) csoport alapján megkülönböztetni a célmolekulát. Fehérjék esetében két izoforma közötti, akár egy aminosav különbség is kimutatható a K_d értékében, mivel gyengülnek a komplexben kialakuló kölcsönhatások. A trombin (90), a hepatitis C replikáz (91) és a HIV-1 reverz transzkriptáz (92) pontmutációja például százszoros növekedést okozott a megfelelő aptamer-célmolekula komplexek K_d értékében. A nagyfokú specifikusság, ami nagyobb is lehet, mint az antitesteknél megfigyelt értékek, a SELEX-ben alkalmazott kontraszelektációs lépéseknek köszönhető, amellyel eltávolíthatóak azok a szekvenciák, amelyek a célmolekula analógokhoz kötődnek. Az alábbi táblázat az egyes molekula családokra jellemző célmolekula-aptamer komplex K_d értékeit mutatja be.

2. táblázat: Példák aptamer szelektációra alkalmazott célmolekulákra a disszociációs konstansok (K_d) feltüntetésével.

Célmolekula	Aptamer típusa	K_d	Referencia
Szervetlen anyagok			
Zn ²⁺	RNS	1,2 mmol/L	(93)
Ni ²⁺	RNS	0,8–29 μ mol/L	(94)
Szerves kismolekulák			
Etanolamin	DNS	6–19 nmol/L	(95)
Teofillin	RNS	100 nmol/L	(4)
Ricin toxin	DNS	58–105 nmol/L	(37)
Dopamin	RNS	2,8 μ mol/L	(89)
Nukleotidok és származékaik			
Adenin	RNS	10 μ mol/L	(96)
ATP	RNS	0,7–50 μ mol/L	(88)
cAMP	RNS	10 μ mol/L	(97)
Kofaktorok			
Riboflavin	RNS	1–5 μ mol/L	(98)
FMN	RNS	4 μ mol/L	(99)
Biotin	RNS	5 μ mol/L	(60)
Aminosavak			
L-Arginin	RNS	330 nmol/L	(100)

L-Citrullin	RNS	62–68 µmol/L	(101)
L-Hisztidin	RNS	8–54 µmol/L	(102)
L-Izoleucin	RNS	1–7 mmol/L	(103)
Szénhidrátok			
Cellobióz	DNS	600 nmol/L	(104)
Szialil-laktóz	DNS	4,9 µmol/L	(105)
Antibiotikumok			
Kanamycin B	RNS	180 nmol/L	(106)
Tetraciklin	RNS	1 µmol/L	(107)
Klóramfenikol	RNS	25–65 µmol/L	(108)
Fehérjék és peptidek			
T4 DNS polimeráz	RNS	5–30 nmol/L	(1)
α-Trombin	DNS	200 nmol/L	(74)
α-Trombin	RNS	<1–4 nmol/L	(67)
Immunglobulin E	DNS	23–39 nmol/L	(35)
Interferon-γ	RNS	2,7 nmol/L	(109)
VEGF	RNS	0,1–2 nmol/L	(72)
HIV-1 RT	DNS	180–500 pmol/L	(36)
Prion protein (PrPc)	RNS	0,1–1,7 nmol/L	(77)
Hepatitis C vírus NS3 helikáz	DNS	140 nmol/L	(110)
Protein kináz C delta	DNS	122 nmol/L	(111)
Tumor marker MUC1	DNS	0,1–34 nmol/L	(112)
Sztreptavidin	DNS	57–85 nmol/L	(30)
Intakt sejtek			
Élő Afrikai Tripanoszóma	RNS	60 nmol/L	(113)
Leukémia sejtek CCRF- CEM	DNS	0,8–229 nmol/L	(114)

4.6. Random oligonukleotid könyvtár

A szelekcióhoz felhasznált kiindulási random oligonukleotid könyvtárat kémiai szintézissel állítják elő, amely akár 10^{15} -féle egyszálú DNS szekvenciát is tartalmazhat. Felépítését tekintve alapesetben egy 20-80 nukleotid hosszúságú random szakaszt fog

közre két, 18-21 nukleotid hosszúságú primer kötő régió, amelyek segítségével elvégezhetőek az amplifikációs lépések. Előfordul, hogy az első SELEX ciklust megelőzően, PCR-rel amplifikálják a könyvtárat, hogy megszabaduljanak a kémiai szintézis során kialakult nem amplifikálható szekvenciáktól (42). Nagyszámú különböző aptamer vizsgálata alapján az RNS és egyszálú DNS aptamerek affinitás és specifikusság szempontjából nem különböznek (115).

Fontos szempont az oligonukleotid könyvtárak tervezésénél a random szakasz hossza és a nukleotidok esetleges kémiai módosítása. Leggyakrabban 20-80 nukleotid hosszúságú random részt tartalmazó oligonukleotid könyvtárakkal dolgoznak. Az aptamereket a szelekciót követően sokszor lerövidítik, hogy a minimális hosszúságú működőképes szekvenciához jussanak. Ezt az eljárást követték a trombin aptamer esetében is, ahol a 60 nukleotid hosszúságú random részt tartalmazó, 96 nukleotid hosszúságú DNS aptamert lerövidítették egy 15 nukleotid hosszúságú funkcionális szakaszra (74). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a rövidebb random részt tartalmazó könyvtárak is alkalmasak lehetnek aptamer szelekcióra. A rövid könyvtárak előnye, hogy könnyebben kezelhetőek, kisebb az előállítási költségük és a rövidebb aptamerek a későbbi alkalmazások szempontjából is ideálisabbak lehetnek. Ennek ellenére nem terjedt el a rövid könyvtárak alkalmazása, mivel a hosszabb random rész nagyobb komplexitást ad a könyvtáraknak (42), többféle szerkezet kialakulását teszi lehetővé (116), és a lehetséges kölcsönhatás mértéke is nő az oligonukleotid és a célmolekula között, ami hozzájárulhat a nagy affinitású aptamerek szelekciójához (117). A kémiai szintézissel előállított könyvtáraknál ráadásul számolnunk kell azzal a tényezővel is, hogy a randomizáció nem tökéletes. A kémiai szintézis és később a PCR során a reakciókörülmények bizonyos szekvenciák kialakulásának jobban kedveznek, ezek gyakrabban előfordulhatnak, így az előállított könyvtár tényleges variabilitása kisebb lesz, mint a névleges érték. Mindezek miatt a gyakorlatban érdemes hosszabb random részt tartalmazó könyvtárból kiindulni.

A könyvtárat szerkezet alapján megtervezhetik úgy is, hogy a random nukleotidok mellett bázispárosodáson keresztül, másodlagos szerkezet kialakítására képes nukleotidokat is tartalmaznak a szekvenciák. Ez a módszer elősegíti a nagy affinitású aptamerek szelekcióját és növeli az aptamer stabilitását. (1, 91, 118, 119). GTP kötő aptamerek szelekciójára létrehozott RNS könyvtár random szekvenciájába

egy fix hajtú elemet is beépítettek, mert ez az aptamerekben gyakran előforduló szerkezet valószínűsíthetően alap vázat biztosít a kötést kialakító hurkoknak (100, 120). Bizonyos esetekben a részlegesen rendezett könyvtárral végzett szelekció eredményeként nagyobb affinitással rendelkező aptamerek szelektálhatóak, mint a teljesen random könyvtár alkalmazásával (121).

Az oligonukleotid könyvtárakban a primer kötő szakaszra elsősorban a PCR során van szükség, azonban a szelektált aptamer célmolekula-kötéséhez szükséges szerkezet kialakulásában is részt vehet. A Tailored SELEX technikával biztosítható, hogy a célmolekula kötésében döntő módon a random szekvencia részlet vegyen részt. A szelekció során csak egy rövid, 4-6 nukleotidos, primer kötő szakaszt tartalmaz a könyvtár, amit az amplifikációs lépés előtt meghosszabítanak, a következő szelekciós lépést megelőzően pedig ismét eltávolítanak (63, 122).

A természetesen előforduló nukleinsavak mellett kémiaiailag módosított oligonukleotid könyvtárakat is alkalmazhatnak SELEX-ben. Ezáltal megnövelhető a könyvtár komplexitása, és új funkciós csoportokkal ruházható fel, amelyek több lehetőséget adnak a célmolekulával történő kölcsönhatásra, vagy megnövelik a nukleázokkal szembeni rezisztenciát (12, 117, 123). A speciális oligonukleotid könyvtárak létrehozásához sokféle kémiaiailag módosított nukleotid áll a kutatók rendelkezésére, de fontos szempont, hogy a SELEX folyamán alkalmazott enzimekkel kompatibilisnek kell lenniük, mivel a polimerázok nem képesek minden típusú módosított nukleotidot beépíteni. A szóba jöhető módosításokat a következő fejezetben tárgyalom.

4.7. Aptamerek stabilitása és módosítási lehetőségei

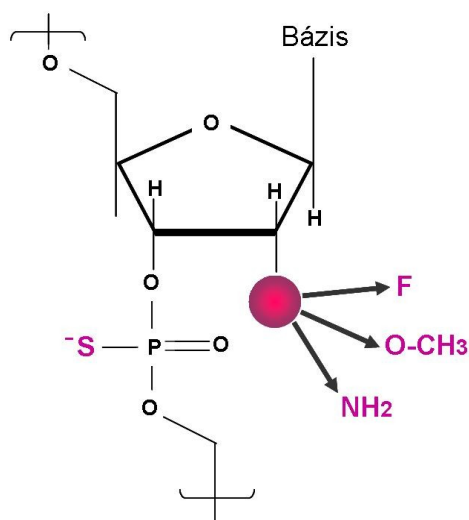
A nukleinsavak, elsősorban az RNS alkalmazásának egyik legfőbb problémája, hogy nukleázok hatására degradálódnak. A ribonukleotidok 2' pozícióban található hidroxil-csoportja reaktív, és semlegesnél nagyobb pH-n a szomszédos foszfodiészter kötés megbontásával megszakítja az oligonukleotid cukor-foszfát láncát, minek eredményeként ciklikus 2'3' foszfát vegyületet jön létre. A reakciót a magas hőmérséklet, átmeneti fémek ionjai, hidroxid ion és a biológia mintákban gyakran jelen lévő ribonukleázok katalizálják, így az oligonukleotidok oldatban percek alatt

degradálódhatnak (124). Számos megoldás létezik a probléma kiküszöbölésére, amelyek közül a leghatékonyabbak a cukor-foszfát lánc kémiai módosítása és a spiegelmerekeknek nevezett aptamerek alkalmazása.

A cukor-foszfát láncot leggyakrabban a ribonukleotidok 2' pozíciójában, kémiaiailag módosítják, és gyakran alkalmazzák még az úgynevezett tioaptamereket is (2. ábra). A dNTP α helyzetű tiol szubsztitúciójával létrehozható egy olyan oligonukleotid könyvtár, amelyben foszforotioát kötések kapcsolják össze a nukleotidokat (125), ezek az aptamerek tioaptamer néven ismertek. A tioaptamerek ellenállóbbak a nukleázokkal szemben, gyakran nagyobb affinitással kötődnek a fehérje típusú célmolekulákhoz, valamint a hagyományos aptamereknél kedvezőbbek a farmakokinetikai tulajdonságaik is, és mindezek mellett kémiai szintézissel nagy mennyiségben előállíthatóak (126, 127). A HIV-1 RT RN-áz H doménjére szelektáltak olyan DNS tioaptamereket, melyekben a dATP-t helyettesítették módosított nukleotiddal. Ez a legelterjedtebben alkalmazott tio-nukleotid a PCR során kialakuló termékben a dezoxi-adenintől 5' irányban tiol szubsztitúciót eredményez (128). Tioaptamer ismert az NF-IL6 transzkripciós faktorra (127), és ezekhez hasonló módon már létrehoztak tio-RNS aptamert is (126). Tio-RNS létrehozható in vitro transzkripcióval, ha a négyféle bázisból egyet helyettesítenek tiol szubsztituált ribonukleotiddal, azonban a transzkripció hatásfoka romlik. A transzkripció mind a négyféle lehetséges módosítással működik és hatásfoka az uridin analóggal (PS-UTP) történő helyettesítéssel a legmagasabb. Hasonlóképpen az in vitro transzkripcióhoz a módosított nukleotidokat tartalmazó RNS könyvtár reverz transzkripciójának hatásfoka is alacsonyabb. Tanulmányozták a módosított nukleotidok beépülésének hatékonyságát a PCR során, amelyben templátként foszfodiészter kötések tartalmazó DNS-t alkalmaztak. Az eredmények alapján a PCR reakció nem megy végbe, ha mind a négy nukleotid módosított, három módosított nukleotiddal már amplifikálható a DNS, de ebben az esetben is kevesebb termék keletkezik, mint a PO-dNTP nukleotidokkal (125).

A módosított nukleotidokat tartalmazó, random oligonukleotid könyvtárakból kiinduló aptamer szelekció legfőbb korlátozó tényezője, hogy a DNS/RNS polimerázok által beépíthető módosított nukleotidok száma limitált. A nukleáz rezisztencia növelésére leggyakrabban az RNS 2' amino-, és 2' fluoro-pirimidin módosításait alkalmazzák, amelynek hatékonyságát in vitro szérum és plazma tesztek is bizonyítják

(2. ábra) (129). Ezek a nukleotidok a reverz transzkripció során megfelelő templátok, és az in vitro transzkripció során a T7 RNS polimeráz is képes beépíteni ezeket. A fluoro-módosított aptamerek nagyobb affinitással kötődnek a célmolekulához, és termodinamikailag stabilabb másodlagos szerkezetet alakítanak ki, mint az aminoszubsztituáltak (130). Ilyen típusú módosításokat tartalmazó oligonukleotid könyvtárakkal már számos esetben végeztek sikeres aptamer szelekciót (109). 2'-amino-csoporttal módosított könyvtárral olyan nagy affinitású aptamereket szelektáltak a humán tumor nekrozis faktor α -ra (hTNF α), amelyek gátolják a faktor a kötődését a hTNF α receptorhoz (131). A felsoroltakon túl sikeresen alkalmaztak aptamer szelekcióra 2' O-metil szubsztituált ribózt és C5 helyzetben módosított pirimidint tartalmazó RNS könyvtárakat is (132).



2. ábra: Az oligonukleotidok lehetséges módosításai a nukleáz rezisztencia növelésére. A ribóz 2' módosításával RNS molekulákban és a nukleotidokat összekötő foszforotioát kötésekkel RNS vagy DNS molekulában megnövelhető a nukleáz rezisztencia.

A nukleáz rezisztencia növelése érdekében létrehozott spiegelmerekeknek nevezett aptamerek a természetben előforduló D-enantiomerek helyett L 2' ribózt, vagy L-2' dezoxi-ribózt tartalmaznak. Mivel a nukleázok sztereoselektívek, ezek a molekulák több nagyságrenddel ellenállóbbak a nukleázokkal szemben, mint a természetben előforduló nukleinsavak, így biológiai mintákban jelentősen lassabban degradálódnak (133, 134). A szelekció a célmolekula szintetikus előállított enantiomerjével és D

konfigurációjú oligonukleotidokkal történik, és az így nyert aptamert L konfigurációjú nukleotidokkal szintetizálva, tükörképi, tehát a természetben előforduló célmolekulára specifikus aptamer nyerhető. A spiegelmerok stabilak és nagy affinitással kötődnek a célmolekulához, éppen ezért számos esetben alkalmazták ezt a metodikát, így például ismertek adenzinra (134), vazopresszinre (135) és az argininre (134) specifikus spiegelmerok. A módszer hátrányai, hogy a célmolekula enantiomerjét szintetikusán kell előállítani, így csak viszonylag kisméretű fehérje domének vagy peptidok alkalmazhatóak a szelekcióban, illetve csak olyan célmolekulákra alkalmazható a technika, amelyek optikailag aktívak.

A pirimidin tartalmú nukleotidok C-5, és a purin tartalmúak C-7, vagy C-8-as pozíciójába bevezetett módosításokkal új tulajdonságokkal lehet gazdagítani az oligonukleotid könyvtárat (123). 5-bromouracil és 5-jodouracil beépítésével olyan aptamerok állíthatók elő, amelyek fény hatására keresztkötéseket alakítanak ki. A célmolekula megkötése után UV fényrel aktiválva a kovalens kötések elsősorban az aromás és kéntartalmú aminosavak és a módosított bázisok között alakulnak ki (136). Ezeket a módosításokat is elfogadják a polimerázok, így *in vitro* amplifikálhatók (137).

A KOD Dash DNS polimeráz enzim a PCR során számos derivatizált timidin analógot képes beépíteni és olyan módosított oligonukleotid könyvtárat kialakítani, ami alkalmas *in vitro* szelekcióra is. A timidin helyettesítésére C-5 pozícióban különböző aminosavakkal módosítottak uracilt, és vizsgálták a beépülését a KOD Dash DNS polimerázzal végzett PCR-ben. Megvizsgálták, hogy melyek azok az összekötő szakaszok a bázis és az aminosav között, amelyek a PCR határfokát javítják, és a vizsgált szerkezetek közül a 2-(6-aminohexilamino)-2-oxoetil összekötőt találták a legalkalmasabbnak. Ha negatív töltésű célmolekulákra szelektálnak aptamereket, a pozitív töltésű guanidil (arginin módosítás), vagy amino csoportokkal (lizin módosítás) derivatizált DNS könyvtárak elősegíthetik a nagy affinitású aptamerok szelekcióját (138-140). Ilyen típusú szelekcióra példaként említhető a hexametilén összekötő szakasszal és a végén kationos ammónium csoporttal módosított timidint tartalmazó DNS könyvtár alkalmazása szialillaktóz-specifikus aptamer szelekciójára (105). Ugyanezzel a technikával arginin-módosított könyvtárat is létrehozta, és enantioszelektív glutaminsav-specifikus aptamerok szelekciójára alkalmazták (141).

A szelekció során az oligonukleotidok kvantifikálhatóak, és nyomon követhető a célmolekula-specifikus szekvenciák felszaporodása radioaktívan jelzett nukleotidok beépítésével vagy fluoreszcensen jelzett molekulák kapcsolásával az oligonukleotid 5' végére. A szelekciós lépések között a kötőképesség szerint feldúsított aptamerek számának növekedése áramlásos citometriával is mérhető úgy, hogy az oligonukleotidokat fluoreszcens jelölőmolekulával például fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) módosítják, a célsejtekkel inkubálják, majd mérik a sejtek fluoreszcencia intenzitását. A módszert elsősorban sejtfelszíni molekulákra, sejtekre specifikus aptamerek esetében lehet alkalmazni. Az YPEN-1 patkány endotél sejtekre szelektált aptamerek feldúsulását figyelték meg ezzel a technikával, és az egymást követő ciklusokban egyre nagyobb fluoreszcencia értékeket mértek (81).

Az aptamerek 3' végének módosításával az exonukleázok okozta degradáció nagyrészt megakadályozható, ilyen például 3' végre kapcsolt biotin vagy a 3'-3' kötést létre hozó inverz timidin. A 3' vég védelme kiemelten fontos in vivo alkalmazásokban és szérumminták vizsgálatában, mivel a leggyakrabban 3' exonukleáz aktivitás következtében bomlanak le az oligonukleotidok ezekben az esetekben. Az aptamerek 5' vége is módosítható, amin, foszfát, polietilén-glikol, koleszterin, zsírsavak, fehérjék kapcsolhatók hozzá, amelyek sapkát képezve megvédik a nukleinsavakat a degradációtól, illetve megnövelik azok méretét (142, 143).

A szelekció eredményeként nyert szekvenciák az úgynevezett Post-SELEX kémiai módosításokkal is átalakíthatóak, ám ekkor figyelembe kell venni, hogy ezek az eredeti aptamer kötőképességének változását eredményezhetik. A kötés kialakításában részt vevő nukleotidok feltérképezése és olyan kémiai módosítások bevezetése, amelyek nem befolyásolják hátrányosan a célmolekula-kötőképességet, viszont növelik az aptamer stabilitását időigényessé teszik a folyamatot, és nagyban korlátozzák a módszer rutinszerű alkalmazását (15). Az aptamereket a post-SELEX módosítások után is újraszelektálhatják, hogy biztosítsák a kötődést a célmolekulához. Például a Rous sarcoma vírusra szelektált RNS aptamert a pirimidin 2' pozíciójában fluorid csoporttal módosították, hogy megnöveljék a stabilitását nukleázokkal szemben, ám ennek hatására elveszítette affinitását a célmolekulához. Ekkor új szelekcióval a már módosított aptamereket tartalmazó könyvtárral szelektáltak olyan szekvenciákat, amelyek már kötődtek a vírushoz, és az eredeti módosítatlan aptamerhez hasonlóan

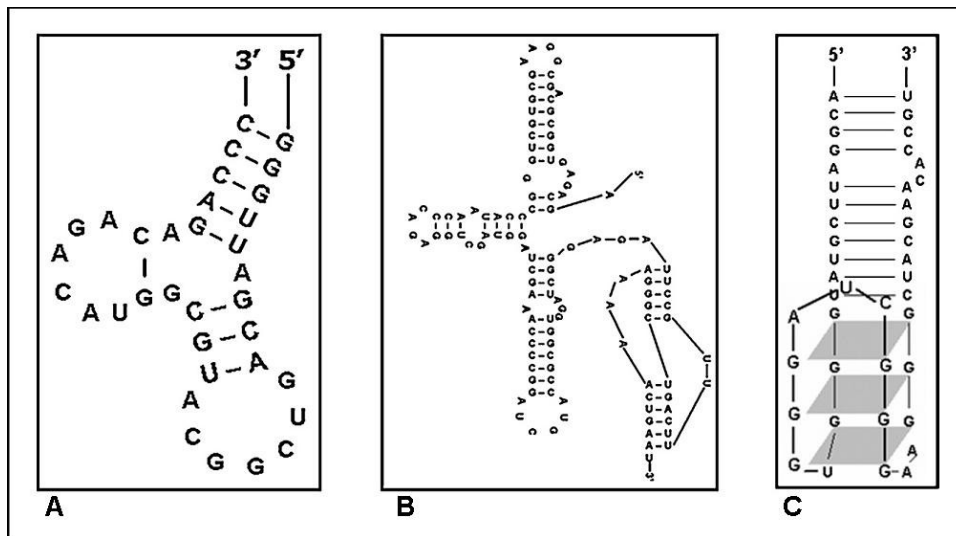
gátolták a vírus replikációját is (144). A szelekciót követő, Post-SELEX módosítások arra is szolgálhatnak, hogy előkészítsék az oligonukleotidokat különböző alkalmazásokhoz, így immobilizációhoz lehet biotin vagy amino-csoporttal módosítani, illetve detektáláshoz fluoreszcens csoporttal jelölni az aptamereket. Ezek a kémiai módosítások nagyon változatosak lehetnek, hasonlóan a kiindulási oligonukleotid könyvtáraknál leírtakhoz.

4.8. Aptamerek térszerkezete

Az aptamer-célmolekula kötődést a szerkezet pontos illeszkedése, hidrogén hidak kialakulása és további kölcsönhatások (aromás gyűrűk közötti, elektrosztatikus, és van der Waals), illetve ezek kombinációja segíti elő (145, 146). Az aptamerek többsége a célmolekula kötésekor adaptív konformáció változással nyeri el stabil másodlagos szerkezetét, szabad állapotban pedig rendezetlen szerkezetű. Kis molekulákkal történő kölcsönhatások esetében a meghatározott térbeli szerkezetbe hajtogatódás egy zsebszerű kötőhelyet alakít ki, ily módon az aptamer a célmolekulát teljesen beboríthatja. Ezzel szemben a nagyobb molekulákon, mint például a fehérjéken, az aptamer illeszkedik a célmolekulához. Az ilyen típusú kölcsönhatások hátterében gyakran a bázikus aminosavak oldalláncaival (Lys, Arg) képzett intermolekuláris hidrogénhid-kötések állnak (147-149). Egyes nukleotidok közvetlenül a célmolekulához kötődnek, míg más nukleotidok a kötő nukleotidok pontos térbeli elhelyezkedésében játszanak fontos szerepet (145, 146, 150, 151).

Általában egy-két szerkezeti elemmel rendelkezik egy adott aptamer, amelyek leggyakrabban hajtű, pszeudo-csomó vagy négyszálú struktúrák, úgynevezett quadruplexek lehetnek (3. ábra). A hajtű struktúra a legelterjedtebb, amely egy vagy több egyszálú hurokból és az ezeket összekötő kettőszálú szár részből áll. A pszeudo-csomó egy hajtű szerkezet hurok része és a hajtűtől jobbra és balra elhelyezkedő szekvenciák közötti komplementaritás révén alakul ki főleg RNS-ben, de előfordul DNS-ben is. A nagy guanozin tartalmú szekvenciákra jellemző négyszálú struktúrákban, az ún. quadruplexekben négy guanin egy G-kvartettet alkot, amelyben egy guanin másik két szomszédos guaninnal hidrogén-híd kötésekkel képez a Hoogsteen féle bázispárosodás alapján (4. ábra). Egy quadruplexben általában két vagy három G-

kvartett fordul elő, és a szerkezetet koordinatívan kötött kálium- vagy nátriumion tovább stabilizálhatja a guaninok karbonil csoportjainak a kvartett középpontja felé koordinálásával (152, 153). A főleg DNS aptamerekben előforduló quadruplex struktúra sokkal stabilabb az egyszerűbb szerkezeti elemeknél. Valószínűsítik, hogy a G-quadruplex az aptamer stabil szerkezeti alapját szolgáltatja és az összekötő hurkokban található nukleotidok felelősek a célmolekula kötéséért (154-156).

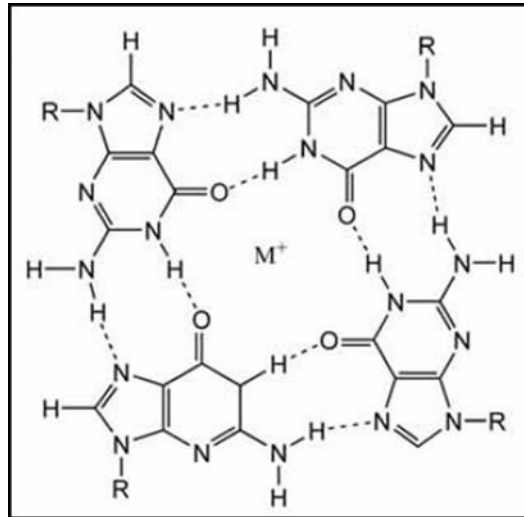


3. ábra: Aptamerek leggyakoribb másodlagos szerkezetei. Hajtű (A), pszeudocsomó (B), G-quadruplex (C) (157).

Az interneten elérhető mfold program alkalmazásával az aptamer szekvenciák másodlagos szerkezetéről kaphatunk információt (158). Ez a program több változó figyelembe vételével (ionerősség, hőmérséklet stb.), az energiaminimalizálás elve alapján kiszámítja az egyszálú oligonukleotidok lehetséges konfigurációit és grafikusán is megjeleníti a szerkezeti elemeket. Az aptamerekben előforduló G-quadruplexek számát és szekvencián belüli elhelyezkedését a QGRS Mapper program alkalmazásával lehet valószínűsíteni (159). A számítógépes predikció hátránya azonban, hogy az aptamer nem tanulmányozható a célmolekulával kialakult komplexben, pedig legtöbbször illeszkedéssel, a kötés kialakulása közben alakul ki a tényleges szerkezetük.

Az aptamer-célmolekula valós szerkezete jelenleg csak kísérletesen határozható meg. A szekvencia fokozatos rövidítésével azonosítható az aptameren belül az a legrövidebb tartomány, ami felelős a kötőképességért. A nukleotidok cseréjével pedig

az egyes bázisok célmolekula kötésében betöltött szerepéről nyerhető információ. Az aptamer szerkezet leírására és a kölcsönhatás mikéntjének azonosítására a röntgen kristallográfia és az NMR spektroszkópia a legmegfelelőbb eljárások, azonban a magas költség miatt csak néhány aptamerrel végeztek ilyen irányú vizsgálatokat (160-163).



4. ábra: Négy guanin elrendeződése G-kvartett szerkezetben. A kvartett szerkezetben az ún. Hoogsteen kötésen keresztül kapcsolódnak a nukleotidok. A szerkezet a koordinatívan kötött M^+ ion tovább stabilizálja.

4.9. Aptamerek terápiás célú felhasználása

Az aptamerek, mint terápiás szerek gyakran a kismolekulájú hatóanyagok és antitestek versenytársaiként jelennek meg. In vivo alkalmazásuk az antitestekkel ellentétben nem generál immunválaszt, és farmakokinetikai tulajdonságaik is könnyebben változtathatóak. Mindemellett azonban az aptamerek tulajdonságai karakteresen eltérnek az antitestekétől és a gyógyszermolekulákétól, így számos kutatás irányul terápiás alkalmazhatóságuk vizsgálatára. (21, 164).

Az aptamerek gyógyszerként történő alkalmazása során több sajátosság nehézséggel kell szembe nézni. Egyrészt nagyobbak a hagyományos, nem fehérje típusú hatóanyagoknál, és nehezen jutnak át a biológiai határfelületeken, mint például a sejtmembránon vagy a véragy-gáton. Másrészt a legtöbb terápiás célmolekula a

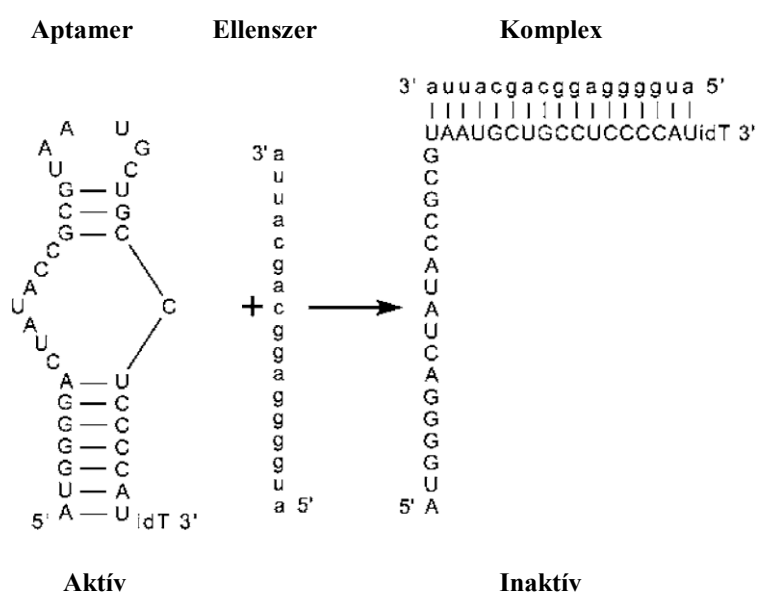
vérplazmán keresztül érhető el, ezért az aptamereket a vérbe kell juttatni, ahol azonban könnyen degradálódhatnak a szérum nukleázok hatására (165). Végül, az aptamerek keringésben jelen lévő koncentrációját tovább csökkenti az is, hogy egyes szervek, mint a máj vagy a lép felvehetik őket, illetve a vesén keresztül kifiltrálódhatnak, mivel 5-15 kDa körüli molekulatömegük alatta marad a vese glomerulusok 30-50 kDa-os filtrációs határának. Az aptamerek sejtekbe juttatására nincs elfogadott eljárás, a klinikai vizsgálati fázisban lévő aptamerek extracelluláris vagy sejtfelszíni fehérjékre szelektívek. A nukleáz rezisztencia növelésének lehetőségeit egy korábbi fejezetben tárgyaltam, így a továbbiakban csak az aptamerek méretnövelésére irányuló eljárásokat mutatom be.

Az aptamerek filtrációs rátája szignifikánsan csökkenthető, és ezen keresztül a keringésben töltött idejük növelhető megfelelő méretű hordozó molekulára történő kapcsolásukkal. A leggyakoribb ilyen célra alkalmazott polimer a nagy molekulatömegű polietilén-glikol (PEG) (166-168). Egérkísérletekben figyelték meg, hogy a konjugátlan aptamerek felezési ideje a keringésben 5-10 perc, ami a 40 kDa-os PEG molekulával történő kapcsolással egy napra növelhető (132). A vesén keresztüli gyors kiürülés megakadályozására az aptamereket koleszterinnel is konjugálhatják, de ez a módszer kevésbé hatékony, mint a PEG konjugáció (169). Koleszterin konjugációra példa a IXa faktorra specifikus aptamer, ami sertésekben végzett kísérletekben megnövelte az aptamer felezési idejét 5-10 percről, 1-1,5 órára (170).

A terápiás alkalmazásokat megelőző kísérletek során további problémákat vethet fel, hogy az aptamerek igen specifikusak a szelekciójuk során alkalmazott célmolekulára, így a preklinikai vizsgálatoknál a humán célmolekulákra szelektált aptamerek nem tanulmányozhatók állatkísérletekkel. A probléma megoldására fejlesztették ki az ún. Toggle SELEX technikát, amelyben a szelekció során váltakozva alkalmazzák a humán célmolekulát, illetve annak modell állati megfelelőjét, így olyan aptamerek nyerhetők, amelyek mindkét fajban felismerik a célmolekulákat és alkalmasak a preklinikai vizsgálatok elvégzésére is (67).

Az aptamerek in vivo alkalmazását megelőzően fontos megállapítani a lehetséges toxikus mellékhatásokat is. Az oligonukleotidokra specifikus antitestek kialakulását nem figyelték meg, de egyes módosításokra, mint a PEG-konjugáció már előfordulhat immunreakció (171). Megfigyelték továbbá, hogy az oligonukleotidok

felhalmozódhatnak a sejtekben, általában fagocitákban (pl. makrofágokban) és a vese proximális tubulusainak epitél sejtjeiben, ahol bazofil granulomokat képeznek, de a sejteken vagy szöveteken csak nagyon nagy koncentrációk esetében figyeltek meg degeneratív elváltozásokat (172). Megvizsgálták, hogy milyen magas lehet az az aptamer mennyiség, ami még nem vált ki mellékhatásokat a szervezetbe juttatva. A mért értékek 25-100 mg/kg/nap körül ingadoztak, ami jóval magasabb, mint a terápiás célra a szervezetbe juttatott mennyiség (173).



5. ábra: Aptamer-ellenszer kölcsönhatás sémája. Az aptamerrel komplementer ellenszer kötődése révén megakadályozza az aptamer térbeli szerkezetének kialakulását így működését is gátolja.

Hatásmechanizmus alapján a legtöbb terápiás célú aptamer antagonistá és leggyakrabban fehérje-fehérje, azon belül pedig receptor-ligand kölcsönhatást gátol. Ismertek azonban agonista hatású aptamerek is. A humán epidermális növekedési faktor receptor 3 (ERBB3) extracelluláris doménjére szelektált aptamer a receptorok oligomerizációját segíti elő (174), az izoleucil tRNS szintetázra specifikus megnöveli az enzim vágó aktivitását (175), míg a SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) helikázra szelektív aptamer stimulálja az enzim ATP-áz aktivitását (176).

Terápiás célból számos fehérjére, sejtre és kórokozóra szelektáltak aptamereket. Az álomkórt okozó tripanoszóma egy parazita, amely fertőzés esetén főleg az idegrendszert és a szívet károsítja. Az eddig ismert kezelések nem túl hatásosak, ezért új aptamer alapú szer fejlesztésébe kezdtek. Az élő *Trypanosoma cruzi*-ra szelektált 2'-amino-módosított RNS aptamer ($K_d=172$ nM) 1 μ M-os koncentrációban alkalmazva 50-70%-ban csökkentette a parazita terjedését sejtkultúrában (82).

Terápiás céllal leggyakrabban fehérje típusú célmolekulára szelektálnak aptamereket, ezen belül is többet a véralvadási kaskád elemeire, így a trombinra, a VIIa és a IXa faktorra. A trombinra specifikus egyszálú DNS aptamer a kísérletek szerint az alvadási időt 25-ről 43 sec-ra növelte humán plazmában, és hatékonyságát állatkísérletek is alátámasztják (74). Az adagolás megszüntetésével járó gyors koncentráció esés egyes terápiás szerek esetében előnyös is lehet. A NU172 elnevezésű, 26 nukleotidból álló, trombinra specifikus DNS aptamer nem tartalmaz módosított nukleotidokat, védősapkát vagy konjugált hordozó molekulát, így vérben gyorsan eliminálódik. Az ARCA Biopharma cég fázis II klinikai vizsgálatokat folytat az aptamerrel, céljuk egy olyan antikoaguláns szer létrehozása, ami a különböző műtéti eljárások során infúzióban folyamatosan adagolható, és az adagolás megszüntével gyorsan visszaáll az eredeti állapot (177). A VIIa véralvadási faktorra 2'-amino-módosított RNS aptamert szelektáltak, ami hatékonyan gátolta az enzim aktivitását, és 175%-kal megnövelte az alvadási időt (178). A 9.3t elnevezésű RNS aptamert a IXa faktorra szelektálták. Alkalmazásával megakadályozták a X-Xa átalakulást, és a IX faktor deficiens plazma alvadási idejével megegyező értékeket mértek. Fontos, hogy a véralvadást gátló hatást meg is lehessen szüntetni szükség esetén, így az aptamer gátló hatásának semlegesítésre oligonukleotid ellenszert is kifejlesztettek, amivel 10 percen belül felfüggesztették a 9.3t hatását (5. ábra) (178). Jelenleg is zajlanak a fázis II klinikai vizsgálatok a REG1 antikoaguláns rendszerrel, amely tartalmazza a IXa faktorra specifikus nukleáz rezisztens, trunkált és PEG-gel konjugált aptamert (RB006) és annak oligonukleotid ellenszerét (RB007) (179). Az ugyancsak fázis II vizsgálat alatt álló, von Willebrand faktorra specifikus ARC1779 aptamer megakadályozza, hogy a faktor a vérlemezkékhez kötődjön, így antitrombotikus hatást fejt ki (180).

A fertőző szivacsos agyvelőgyulladás embereket és állatokat is megbetegíthet, és felelős a kuru, a Creutzfeldt-Jakob kór és a kerge marha kór kialakulásáért is. A kiváltó

ok a celluláris prion fehérje (PrPc) átalakulása a kóros scrapie formává (PrPsc). A PrPc-re szelektált aptamer képes megakadályozni ezt az átalakulást. A hatást prion-fertőzött neuroblasztóma sejttenyészetben vizsgálták, és azt találták, hogy 16 órás kezelés hatására 53%-kal csökkent a PrPsc kialakulás (181).

Az angiogenezis gátlásának céljából is többféle célmolekulára szelektáltak aptamereket, így az angiopoietin-2-re olyan RNS aptamert, ami sejt kultúrában és patkányokon végzett kísérletekben is több, mint 40%-kal csökkentette az új erek képződését (182). Az első terápiás célra elfogadott aptamer is angiogenezis gátló hatású, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorra (VEGF-re) szelektált oligonukleotid. A sok lépésen keresztül kifejlesztett aptamer alapú gyógyszer idős kori makula degeneráció kezelésére alkalmazható. A retina kóros neovaszkularizációja VEGF hatására alakul ki, ezért ezt választották célmolekulának a terápiás RNS aptamerek szelekciójához. A NeXagen cég kutatói olyan RNS aptamereket szelektáltak, amelyek nagy affinitással kötődtek az extracelluláris VEGF-hez (72) és megakadályozták, hogy a növekedési faktor kölcsönhatásba lépjen a vaszkuláris endoteliális sejtréteg felszínén található receptorával. Az eredeti aptamer nukleáz rezisztenciájának növeléséhez, kihasználva a T7 polimeráz módosított nukleotid felismerő képességét, 2' dezoxi és 2' aminopirimidin nukleotidokat alkalmaztak a következő szelekció során (183). Az újabb aptamerek már megfelelő affinitással és megnövekedett nukleáz rezisztenciával rendelkeztek. A további átalakítások során a purin ribonukleotidokat 2' dezoxi és 2' O-metilnukleotidokkal helyettesítették, és az aptamer végein kialakított foszforotioát kötésekkel az exonukleázokkal szemben is megvédték az aptamereket (71). Az így előállított aptamer azonban nem kerülhetett kereskedelmi forgalomba, mivel az előállítás költségeit megnövelte, hogy az oligonukleotid szintézis során védőcsoporttal kellett ellátni a reaktív amino-csoportokat. Végül egy harmadik in vitro szelekciós folyamat során 2' dezoxi és 2' fluoropirimidin módosított nukleotidokat alkalmaztak a stabilitás növelése érdekében, amelyek már nem olyan reaktívak, hogy védőcsoportra lenne szükség a szintézis során (59). A kémiai szintézissel előállított, terápiás célra szánt aptamert lerövidítették a minimális 28 nukleotidból álló funkcionális szakaszra, kettő kivételével 2' O-metil-csoportokkal látták el a purin ribonukleotidokat, egy invert dezoxi-timidinnel védték a 3' véget, és még egy 40 kDa tömegű polietilén-glikol csoportot kapcsoltak az 5' véghez, hogy megakadályozzák az aptamer gyors kiürülését.

Az így nyert módosított aptamerről kísérletekkel bizonyították, hogy gátolja a VEGF kötődését annak receptorához (59). Az első klinikai vizsgálatba több mint ezer páciens vontak be, amelyben a Pegaptanibnek keresztelt aptamert intraokuláris injekció formájában alkalmazták, hathetes időintervallumokban. Az eredmények szerint a készítmény a legalacsonyabb alkalmazott dózisban is hatásosnak bizonyult (0,3 mg) és nem okozott mellékhatásokat (184-186), emellett előnyös tulajdonsága, hogy a szemben hosszú a felezési ideje. A terméket a Pfizer cég gyártja, Macugen terméknéven és hivatalosan 2004 decemberében fogadták el az USA-ban (187).

A gyulladással járó megbetegedések terápiás célpontjaira is szelektáltak aptamereket, például a humán neutrofil elasztázra (188), szelektinekre (189), NF κ B-re (190) és a humán komplement rendszer C5 komponensére (21, 191). Az ARC1905 elnevezésű módosított aptamer a komplement rendszer C5 komponenséhez kötődik, ami szerepet játszik a makula degeneráció kialakulásában. Az aptamerből olyan szert állítanak elő, amely az anti-VEGF antitesttel, a ranibizumabbal együtt adható intravitreális injekció formájában. A szerrel fázis I klinikai vizsgálatok zajlanak.

Antiproliferatív hatású aptamereket különböző tumoros megbetegedésekre jellemző célmolekulákra szelektáltak, mint az E2F transzkripció faktorra (192), a prosztata specifikus membrán antigén extracelluláris régiójára (32) és a tenascin-C mátrix glikoproteinre (193). Az AS1411 nukleolin specifikus aptamer antiproliferatív hatását többféle rákos sejtvonalon is megfigyelték. Az aptamerrel végzett fázis I kilinikai vizsgálatba tizenkét páciens vontak be, akik vese karcinómában szenvedtek (194). Két páciens reagált a kezelésre, itt megfigyelhető volt a tumor zsugorodása, és hét további páciens állapota stabilizálódott minimum két hónapon keresztül. Emellett semmilyen súlyos mellékhatást nem tapasztaltak a kezelés során. Ráadásul az AS1411 elpusztította az akut mieloid leukémiában szenvedő betegekből származó rákos sejteket is, amiből arra lehet következtetni, hogy ez a típusú tumor is kezelhető a szerrel. 2007-ben el is indult a második vizsgálati fázis, amelyben ebben a típusú leukémiában szenvedő pácienseket kezelnek.

Az immunrendszer elemeire specifikus aptamerekkel az allergia és olyan autoimmun betegségek, mint az inzulin rezisztencia és a myasthenia gravis is kezelhetőek lennének. Az inzulin receptor ellen termelt autoantitestre szelektált RNS aptamer gátolta az antitest-receptor kötődést, így 80%-ban megakadályozta az

autoantitestek által kiváltott inzulin receptor gátlást (195). A myasthenia gravis-ban szenvedő betegek az acetil-kolin receptorra specifikus autoantitesteket termelnek. A betegség tünetei a súlyos fáradékonyság és izomgyengeség. A betegség kezelésére olyan nukleáz rezisztens RNS aptamert szelektáltak, amelynek a célmolekulája az acetil-kolin receptorra specifikus monoklonális antitest. A kísérletek alapján az aptamer 5 μ M-os koncentrációban, TE671 sejteken mind a monoklonális, mind az autoantitestek acetil-kolin receptorhoz történő kötődését megakadályozta, és 70%-kal csökkentette az antitest receptor gátló hatását (196, 197).

Az extracelluláris, és sejtfelszíni célmolekulák mellett elméletileg intracelluláris molekulák is lehetnek az aptamerek célpontjai, amennyiben az aptamerek sejtbe kerülése megoldott. Leggyakrabban liposzóma vezikulumok segítségével juttatják az aptamereket sejten belülre (198), de aptamert kódoló vektorral is transzfektálhatják a sejteket (199, 200). Mindemellett bizonyos megfigyelések arra utalnak, hogy az aptamerek transzfekciós reagens nélkül is internalizálódhatnak (22, 201). Az alábbi táblázat a jelenleg klinikai fázisban lévő aptamereket összegzi (3. táblázat).

3. táblázat: Aptamer hatóanyagú terápiás szerek a klinikumban. (165)

Elnevezés (Gyártó)	Összetétel	Célmolekula	Indikáció	Jelenlegi vizsgálati fázis	Referencia
Pegaptanib nátrium/Macugen (Pfizer/Eyetech)	2'-O-Metil purin/2'-fluoro pirimidin, két 2'-ribo purinhoz konjugált 40 kDa PEG módosítás, és 3' invert dT sapka	VEGF	Makula degeneráció	Elfogadott az USA-ban, és az EU-ban	(184, 186, 202)
AS1411/AGRO001 (Antisoma)	Nagy guanozin tartalmú DNS	Nukleolin	Akut mieloid leukémia	Fázis II	(203-205)

Elnevezés (Gyártó)	Összetétel	Célmolekula	Indikáció	Jelenlegi vizsgálati fázis	Referencia
REG1/RB006 plus RB007 (Regado Biosciences)	2'-ribo purin/ 2'-fluoro pirimidin (RB006), konjugált 40 kDa PEG plusz 2'-O- metil ellenszer (RB007)	IXa véralvadási faktor	Perkután koronária intervenció	Fázis II	(206, 207)
ARC 1779 (Archemix)	DNS és 2'-O- metil egy foszfotio- kapcsolattal, 20 kDa PEG- hez konjugálva, invert 3' dT sapka	Von Willebrand faktor A1 domén	Trombotikus mikroangiopátia	Fázis II	(208, 209)
NU172 (ARCA biopharma)	Módosíthatlan DNS aptamer	Trombin	Kardiopulmonáris bypass esetén antikoaguláns	Fázis II	(177)
ARC 1905 (Ophthotech)	2'-ribo purin/ 2'-fluoro pirimidin, 40 kDa PEG-hez konjugálva, invert 3' dT sapka	Komplement rendszer, 5-ös komponens	Makula degeneráció	Fázis I	(210)
E10030 (Ophthotech)	DNS és 2'-O- metil, 40 kDa PEG 5' véghez konjugálva, invert 3' dT sapka	PDGF	Makula degeneráció	Fázis I	(172)
NOX-A12 (NOXXON Pharma)	L-RNS 3' konjugált PEG	CXCL12	Mielóma és non- Hodgkin's limfóma	Fázis I	(211)
NOX-E36 (NOXXON Pharma)	L-RNS 3' konjugált PEG	CCL2	2-es típusú cukorbetegség, nefropátia	Fázis I	(212, 213)

A terápiás alkalmazások mellett, a diagnosztika területén is ígéretes aptamer kutatások zajlanak tumorok képalkotó vizsgálatában és terápiájában (112, 182, 214, 215), az influenza vírus detektálásában és gátlásában (216, 217) és a citokinek meghatározására (218). Az aptamerek alkalmasabbak az in vivo képalkotó diagnosztikára az antitesteknél (219), mivel kis méretük miatt hatékonyabban jutnak el a

szövetekbe, és kiürülésük is gyorsabb a szervezetből, ami előnyös lehet citotoxikus jelzőmolekulák, például radioaktív izotópok esetében.

Diagnosztikai szempontból az egyik leginkább tanulmányozott terület a rákos sejtek sejtfelszíni markereinek azonosítása. A célsejtek között találhatóak limfóma sejtek (220), leukémia sejtek (114), agyi tumor endotél sejtek (81) és agyi tumor glioblasztóma sejtek (221). Elméletileg számos hagyományosan antitest alapú diagnosztikai eljárás is átalakítható aptamer alapúvá, ilyen például az enzimkapcsolt immunoszorbens meghatározásból (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) kifejlesztett enzimkapcsolt oligonukleotid meghatározás (Enzyme Linked Oligonucleotide Assay, ELONA) (222). Az ELONA egy szendvics típusú meghatározás, amelyben az egyik kötő antitestet aptamer helyettesíti. A módszer igen specifikus és érzékeny, azonban nem nélkülözi teljes mértékben az antitestek alkalmazását.

4.10. Vírus-specifikus aptamerek

A legtöbb vírusfertőzés kimutatására kifejlesztett meghatározási módszer indirekt, a fertőzés hatására a szervezetben kialakuló vírus-specifikus antitestek kimutatásán alapul. Az indirekt vírusdiagnosztikai eljárások mellett számtalan nukleinsav és antitest alapú direkt, a virionok közvetlen kimutatására képes módszer is ismert (223-226). Az aptamerek az antitestekhez hasonlóan specifikusan felismerhetik a vírusfehérjéket, ezért megfelelő eszközök lehetnek a direkt vírusdiagnosztikában és a vírusreplikáció molekuláris analízisében (80, 227). Egy korábbi fejezetben már részletesen összevettem az antitestek és az aptamerek tulajdonságait és alkalmazhatóságát, így most csak a vírusdiagnosztikai szempontok szerinti különbségeket ismertetem. Az aptamerek szelekciója akár heteken belül kivitelezhető, így a gyorsan megjelenő új vírustörzsekre specifikus aptamerek rugalmasan előállíthatók. A kontraszelekciós lépések beiktatásával nagyon kis szerkezeti eltérésekre is érzékeny aptamerek generálhatók, így alkalmasak a vírusok genotipizálására. További előny, hogy nem csak rekombináns vírusfehérjék szolgálhatnak szelekciós célmolekulákként, hanem teljes vírusrészecskék, illetve vírussal fertőzött sejtek is. Az utóbbi esetekben nem kell tisztítani, de feltétlenül ismerni sem a vírus jellegzetes molekuláit, ráadásul a

vírusfertőzött sejtekkel végzett szelekció specifikusabb aptamereket eredményezhet, mivel a célfehérjék természetes formában vannak jelen a sejtmembránban (228). A vírusdiagnosztikai alkalmazások mellett terápiás célokra is érdemes az aptamerekkel kutatásokat végezni, mivel a célfehérjék funkciójára gyakran gátló hatással vannak, és képesek megkülönböztetni a vírussal fertőzött és az egészséges sejteket, ami az antivirális szerek fejlesztése során jól kiaknázható.

A Hepatitis C (HCV) vírus az A és B típus mellett a leggyakoribb kórokozója a sporadikus és poszt-transzfúziós hepatitisznek (229). A Föld népességének körülbelül 3%-a szenved májcirrózishoz és hepatokarcinómához vezető HCV fertőzésben, és (230) egyelőre nem áll rendelkezésre hatékony terápiás szer a fertőzés leküzdésére. A jelenleg alkalmazott, interferon α -n és ribavirin alapuló HCV kezelési protokollok költségesek, súlyos mellékhatásokat okozhatnak és lassan fejtik ki hatásukat (231) (232). Az elfogadott szerológiai szűrővizsgálatok elsősorban az anti-HCV antitestek kimutatásán alapulnak, ezek közül is az ELISA a legelterjedtebb megközelítés (233). A módszer igen érzékeny és specifikus, azonban használatánál számos korlátozó tényezőt kell szem előtt tartani. Az indirekt ELISA a fertőzés korai, HCV antigénekre specifikus antitestek megjelenése előtti szakaszában nem alkalmas az infekció kimutatására, és hasonlóképp félrevezető eredményt adhat transzplantációt követő immunszuppresszált valamint HIV fertőzött betegeknél (234).

A direkt HCV detektálási eljárások irányulhatnak már a fertőzés korai szakaszában is jelenlévő virális RNS, illetve fehérje komponensek kimutatására. A HCV nukleinsav alapú kimutatására kidolgoztak RT-PCR protokollokat, azonban ez a módszer munkaigényes, kontamináció következtében gyakran félrevezető eredményt szolgáltat, és magas költsége miatt a fejlődő országokban nem alkalmazható rutinszerűen (235, 236). A direkt HCV diagnosztika másik megközelítésében antitestekkel közvetlenül a vírus antigéneket mutatják ki szérumból. A vírus szerkezeti alapját szolgáló fehérjék, mint az E1 és E2 burokfehérjék vagy a mag antigén (core antigen) megfelelő célpontok lehetnek a fertőzés korai kimutatására. A jó minőségű antitestek előállításának nehézségei miatt csak nemrég került forgalomba olyan ELISA készlet amivel a mag antigént lehet kimutatni (237), és egyetlen olyan antitest alapú módszer sem áll rendelkezésre, amely a HCV felszíni antigénjeit tudná kimutatni szérumból. Összefoglalva, a fertőzés korai kimutatására sokkal

érzékenyebb és kevésbé költséges HCV diagnosztikai módszerekre lenne szükség (238), amire az aptamerek ideális megoldást nyújthatnak.

A HCV felszínén található E2 glikoprotein a hepatociták membránjában található koreceptorokhoz kötődik, ezáltal képes a vírus bejutni a sejtekbe. A burokfehérjére specifikus aptamerek szelekciójához a sejt felszínén E2-t stabilan expresszáló CT26 emlős sejt vonalat használtak, a kontraszelekcióhoz pedig a fehérjét nem expresszáló CT26-os vonalat. A kötődési vizsgálatok alapján a szelekció E2 specifikus és nagy affinitású ($K_d \approx 1 \text{ nM}$) DNS aptamert eredményezett. Az ily módon nyert aptamert sikeresen alkalmazták a HCV antitest-aptamer szendvics ELONA alapú meghatározására, ugyanis a mért értékek egyaránt arányosan változtak a szérum hígításával és a mintákban található HCV RNS mennyiségével. A szelektált aptamernek terápiás jelentősége is lehet, mivel az E2 célmolekulához kötődve megakadályozza a vírus CD81 koreceptor mediált membránfüzióját. Humán hepatocita sejtenyészeten az aptamer az alkalmazott dózissal arányosan megakadályozta a vírus terjedését. Hatékonyságát tükrözi, hogy 100 nM aptamer antivirális hatása megfelel 500 IU interferon α hatásának (238).

A HCV NS3 (Nonstructural Protein 3) egy N-terminális szerin proteáz és egy C-terminális helikáz doménből áll, mindemellett nukleotid trifoszfátáz aktivitással is rendelkezik. Többféle funkciója révén megfelelő célpont antivirális terápiás szerek fejlesztésére. Szelekcióval két aptamert azonosítottak, amelyek az NS3-hoz kötődtek, és in vitro tesztekben gátolták annak proteáz és helikáz aktivitását (229). Az NS3 aktív centrumához kötődő aptamer előállításához a szelekció során a trunkált NS3 polipeptidet alkalmazták célmolekulaként. A kísérlet olyan nagy affinitású ($K_d = 10 \text{ nM}$) aptamereket eredményezett, amelyek 90%-kal csökkentették az enzim proteáz aktivitását (239). Az NS3 fehérje mellett a másik fő HCV terápiás célpont a Hepatitis C vírus RNS polimeráz enzime (NS5B). Az NS5B enzimre több szelekciót is végeztek, és a szelektált RNS (91) és DNS aptamerek (240) is szelektíven gátolták az enzim aktivitását. A DNS aptamer 1 μM -os koncentrációban teljes mértékben meggátolta az RNS szintézist, miközben más vírusok polimerázait (HIV-1, 3D^{pol} poliovírus) nem befolyásolta (240). A Hepatitis C 3a altípusának NS5B enzimére felületi plazmon rezonancia (SPR) alkalmazásával is szelektáltak aptamereket (241), amelyek nanomoláris affinitással specifikusan kötődtek a HCV polimerázhoz, és gátolták annak

funkcióját is. Emellett a szelekció során alkalmazott vírus genotípusára is szelektívek voltak, mivel a HCV 1a, és 1b altípusának polimeráz enzimeit a kísérletekben nem gátolták.

A HCV transzláció iniciálásához szükséges a négy doménből álló (I-IV), különböző HCV altípusok között nagymértékben konzervált IRES (Internal Ribosome Entry Site). Az IRES, a 40S riboszómális alegység és az eIF3 együttes kölcsönhatása szükséges a transzláció iniciálásához (242). Az IRES I (243) és III doménra (244) olyan RNS aptamereket szelektáltak, amelyek in vitro és in vivo kísérletekben is hatékony gátlószereknek bizonyultak. Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy több olyan hepatitis vírusra specifikus aptamert fejlesztettek, amelyek antivirális hatását jelenleg is tesztelik állat modelleken és klinikai vizsgálatokban. Mindezeknek köszönhetően, a hepatitis terápiájában is elérhető eszközökké válhatnak az aptamerek a közeljövőben (245).

Az influenza A vírus az Orthomyxoviridae családba tartozik, és a légúti fertőzéssel járó szezonális járványok mellett világméretű járványokat is okozhat (246). A vírus felszíni antigénje folyamatosan változik, ezért bonyolult univerzális és hatékony vakcinát fejleszteni a fertőzés leküzdésére. Számos olyan gyógyszer áll rendelkezésre, amelyek profilaktikusan alkalmazva csökkentik a fertőzés előfordulását vagy a fertőzést követő 1-2 napon belül adva csökkentik a tünetek időtartamát (247). A jelenleg elérhető gyógyszerek alkalmazása azonban mellékhatásokkal járhat, rezisztens törzsek kialakulását idézheti elő, illetve sok esetben nem hat az újonnan megjelenő vírustípusokra, így továbbra is igény van hatékony influenza ellenes hatóanyagokra és diagnosztikai eszközökre.

A kereskedelmi forgalomban jelenleg kapható HA specifikus monoklonális antitestek nem alkalmasak a különböző altípusokba tartozó influenza törzsek megkülönböztetésére, holott ez diagnosztikai célból fontos lehet annak eldöntésére, hogy a vírusok milyen típusokba és altípusokba sorolhatók, illetve milyen mértékű az egyes fertőzések súlyossága. A két szerkezeti alegységből (HA1, HA2) felépülő HA fehérje kiválóan alkalmas célmolekula aptamer szelekcióra, mivel egy vírusrészecske felszínén nagyjából 900 kópiában fordul elő. Funkcióját tekintve a fertőzés korai szakaszában a vírus és gazda sejt membránja közötti fúzióban vesz részt (248). A különböző influenza altípusok HA1 fehérjéinek aminosav összetétele 84-90%-ban

megegyezik. A humán influenza A vírus részecskékre olyan RNS aptamereket szelektáltak, amelyek specifikusan kötődtek a vírus hemagglutinin (HA) glikoproteinjéhez és az N3N2 altípuson belül különbséget is tettek egyes törzsek között, így genotipizálásra is alkalmasak (217). A kötődési vizsgálatok eredménye alapján az aptamer az A/Panama törzs HA fehérjéjéhez kapcsolódik, és a kontraszelektációs lépésnek köszönhetően képes megkülönböztetni ezt más influenza vírusok HA fehérjétől, beleértve az ugyancsak N3N2 altípusba tartozó A/Aichi törzset. A szelektált aptamer affinitása ($K_d=188\text{pM}$) tizenötször nagyobb, mint a monoklonális antitesté, és a kísérletek alapján megakadályozta a vírus HA-mediált membránfúzióját is (217). A HA konzervált globuláris régiójára olyan DNS aptamert is szelektáltak, amely megakadályozta a vírus receptor kötődését, és ezen keresztül a fertőzést is. Egereken végzett kísérletekben az aptamert két nappal a fertőzés után, injekció formájában juttatták be az állatokba. A kezelés hatására a vírus egerek tüdejében mérhető titerszáma jelentősen lecsökkent (216). A H5N1 influenza vírus rekombináns HA fehérjéjére is szelektáltak DNS aptamert, amelyről az MDCK (Madin–Darby canine kidney) sejtenyészeteken végzett kísérletek alapján ugyancsak kimutatták, hogy az alkalmazott dózissal arányos antivirális hatással rendelkezik (249).

Az AIDS (acquired immune deficiency syndrome) kialakulásáért felelős HIV-1 (human immunodeficiency virus) a gyógyszerfejlesztők elsődleges célpontjai közé tartozik. A vírus replikációs ciklusának különböző fázisait célzó, már elfogadott, hatékony kismolekulás gyógyszerek állnak rendelkezésre, de emellett nukleinsav alapú terápiás szereket is fejlesztenek (21). A HIV retrovírus a vírusban kódolt reverz transzkriptáz enzim (HIV RT) segítségével a virális RNS-ből kétszálú DNS-t szintetizál, amely azután beépül a gazda szervezet genomjába, így biztosítva saját replikációját (250), (251). A HIV RT RNS- és DNS-dependens polimeráz, illetve RN-áz H aktivitással rendelkezik. Mivel fontos szerepet tölt be a vírus replikációban az AIDS terápiájának fő célpontja és számos gátlószert is fejlesztettek rá, úgymint a 3'-Azido-2',3'-didezoximidint (AZT), a 2',3'-didezoxiinozint (DDI) és a 2',3'-didezoxicitidint (DDC) (250), (252). Ezekről a szerekről bebizonyosodott, hogy csökkentik a fertőzés mértékét, viszont csak rövid ideig hatásosak, és alkalmazásuk jelentős mellékhatásokkal jár.

A HIV-1 RT-re olyan nanomoláris affinitású RNS aptamert szelektáltak (76), amely jelentősen gátolta a reverz transzkripciót és sejtkultúrán végzett vizsgálatok alapján 90-99%-kal csökkentette a vírusreplikációt (253). Több retrovírussal is végeztek vizsgálatokat, de az aptamer szelektíven csak a HIV-1 RT-t gátolta, így feltételezhető, hogy aptamerekkel sokkal szelektívebb RT gátlószereket lehetne létrehozni, mint a hagyományos szubsztrát analógokkal. A több funkciójú RT enzim, RN-áz aktivitásáért az RN-áz H domén felelős. Az erre a doménre szelektált DNS aptamer (154) G-quadruplex szerkezetű, és in vitro gátolja az enzim RN-áz H és polimeráz aktivitását is. Sejtkultúrában az aptamer képes meggátolni a HIV fertőzést ($IC_{50}=10nM$), amihez még transzfekeciós reagens alkalmazására sincs szükség. Kapilláris elektroforézis segítségével mindössze négy ciklus elvégzésével olyan DNS aptamereket szelektáltak, amelyek a korábbi, hagyományos szelekciós technikával nyert DNS szekvenciáknál erősebben, igen nagy affinitással ($K_d=180 pM$) kötődtek a HIV RT-hez, és ennek eléréséhez nem volt szükség negatív vagy kontraszelekciós lépésekre sem (36).

A HIV vírus a gp120 burokfehérjéjének segítségével a T-sejtek CD4 receptorához kötődve képes bejutni a sejtbe. A gp120 nagymértékben glikozilált, emiatt az immunrendszer nem ismeri fel, így antitest nem termeltethető ellene. Ugyanakkor az aptamerek kis méretük révén képesek a gp120 kis, konzervált doménjeihez kötődni, oda ahová már a nagyobb molekulák, mint például az antitestek nem férnek be. A gp120 glikoproteinre szelektált 2'-fluoro-pirimidin módosított RNS aptamer megakadályozta a HIV vírus és receptora között kialakuló kölcsönhatást, ezáltal a vírus terjedését is in vitro tesztekben (254). A burokfehérje mediált sejt-fúzió gátlására foszforotioát módosított DNS aptamert is szelektáltak, amely G-quadruplex szerkezettel rendelkezik, és in vitro tesztekben ugyancsak megakadályozta a vírus terjedését (255). A foszforotioát módosított aptamer a gp120 V3 hurokhoz kötődik, ily módon akadályozva a vírus kötődését vagy fúzióját a sejtrel. Az aptamer a gyógyszer rezisztens törzseken is hatékonyan bizonyult. A Tat fehérje a HIV vírus replikációjának aktivátora és működéséhez szükséges a TAR (trans-activation response element). A Tat-ra szelektált RNS aptamer ($K_d=120 pM$) a vizsgált sejtkultúrákban 70%-kal csökkentette a vírus terjedését (256).

Vírusfehérjék detektálására az antitesteket felhasználó immunoszenzorok mintájára aptamer alapú szenzorokat is fejlesztettek (227). A HIV-1 Tat fehérje

detektálásra RNS aptamert immobilizáltak egy piezoelektromos kvarc kristály felületén (257). A QCM (quartz crystal microbalance) alapú aptaszenzort, a megfelelő SPR alapú aptaszenzorral is összehasonlították. A módszerek érzékenysége és specifitása megegyezett, és hasonló volt a reprodukálhatóságuk is, mindkét esetben 0,25 ppm volt a kimutatási határ (258). A HCV mag antigén kimutatására is létrehoztak egy aptaszenzort, amely alkalmas a fertőzött szérumbintákból származó HCV antigén kimutatására (259). A 4. táblázat a vírusokra szelektált aptamereket és azok alkalmazását összegzi.

4. táblázat: Vírus specifikus aptamerek. (227)

Célmolekula	Alkalmazás	Referencia
Hepatitis C vírus (HCV) NS3 proteáz	HCV gátló szerek	(239)
HCV NS3 helikáz	Terápia és diagnosztika	(260)
HCV NS5B RNS polimeráz	Polimeráz gátlás	(91)
HIV-1 RT Reverz transzkriptáz	Reverz transzkriptáz gátlás	(261)
HIV-1 Tat fehérje Transzkripció transzaktivátor fehérje	Transzkripció gátlás és detektálás	(256)
HIV-1 R5 SU glikoprotein (gp120)	Antivirális szer	(254)
Influenza A vírus (H5N1) HA1 fehérje	Antivirális szer	(249)
SARS coronavirus (SCV) NTPáz/Helikáz	SCV-ellenes szerek	(262)
Rous Sarcoma vírus (RSV)	Vírus inhibitor	(144)
Vaccinia vírus (VACV)	Vírus inhibitor	(263)
Humán Influenza A vírus (H3N2) (A/Panama)	Vírus inhibitor, genotipizálás	(217)

4.11. Az Apple Stem Pitting Virus (ASPV) jellemzése

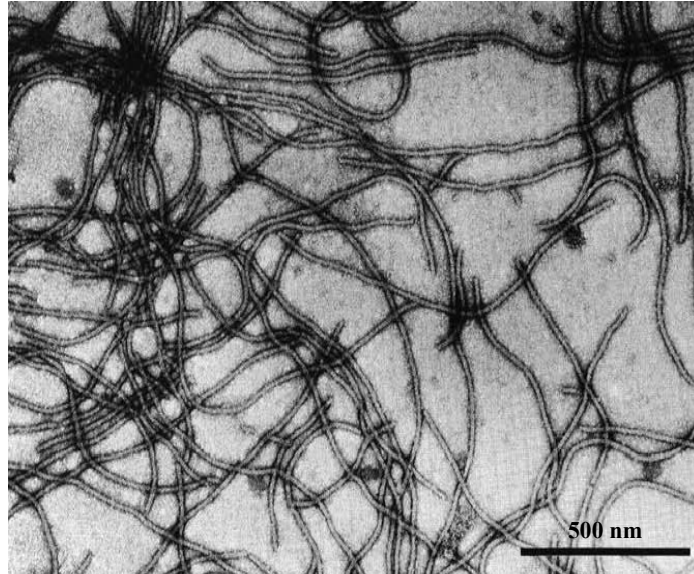
A *Foveavirusok* nemzetségébe, a *Flexiviridae* családba tartozó ASPV-t 1954-ben fedezték fel (264). A vírus az alma és körte ültetvényeket károsítja elsősorban azokon a területeken, ahol vírusra érzékeny gyökér alanyokat alkalmaznak átoltáshoz. A tünetek közé tartoznak a szárrészek és törzs fás szövetének gödrösödése, a levelek pöndörödése, a növény állapotának általános romlása (6. ábra).



6. ábra: ASPV fertőzés tünetei az átoltott növényi részeken.

A vírus világszerte elterjedt és kereskedelmi kultúrákat is gyakran megfertőz, amely azonban látens, tünetmentes maradhat. Az ASPV egyik törzse a Pear Vein Yellow virus világszerte elterjedt körte ültetvényeken, és a levelek ereinek sárgulását és vörös foltosodását okozza (265).

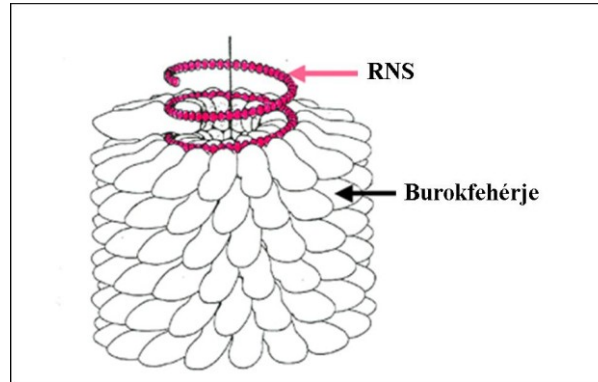
A vírus tanulmányozásához *Nicotiana occidentalis*-ba oltották az ágenst, majd a felszaporítást követően a vírusrészecskéket gradiens centrifugálással kitisztították (7. ábra). A vírus formája helikális, hosszúkás, hajlékony pálca, hossza 800 nm, szélessége 15-20 nm és hosszanti irányban hajlamos az aggregációra (8. ábra) (266) (267).



7.ábra: Elektronmikroszkópos felvétel a gradiens centrifugálással tisztított ASPV részecskékről.
A vírus helikális, hosszúkás, hajlékony pálcákat formál (267).

A virionok pozitív egyszálú 3' végen poliadenilált RNS-t tartalmaznak, amelynek mérete a vírus izolátumtól függően 8,4-9,3 kilobázis között mozog. A különböző ASPV izolátumok vizsgálata alapján több szekvencia variáns létezik. Átoltási kísérletek alapján a PVYV (Pear Vein Yellows virus), a PSPV (pear stony pit virus) és az ASPV egy vírus különböző törzseit képviselik (268). A vírus legfőbb fehérje komponense a 48 kDa molekulatömegű burokfehérje. Kilenc ASPV törzs szekvencia analízise alapján a burokfehérjék homológiája 64,8-89,6% közötti, és az aminosav szám 396 és 415 között változik (269).

Az ASPV fertőzés azonosítására sokáig az egyetlen kimutatási módszert érzékeny indikátor növényekre (Malus sieboldii MO65, Virginia Crab, és a Spy 227) történő átoltás, és a tünetek figyelemmel követése jelentette (6. ábra) (270). Ez az eljárás azonban költséges és időigényes, ezért alacsony hatékonyságú módszer.



8. ábra: Az ASPV felépítésének sematikus ábrája.

Az átoltás mellett az ASPV detektálására egyszerűbb és gyorsabb módszereket is létrehoztak. A nukleinsav alapú meghatározási módszerek, mint az RT-PCR (271-273) és a fluoreszcens hibridizációs próbán alapuló meghatározás (274) eléggé érzékenyek, azonban nagy mintaszám vizsgálatára a körülményes minta előkészítés és nagy hibalehetőség következtében nem megfelelőek (275). A közelmúltban ASPV-specifikus monoklonális antitestet is előállítottak, amellyel kettős enzimkapcsolt antitest alapú meghatározási módszert fejlesztettek (DAS-ELISA). A módszer alkalmas a vírus különböző izolátumaival fertőzött növényi kivonatok detektálására, és lehetővé teszi nagy számú minták elemzését (276), de gyakran félrevezető eredményeket ad (277).

Mindezek figyelembevételével jelenleg az RT-PCR a legalkalmasabb ASPV kimutatási módszer, amennyiben alacsony a vírus szám az analizálandó mintában, így napjainkban ezt az eljárást alkalmazzák legáltalánosabban (273, 278-280).

5. Célkitűzések

A molekuláris diagnosztikai eszközök egyre növekvő jelentőséggel bírnak a vírusdetektálásban, a gyakorlatban azonban továbbra is az antitest alapú, enzim-kapcsolt immunológiai meghatározásokat részesítik előnyben. Ennek megfelelően az ASP vírus kimutatására is létrehoztak monoklonális ellenanyagot, és alkalmazásával kifejlesztettek egy ELISA készletet. A létrehozott eljárás azonban nem alkalmas a különböző ASPV izolátumokból származó burokfehérjék megkülönböztetésére, kimutatási határa alacsony és gyakran félrevezető eredményeket ad. Az elmúlt évtizedben az aptamerekről bebizonyosodott, hogy számos alkalmazási területen megfelelő alternatívái lehetnek az antitesteknek. A kontraszelekciós lépések beiktatásával, megfelelően szelektált aptamerek nagy specifitásuk révén elméletileg képesek rá, hogy felismerjék az egyes ASPV izolátumokra jellemző burokfehérjéket, így alkalmasak lehetnek vírusdiagnosztikai módszerek fejlesztésére.

A fent említett szempontoknak megfelelően foglalom össze a munkánk során kitűzött célokat:

- Az aptamerek szelekciójához szükséges két ASPV izolátumra jellemző burokfehérje (MT32 és PSA-H) előállításának bakteriális fehérjetúltermelő rendszerrel, majd a rekombináns burokfehérjék tisztítása affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával.
- Olyan a burokfehérjére specifikus aptamerek szelekciója, amelyek képesek a két nagyfokú homológiát mutató fehérje megkülönböztetésére, így alkalmasak lehetnek a genotípusok meghatározására.
- A szelektált aptamerek kötőképességének jellemzése.
- Az aptamerek gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata és felhasználása vírusdiagnosztikai módszerekben antitest helyettesítő molekulákként.

6. Felhasznált anyagok

5. táblázat: Felhasznált anyagok a gyártók feltüntetésével.

ACLSV pozitív kontrol kivonat	BioReba AG, Reinach, Switzerland
40% Acrylamide/Bis Solution- Akrilamid mix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Általános negatív növényi kivonat	BioReba AG, Reinach, Switzerland
Anti-ASPV IgG	BioReba AG, Reinach, Switzerland
APMV pozitív kontrol kivonat	BioReba AG, Reinach, Switzerland
ASPV pozitív kontrol kivonat	BioReba AG, Reinach, Switzerland
ASPV Complete kit 480- ASPV detektáló kit	BioReba AG, Reinach, Switzerland
ASPV Detecting Kit Substrate Solution- szubsztrát oldat	BioReba AG, Reinach, Switzerland
BL21(DE3)pLysS kompetens sejt	Novagen, EMD Biosciences, Gibbstown, NJ, USA
Brómfenol kék	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Carbenicillin	Bioline, Taunton, MA, USA
Coating Buffer	BioReba AG, Reinach, Switzerland
Conjugate Buffer	BioReba AG, Reinach, Switzerland
Coomassie Brilliant blue R250	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poli-(dezoxi-inozin-dezoxi-citidin) nátrium sója (dIdC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DH5 α kompetens sejt	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dietanolamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP Mix, 2 mM each- dNTP keverék	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

ExtrAvidin-AP – extravidin-konjugált alkalikus foszfatáz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ExtrAvidin-HRP- extravidin-konjugált torna peroxidáz enzim	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Etiléndiamin-tetraacetát (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
6x Loading Dye- mintafelvivő puffer	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL.
Klóramfenikol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Low Range DNA Ladder Mix- kis molekulásúlyú DNS marker keverék	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
1-Metilimidazol (1-MELM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Maleimide Activated Clear Strip Plates- maleimid-aktivált mikrotiter tálca	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Ni-NTA HisBind agaróz affinitás kromatográfiás gyanta	Novagen, EMD Biosciences, Gibbstown, NJ, USA
Nitrocellulóz membrán	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
NucleoLink plate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL.
Oligonukleotid könyvtár	Metabion, Martinsried, Germany
pDEST17 vektor	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pDONR 201 vektor	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
p-GEM-T-easy vektor	Promega, Madison, WI.
p-nitrofenil-foszfát (pNPP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Prestained Protein Ladder- festett fehérje molekulásúly marker keverék	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Proteáz inhibitor koktél	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protein-Free blokkoló oldat	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
PVDF membrán	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reacti-Bind Streptavidin Coated High	Pierce, Thermo Fisher Scientific,

Binding Capacity plate, (8-well strips)-sztreptavidin-módosított mikrotiter-tálca	Rockford, IL, USA
10X Reaction Buffer (Taq polimerázhoz)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SuperBlock blokkoló oldat	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Taq polimeráz	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Unstained Protein Ladder – festetlen fehérje molekulásúly marker keverék	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Yeast Extract- élesztő kivonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

6. táblázat: A kísérletek során felhasznált pufferek, oldatok az összetétel feltüntetésével.

LB agar táptalaj	1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 2% agar, ultra tiszta víz
LB tápoldat	1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, ultra tiszta víz
SOB tápoldat	0,5% élesztőkivonat, 2% tripton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC tápoldat	0,5% élesztőkivonat, 2% tripton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glükóz
Laemmlli elválasztó gél puffer	1,5 M TRIS, 10% SDS, pH 8,8
Laemmlli tömörítő gél puffer	1 M TRIS, 10% SDS, pH 6,8
Anód I. puffer	0,3 M TRIS, 10% metanol, pH 10,4

Anód II. puffer	25 mM TRIS, 10% metanol, pH 10,4
Katód puffer	25 mM TRIS, 40 mM glicin, 10% metanol, pH 9,4
5x Laemmlli minta puffer	0,312 M TRIS, 10% SDS, 250 mM DTT, 50% glicerin, 0,01% brómfenol-kék, pH 6,8
Feltárási puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,1% Triton X-100, Proteáz Inhibítor Koktél, pH 7,5
1x SDS futtató oldat	3 g/l TRIS, 14 g/l glicin, 1g/l SDS
Coomassie festőoldat	0,2% Coomassie Brilliant blue R250, 0,2 M citromsav
1x PBS-T	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0,05% Triton- X, pH 7,5
1x PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,5
PEG PCR Cleanup puffer	26% PEG 8000, 6,5 mM MgCl ₂ , 0,6 M NaAc, pH 6-7
Fedő puffer (ELISA kit)	15 mM Na ₂ CO ₃ , 34,8 mM NaHCO ₃ , 3 mM NaN ₃ , pH=9,6
Mosó puffer (ELISA kit)	136 mM NaCl, 1,46 mM KH ₂ PO ₄ , 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,68 mM KCl, 0,05% Tween 20, pH=7,4
Kapcsoló puffer (ELISA kit)	19,8 mM TRIS, 136,8 mM NaCl, 2% PVP K25 (MW 24000), 0,05% Tween 20, 0,2% BSA, 0,1 mM MgCl ₂ ×6 H ₂ O, 2,68 mM KCl, 3 mM NaN ₃ , pH=7,4
Szubsztrát puffer (ELISA kit)	1 M dietanolamin, 3 mM NaN ₃ , pH=9,8
Kötő puffer (maleimid-aktivált mikrotiter tálcahoz)	PBS, 10 mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH 7,2

Mosó puffer (maleimid-aktivált mikrotiter tálcához)	PBS, 1mM EDTA, 0,2% Tween-20, pH 7,2
Bakteriális totál kivonat (maleimid-aktivált mikrotiter tálcához)	PBS, 1 mM EDTA, 0,2% Tween-20, 1 mM PMSF, pH 7,2, 0,5 mg/ml <i>E. coli</i> protein koncentráció
Borát puffer	0,1 M H ₃ BO ₃ , pH=9,3

7. táblázat: A kísérletek során alkalmazott aptamerek és primerek szekvenciái.

MT32 rövid	GGGGTGGTGGGTTCCTTTTTGTGGTATTGGTGTGGGGGGCA
MT32 rövid biotinizált	GGGGTGGTGGGTTCCTTTTTGTGGTATTGGTGTGGGGGGCAT TTT-(Btntg)
MT32 rövid 3' tiol-módosított	GGGGTGGTGGGTTCCTTTTTGTGGTATTGGTGTGGGGGGCAT TTT-(C6-SH)
MT32 rövid 5' foszforilált	(Phos)- TTTTTGGGGTGGTGGGTTCCTTTTTGTGGTATTGGTGTGGGG GGCAT
PSAH rövid	AGCAAGGTTTGGTGTGGTTGGTTGCTGGTTTTGGTTTGGC
PSAH rövid biotinizált	AGCAAGGTTTGGTGTGGTTGGTTGCTGGTTTTGGTTTGGC TTTT-(Biotin)
MT32 hosszú	AGCCTCGTCTGTTCTCCCGGGTGGTGGGTTCCTTTTTGTGG TATTGGTGTGGGGGGCAGGGAAGACAAGCAGACGT
PSAH hosszú	AGCCTCGTCTGTTCTCCAGCAAGGTTTGGTGTGGTTGGT TGCTGGTTTTGGTTTGGCGGGAAGACAAGCAGACGT
SELR	5'-ACGTCTGCTTGTCTTCCC-3'
SELR biotinizált	5'-Biotin-ACGTCTGCTTGTCTTCCC-3'
SELF	5'-AGCCTCGTCTGTTCTCCC-3'
attb1ASPV79 56 primer	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGACTTCC AATGGATCCCA-3'

attb2ASPV92 63 primer	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATAGCCGCC CGGTTAGGTT-3'
M13 forward primer	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverse primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

7. Módszerek

7.1. Az ASPV burokfehérjéket kódoló szekvenciák klónozása

Az ASPV MT32 izolátumának (Genbank azonosító száma: AF438521) és a PVYV PSA-H izolátumának (Genbank azonosító száma: D21828) burokfehérjéit kódoló pDEST17::MT32 és pDEST17::PSA-H vektorkonstrukciókat rendelkezésünkre bocsátották. Előállításukat röviden összefoglalom. Az ASPV vírus kétféle izolátumából, az almafából izolált MT32-ből és a körtefából izolált PSA-H-ből készült cDNS könyvtárból amplifikálták a burokfehérjéket kódoló szekvenciákat az atb1ASPV7956; 5'-ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctcaatgactccaatggatccca-3' és atb2ASPV9263; 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcatagcccccggtaggtt-3' primerekkel PCR-rel. A PCR terméket BP rekombinációval pDONR201 vektorba klónozták, és a kész vektorral DH5α *E. coli* kompetens sejteket transzformáltak. A vektort Plasmid Miniprep Kittel tisztították és szekvenálással ellenőrizték. Ezután a burokfehérjéket kódoló pDONR201 vektorkonstrukciókat LR rekombinációval pDEST17 expressziós vektorba klónozták, létrehozva a pDEST17::MT32 és pDEST17::PSA-H vektor-konstrukciókat.

A pDEST17::MT32 és pDEST17::PSA-H vektor-konstrukciókat fehérje túltermelésre alkalmas BL21(DE3)pLysS *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A transzformálás a következőképpen zajlott: -80 °C-on tárolt, kémiai kompetens baktériumsejteket tartalmazó szuszpenziót jégen kiolvasztottuk, majd összekevertük ~100 ng pDEST17::MT32 vagy pDEST17::PSA-H tisztított plazmid DNS-sel, 20 percig jégen inkubáltuk, egy percre 42 °C-os termosztátba helyeztük, majd újra jégre tettük. A bakteriális sejtsuszpenzióhoz ezután 500 µl SOC médiumot adtunk, és egy órára intenzíven rázatott 37 °C-os termosztátba helyeztük. A bakteriális sejteket ezután lecentrifugáltuk 8 percig 4000 fordulat/percen, szobahőmérsékleten, a felülúszóból 400 µl-t lepipettáztuk, majd a kialakult csapadékot a maradék oldatban felszuszpendáltuk és üvegbottal szélesztettük 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó szilárd LB agar táptalajon. A táptalajra szélesztett baktériumokat 37 °C-on ~15 órán át inkubáltuk, majd egy-egy felnőtt telepet 10-10 ml 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó folyékony LB táptalajba oltottunk, és 37 °C-os inkubátorban újabb ~15 órán át, intenzív rázatással inkubáltuk. A karbenicillin, és klóramfenikol rezisztens BL21(DE3)pLysS pDEST17::MT32, és a

BL21(DE3)pLysS pDEST17::PSA-H bakteriális sejtszuszpenziókból későbbi kísérleteinkhez glicerines sejtszuszpenziót készítettünk: fagyasztócsőben 300 µl glicerint és 700 µl bakteriális sejtszuszpenziót összekevertünk, és -80 °C-ra helyeztünk.

7.2. ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszerben

A BL21(DE3)pLysS pDEST17::MT32 és a BL21(DE3)pLysS pDEST17::PSA-H glicerol szuszpenziókat 35 µg/ml klóramfenikolt és 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó LB agar lemezre szélesztettünk, és 37 °C-on inkubáltuk ~15 órán át, majd a felnőtt telepekből egyet-egyed az antibiotikumokat tartalmazó folyékony LB táptalajba oltottunk, és a már közölt módon felnevesztettünk. Az így felszaporított starter kultúrákból 10-10 ml-t 500 ml 35 µg/ml klóramfenikolt és 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó folyékony LB táptalajba oltottunk, és intenzív rázatás mellett 37 °C-os inkubátorban növesztettünk, amíg a szuszpenziók optikai denzitása 600 nm-en elérte a 0,5-ös értéket. Ekkor az inkubátor hőmérsékletét 30 °C-ra csökkentettük, és a bakteriális sejtek rekombináns fehérjetermelését 400 µM végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltuk. 5 óra indukció után a szuszpenziót 4 °C-on 5000 fordulat/percen 20 percen keresztül centrifugáltuk, majd az így nyert bakteriális csapadékról eltávolítottuk a felülúszót.

A rekombináns 6xHis jelölő címkével termelt burokfehérjéket nikkellion-aktivált HisBind agaróz affinitás kromatográfiás gyantával tisztítottuk, amelyből 200 µl-t mostunk kétszer 500 µl PBS-sel, 50 mM nikkelszulfát oldattal aktiváltuk 30 percen át szobahőmérsékleten, majd újra mostuk kétszer 500 µl PBS-sel. A lecentrifugált bakteriális csapadékot jégen tartva 20 ml feltárási pufferben felszuszpendáltuk, majd ötször 30 másodpercig szonikáltuk. A feltárt szuszpenziót 4 °C-on 30 percig centrifugáltuk 13000 fordulat/percen. A szolubilis fehérjéket tartalmazó centrifugális felülúszót 30 percen keresztül enyhe rázogatással jégen inkubáltuk az aktivált affinitás kromatográfiás gyantával. A gyantát 1500 fordulat/percen 4 °C-on 5 perc centrifugálással üleptítettük, és a felülúszó leöntése után háromszor 300 µl feltárási pufferrel, háromszor 300 µl 50 mM-os imidazol-PBS-sel, háromszor 300 µl 100 mM-os imidazol-PBS-sel, végül háromszor 300 µl 150 mM-os imidazol-PBS-sel mostuk a szennyező fehérjék eltávolítása érdekében. A mosások között 30 másodpercig, 1000

fordulat/percen centrifugálással ülepitettük a gyantát, majd a felülúszót fecskendővel eltávolítottuk. A gyantára kötött tisztított burokfehérjéket 500 mM-os imidazol-PBS-sel, három lépésben eluáltuk. Háromszor 200 µl elúciós pufferrel háromszor 5 percig inkubáltuk a gyantát, és a frakciókat külön-külön, alacsony fehérje-kötőképességű eppendorf csövekbe pipettáztuk. Az imidazoltól dializálással szabadultunk meg. Az elúciókat kiegészítettük glicerinnel 10%-os végkoncentrációig, hogy elkerüljük a fehérje denaturációját, és dializáló membránnal ellátott kamrába pipettáztuk, majd egy éjszakán át 200 ml 10% glicerint tartalmazó PBS-ben enyhe kevertetéssel 4 °C-on dializáltuk. A dializált elúciók fehérje koncentráció meghatározását Bradford reagenssel végeztük el.

7.3. Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója

Az aptamerek szelekciójához 10^{14} -féle nukleotid szekvenciát tartalmazó, 1 µM-os, HPLC-vel tisztított oligonukleotid könyvtárból indultunk ki. A könyvtárban található 76 bázis hosszúságú, egyszálú DNS szekvenciák két állandó, 18 nukleotid hosszúságú primer kötő részt tartalmaznak, amelyek közrefognak egy 40 random nukleotidból álló szakaszt (40N). Általános felépítésük a következő: 5'-AGCCTCGTCTGTTCTCCC-N₄₀-GGGAAGACAAGCAGACGT-3'. A szelekciót SELEX módszerrel, 15 ciklus elvégzésével kiviteleztük. A szelekcióhoz 1 nmol DNS-t tartalmazó oligonukleotid könyvtárat 100 µl PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal hígítottunk, majd 95 °C-on inkubáltuk 2 percig, és azonnal jégre tettük, ami által a DNS szekvenciákban kialakult másodlagos struktúrákat megbontottuk. Az oldatot kiegészítettük 9,9 ml 0,1 µg/ml dIdC-t és 1 µg/ml BSA-t tartalmazó PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal. Ezután 30 µl, körülbelül 300 pmol PSAH, vagy MT32 fehérjét tartalmazó Ni-NTA HisBind agaróz affinitás kromatográfiás gyantával inkubáltuk az oldatot 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten enyhe rázatással. Az inkubálás leteltével a gyengén vagy egyáltalán nem kötődött DNS szekvenciákat mosással, háromszor 1 ml PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal távolítottuk el. A fehérjét és az ahhoz kötődött aptamereket 20 µl 500 mM imidazolt tartalmazó 20 mM Tris pH 8,0 oldattal eluáltuk a gyantáról, és templátként a PCR elegyhez adtuk. A 100 µl térfogatú PCR elegy összetétele a következő volt: 20 µl templát, 10 µl 10x Reaction Buffer, 1,5 U Taq polimeráz, 1-1 µM SELF, és biotinilált

SELR primerek, 0,8 mM dNTP és 1,5 mM MgCl₂ ultra tiszta vízzel kiegészítve. Az elegyet két PCR csőbe szétosztottuk, és 2 percig inkubáltuk 95°C-on, majd 18 ciklust végeztünk el, amelynek lépései: 30 sec 95 °C-on, 30 sec 56 °C-on, 30 sec 68 °C-on, és végül 2 percig inkubáltuk az elegyet 68 °C-on. A keletkezett termékből 5-5 µl-t 2,5%-os agaróz gélen, gélelektroforézissel ellenőriztünk. A mintákat 1 µl 6x Loading Dye mintafelvívő pufferral egészítettük ki. A mintákkal párhuzamosan 5 µl Low Range DNA Ladder Mix molekulásúly-markert is futtattunk, annak megállapítására, hogy a termékünk mérete megfelelő. Ezután a maradék 90 µl PCR termékhez 23 µl 5 M-os NaCl oldatot adtunk, kétfelé osztottuk, és Reacti-Bind sztreptavidin-módosított, nagy kötőképességű mikrotiter tálca 1-1 cellájában inkubáltuk egy órán keresztül. A kötés után a felülúszót eltávolítottuk, és a cellákat háromszor 1 ml PBS-0,05% Triton-X 100 oldattal mostuk. A biotint nem tartalmazó DNS szálakat ezután 30 µl/cella frissen készített 100 mM-os NaOH oldattal eluáltuk az immobilizált komplementer szálakról. Az eluált szekvenciákat tartalmazó oldatot lepipettáztuk, és 1 ml-re hígítottuk 1,5 µl 1 M-os NaH₂PO₄ oldattal kiegészített PBS-0,05% Triton-X 100 oldatban, hogy a pH-t visszaállítsuk 7,5-re. Az így előállított elegyet használtuk fel a SELEX második ciklusához, miután 95 °C-on 5 percig inkubáltuk, és jégen lehűtöttük. A szelekció további ciklusait azonos körülmények között, csökkenő fehérjemennyiséggel végeztük. A 2-9. ciklusban 150 pmol-t, a 10-15. ciklusban 100 pmol proteint használtunk fel a szelekcióhoz, hogy növeljük az erősebben kötődő szekvenciák arányát. A szelektált aptamerek specifikusságának növelésére kontraszelekciós lépéseket is beiktattunk a SELEX folyamatába. A 3., 6., 9., ciklus után nyert PSAH vagy MT32 specifikus szekvenciákat tartalmazó elegyet inkubáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten, enyhe rázatással 15 µl Ni-NTA HisBind agaróz affinitás kromatográfiás gyantához kötött MT32 vagy PSAH fehérjével, és ekkor a nem kötődött szekvenciákat tartalmazó felülúszót vittük tovább a következő SELEX ciklushoz. A legutolsó ciklusban a PCR-hez biotin-mentes reverz primert alkalmaztunk, és a keletkezett termékből 4 µl-t T/A klónozással p-GEM-T-easy vektorba inszertáltunk. A ligálási elegyet DH5α kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk. A felnőtt telepekből 20-20 darabot ellenőriztünk kolónia PCR-rel M13 forward és reverse primerekkel, annak megállapítására, hogy a megfelelő méretű inszerteket tartalmazza a vektor. Ekkor a PCR termékből 5-5 µl-t ellenőriztünk 2,5%-os agaróz gélelektroforézissel. A maradék 45 µl elegyből PEG PCR

Cleanup pufferrel kitisztítottuk a PCR terméket. A tisztított terméket szekvenáltattuk M13 promóter primerekkel, és az így nyert aptamer szekvenciákat Clone Manager program Align alkalmazásával összehasonlítottuk.

7.4. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A rekombináns burokfehérjék indukcióját SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. Az indukció előtti és az indukált bakteriális szuszpenziókból 1-1 ml-t eppendorf csőben, 13000 fordulat/percen 1 percig centrifugáltunk szobahőmérsékleten, és a felülúszót eltávolítottuk. A visszamaradó csapadékot 40 µl ultra tiszta víz és 10 µl 5x Laemlli minta puffer keverékében felszuszpendáltuk, majd öt percig inkubáltuk 95 °C-os szárazblokkban. Az így előkészített mintákból 5-5 µl-t használtunk fel az SDS-PAGE-hez (50 µg fehérjetartalom). A bakteriális rendszerben túltermelt burokfehérjék affinitás-tisztítását is SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük, a szonikálás és centrifugálás után nyert centrifugális felülúszóból, az affinitás kromatográfiás gyantára kötött mosás előtti és mosott frakciókból, illetve az elúciókból 5-5 µl-t egyszeres végkoncentrációjú Laemlli minta pufferben öt percig inkubáltuk 95 °C-os szárazblokkban, és a teljes mintatérfogatot felhasználtuk az SDS-PAGE-hez.

Az SDS-PAGE-hez 10%-os, 0,75 mm vastagságú gélt készítettünk, amelynek összetételét a 8. táblázatban tüntettem fel. Az elválasztó gél komponenseit összekevertük, és két, 0,75 mm távolságban rögzített üveglap közé pipettáztuk. A keverékre 100 µl izobutanolt pipettáztunk, hogy az oxigéntől izoláljuk az elválasztó gél felszínét. A gél polimerizációja után, ~45 perc elteltével, desztillált vízzel kimostuk az izobutanolt, beillesztettük a fésűt az üveglapok közé, majd rápipettáztuk a tömörítő gél komponenseiből előállított keveréket. Körülbelül 15 perc múlva, a gél polimerizációját követően a fésűt eltávolítottuk, és desztillált vízzel kiöblítettük a mintafelvitelre előkészített zsebeket. Az elkészített gélt elektroforézishez kialakított futtatókamrába helyeztük, és a kamrát feltöltöttük 1x SDS futtató oldattal. A fehérjéket tartalmazó mintaoldatokat és a festetlen molekulásúly markert (5 µl Unstained Protein Ladder) a zsebekbe pipettáztuk, összeállítottuk a futtatókamrát, és a gélt 20 mA áramerősséggel, 200 V feszültséggel elektroforetizáltuk. A Laemlli minta pufferben található brómfenol-kék festék kifutásakor leállítottuk az elektroforézist, a gélt kiemeltük az

üveglapok közül, és desztillált vizes öblítés után Coomassie festő oldatba helyeztük 5 percre mikrohullámú sütőbe alacsony fokozaton. A gél festése után a háttérről eltávolítottuk a festéket kétszer 5 perc desztillált vizes kezeléssel, mikrohullámú sütőben alacsony fokozaton, így láthatóvá váltak az elektroforézis során elválasztott fehérjék sávjai a gélben.

8. táblázat: 10%-os poliakrilamid gél összetétele SDS-PAGE-hez.

Elválasztó gél (5ml)	1,3 ml 40%-os akrilamid mix
	2,45 ml ultra tiszta víz
	1,3 ml Laemmli elválasztó gél puffer
	50 µl 10%-os ammónium perszulfát
	2 µl TEMED
Tömörítő gél (2ml)	260 µl 40%-os akrilamid mix
	1,44 ml ultra tiszta víz
	280 µl Laemmli tömörítő gél puffer
	20 µl 10%-os ammónium perszulfát
	2 µl TEMED

7.5. Western-blot

1 ml indukált bakteriális sejtszuszpenzióból a fent részletezett módon készítettünk mintaoldatot, amelyből 2 µl-t használtunk fel SDS-PAGE-hez (20 µg fehérjetartalom). 10%-os 1,5 mm-es gélen 30 mA áramerősséggel 200 V feszültséggel elektroforézissel elválasztottuk a mintaoldat és az előre festett molekulásúly marker (5 µl Prestained Protein Ladder) fehérje-komponenseit, majd a gél fel szárítással alkalmazásával nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A fel szárítástól készülő készülékben a következő sorrendet betartva egymásra rétegeztünk két Anód I. pufferbe, egy Anód II. pufferbe áztatott vastag szűrőpapírt, a megnedvesített nitrocellulóz membránt, a gél és végül három Katód pufferbe áztatott vastag szűrőpapírt, ügyelve a buborékmentességre. A rétegek alapterülete megegyező és a gél méretéhez illeszkedő volt. A transzferáláshoz

szükséges áramerősség értéke mA-ben kifejezve 1,2x az alapterület (58 mA), a transzferálás időtartama egy óra volt.

A membránt PBS-ben leöblítettük, és Protein-Free blokkoló pufferben 20 percig inkubáltuk enyhe rázatással. A blokkolást követően 50 pmol biotinilált aptamert 1 ml PBS-ben a membránnal inkubáltunk 90 percig enyhe rázatással, majd háromszor mostuk 10 percig, körülbelül 10 ml 0,2%-os PBS-Tween 20 oldattal intenzív rázatással. A mosást követően 1 ml PBS-ben 2000-szeresre hígított ExtrAvidinnel konjugált HRP oldattal inkubáltuk a membránt egy órán át. Háromszor tíz perc 10 ml 0,2%-os PBS-Tween 20 oldatos és egyszer tíz perc PBS oldatos mosás után 2 ml ECL keverékkel inkubáltuk egy percig a membránt, és a keletkező kemilumineszcens jelet filmen detektáltuk.

7.6. Dot-Blot

Az aptamerek specifikus vírusfelismerő képességét natív, fertőzött és vírusmentes növényi kivonatokkal is teszteltük. Két kísérletet végeztünk, az egyikben a kereskedelmi forgalomban beszerezhető anti-ASPV IgG monoklonális antitest vírusfelismerő képességét vetettük össze a biotinilált aptamerekével. Ekkor 15 µg totál fehérjetartalmú ASPV pozitív és negatív növényi kivonatot cseppentettünk nitrocellulóz membránokra egy-egy pontba. A pontok száradása után Protein-Free blokkoló pufferben 20 percig inkubáltuk a membránokat, majd 1:1000 hígítású, PBS-ben hígított anti-ASPV IgG oldattal vagy 25 pmol/ml biotinilált MT32 vagy biotinilált PSAH aptamert tartalmazó PBS oldattal 90 percen át inkubáltuk a membránokat. Az anti-ASPV IgG-t 1:5000 hígítású, PBS-ben oldott HRP-konjugált anti-egér antitesttel kapcsoltuk, a biotinilált aptamereket pedig PBS-ben 2000-szeresre hígított ExtrAvidinnel konjugált HRP oldattal.

A második dot-blot kísérletben 100 ng totál fehérjetartalmú, kereskedelmi forgalomban kapható ASPV, ACLSV és ApMV pozitív növényi kivonatokot cseppentettünk nitrocellulóz membránra, és a membránokat száradás után 25 pmol/ml biotinilált MT32 vagy PSAH aptamert tartalmazó PBS oldattal 90 percen át inkubáltuk. A kísérletek további lépései megegyeznek a Western-blotnál leírtakkal.

7.7. ELISA és ELONA

Kereskedelmi forgalomban beszerezhető ASPV detektáló készlet segítségével, ASPV pozitív és negatív kontrol növényi kivonatokkal a gyártó protokollja szerint elvégeztük az ELISA kísérletet. A készlet tartalmazta az összes szükséges reagenst (IgG, és konjugált IgG antitestek, pozitív és negatív növényi kivonatok, szubsztrát, puffereket) és mikrotiter tálcát. A nagy kötőképességű 96 cellájú mikrotiter tálcát 50 µl/cella fedő pufferben 1000-szeresre hígított anti-ASPV IgG monoklonális antitesttel inkubáltuk 4 °C-on 5 órán át, majd mostuk. A kísérlet összes mosási lépését háromszor 200 µl/cella mosó puffer alkalmazásával kiviteleztük. A mosási lépések után 50 µl/cella hígítatlan ASPV pozitív és negatív, és a mosó pufferrel kétszer, négyszer, illetve hatszor hígított ASPV pozitív kontroll növényi kivonattal inkubáltuk a mikrotiter tálcát 4 °C-on egy éjszakán át. A mikrotiter tálcát mostuk, majd 50 µl/cella kapcsoló pufferben 1000-szeresre hígított AP-konjugált anti-ASPV IgG-vel inkubáltuk 5 órán át szobahőmérsékleten. Három mosási lépést követően 50 µl/cella szubsztrát oldat (1 mg/ml para-Nitrofenil-Foszfát szubsztrát pufferben oldva) hozzáadása után, egy óra elteltével, 30 °C-on 405 nm-en fotométerrel meghatároztuk az abszorbanciákat.

Az ELISA kísérlettel párhuzamosan elvégeztünk egy ELONA kísérletet is a két módszer érzékenységének összehasonlító vizsgálatára. A kísérlet lépései megegyeztek, kivéve, hogy a konjugált antitest helyett 50 µl/cella 100 pmol biotinilált PSAH aptamert tartalmazó mosó pufferben inkubáltuk a mikrotiter tálcát szobahőmérsékleten 90 percen át, majd három mosási lépést követően mosó pufferben 5000-szeresre hígított AP-konjugált ExtrAvidinnel kapcsoltuk a mikrotiter tálcára kötődött aptamereket. Az ezt követő mosási lépések és a jel detektálása is megegyezett az ELISA-nál leírtakkal és egy időben zajlott, hogy az eredmények összevethetőek legyenek.

7.8. ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel

Az általunk alkalmazott maleimid-aktivált mikrotiter tálca celláit kovalensen módosítottuk 100 µl/cella kötő pufferben hígított 50 pmol tiol-módosított MT32 aptamerrel 150 percen át szobahőmérsékleten. A kötés előtt a tiol-módosított

aptamereket nátrium-borohidriddel kezeltük, hogy redukáljuk az aptamerek között esetleg kialakult diszulfid hidakat. A módosított cellák számától függő körülbelül 5-10 µl térfogatú 100 µM koncentrációjú aptamer oldatokat kiegészítettük kétszer 5 µl 0,1 M nátrium-borohidridet tartalmazó 0,1 M borát pufferrel, és kétszer 5 percig inkubáltuk jégen, majd a pH-t 6 körüli értékre állítottuk 0,1 M HCl és 0,1 M NaOH hozzáadásával, amit indikátor papír alkalmazásával ellenőriztünk. Végül kötő pufferben kihígítottuk az aptamereket a kapcsoláshoz szükséges térfogatra. Az aptamerek kovalens kapcsolása után a mikrotiter tálcát háromszor mostuk 200 µl/cella mosó pufferrel majd a mikrotiter tálcán maradt nem reagált kötőhelyeket 30 percig 150 µl/cella kötő pufferben oldott, 10 mM-os cisztein oldattal blokkoltuk szobahőmérsékleten. Három mosási lépést követően a mikrotiter tálcát 150 µl/cella Protein-Free blokkoló pufferrel inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. Az így előkészített cellákba 100 µl bakteriális totál kivonatot és ugyanezt a kivonatot különböző mennyiségű tisztított PSAH fehérjével kiegészítve adtuk, és egy órán át enyhe rázatással inkubáltuk szobahőmérsékleten (cellánként 50 µg összes fehérjemennyiség). Az oldat eltávolítása után a mikrotiter tálcát háromszor mostuk 200 µl/cella mosó pufferrel, majd 100 µl/cella 50 pmol biotinilált PSAH aptamert tartalmazó mosó pufferrel inkubáltuk egy órán át szobahőmérsékleten. Három mosási lépést követően 100 µl/cella PBS-ben 5000-szeresre hígított AP-konjugált ExtrAvidinnel inkubáltuk a mikrotiter tálcát egy órán át. Végül három mosási lépést követően 100 µl/cella dietanolamin pufferben oldott 1 mg/ml paranitrofenil-foszfát (pNPP) szubsztrát oldattal inkubáltuk a mikrotiter tálcát, és a színváltozást abszorbancia méréssel detektáltuk egy óra elteltével 30 °C-on 405 nm-en.

7.9. ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel

A vírus partikulumok detektálására fertőzött növényi kivonatokból NucleoLink plate mikrotiter tálcát alkalmaztunk, amelynek aktivált felületére 10 pmol/cella 5' foszfátcsoport és TTTT összekötő módosítással szintetizált MT32 aptamert kovalensen kapcsolunk. A kapcsolást a foszfátcsoporton keresztül kivitelezjük, 100 µl/cella 100 mM 1-MELM-ben oldott 10 mM EDC és 10 pmol/cella módosított aptamer oldatával 50 °C-os inkubátorban egy éjszakán át. A kapcsolat után a mikrotiter tálcán

maradt szabad kötőhelyeket inaktiváltuk. A cellákat 200 µl/cella 50 °C-os 0,25% Tween 20-at tartalmazó, 0,4 M NaOH oldattal mostuk háromszor, majd ugyanezzel az oldattal 15 percen át inkubáltuk, és újra mostuk háromszor. A NaOH eltávolítására ultra tiszta vízzel mostuk háromszor, 5 percig inkubáltuk, majd újra mostuk háromszor a mikrotiter tálcát 200 µl/cella térfogattal. Ezután 150 µl/cella 0,1 µg/ml dIdC-t tartalmazó 5%-os BSA oldattal blokkoltuk a mikrotiter tálcát 30 percen át szobahőmérsékleten. A blokkolás után a cellákba 100 µl, 10 µg totál fehérje tartalmú vírusmentes és ASPV, ACLSV vagy ApMV-fertőzött vírusos növényi kivonatokat pipettáztunk, és 30 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A kivonatok eltávolítása után háromszor mostuk a mikrotiter tálcát 200 µl 0,2%-os PBS-Tween 20 oldattal, majd 100 µl, 10 pmol/cella biotinilált MT32 aptamert tartalmazó PBS oldatot adtunk a cellákhoz 30 percre szobahőmérsékleten. A nem kötődött aptamerek eltávolítására három mosási lépést alkalmaztunk 200 µl/cella 0,2%-os PBS-Tween 20 oldattal, majd 100 µl PBS-ben 5000-szeresre hígított AP-konjugált ExtrAvidin oldatot adtunk a mikrotiter tálca celláiba, és egy órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A detektáláshoz három mosási lépést követően 100 µl/cella, 1 mg/ml dietanolamin pufferben oldott pNPP szubsztrátot adtunk, majd 15 percig inkubáltuk 30 °C-on, és 405 nm-en fotometriás méréssel meghatároztuk az abszorbanciákat.

A vírusmentes növényi kivonatot almalevélből állítottuk elő. A leveleket folyékony nitrogénben dörzsmozsárban elporítottuk, és PBS-0,05% Tween 20 oldatban felfuszpendáltuk. Az így nyert szuszpenziót 20 percig centrifugáltuk 4 °C-on 13000 fordulat/perc sebességgel. A centrifugális felülúszó protein koncentrációját Bradford reagenssel meghatároztuk, majd a fehérje koncentrációt PBS-sel a vírusfertőzött kivonatokéval megegyezőre állítottuk be.

8. Eredmények

8.1. A szelekció során alkalmazott burokfehérjék bemutatása és összehasonlító analízise

A vírus burokfehérjék detektálása a növényi vírusfertőzések kimutatására alkalmas módszer (281). Az ASPV vírus felületét beborító burokfehérje több ezer kópiában van jelen egy vírus részecskén, így több aptamer kötődését teszi lehetővé egy részecskéhez, és a célmolekula a vírus natív állapotában is hozzáférhető.

Két ASPV-izolátum burokfehérjéinek, az MT32 és PSA-H aminosav szekvenciáit összehasonlító analízisnek vetettük alá, amely kimutatta, hogy a két fehérje közel 81%-ban azonos és a legnagyobb különbség, hogy a PSA-H fehérje körülbelül 20 aminosavval többet tartalmaz, mint az MT32 (9. ábra).

MT32,	1	MTSNGSQPQSSAPMVSVVEEPA---VSAPNPSVNSAPVSAPIV
PSA-H,	1	MTSNGSQPQASTPMVSAEPPAAAASVPNSTPMVSAEGPAAAASVAPNSSVSSAPASAPTA
		***** * ***** ***** **
MT32,	43	SEPVISQVQSVAPIVSGFDPNLHGRLTNEQMRQ&QEEAARRGYEEGSRPNQRILPNTGAY
PSA-H,	61	SEPVISQVQSLAPIVSGFDPNLHGRLTNEQMRQ&QNEAAMQGYEEGSRPNRPLPSSTTAH
		***** ***** ** ***** * * *
MT32,	103	NNYASMNSNPFETGTAYSEAPRMNMGYPYISSGYEGTSEPSAQRIFPVQHGVSPPSHDAN
PSA-H,	121	NDYASMNSNPFETGTAYGGAPRVSFSGSYPTFPGSGSASEPNSQRIFPQHGWNPSAHASD
		* ***** ** * ** * ** ***** ** * *
MT32,	163	LVSQQVTVGGNSGSPFTLGNR&PRNATSNIGMRRRLDSMSLENIRYEPQ&GVVASNQKI
PSA-H,	181	LVPHQATS&GGNTGTPFTLGNR&PRNATANTGGMRRRLDSVGLKNIRYEPQ&GVVASNQKI
		** * * * * ***** * ***** *
MT32,	223	RAIGVALIGMGIPEHQLTEGVYRARHCADVGASDKSTVLGTFPGSDITLEEVGTMVKQT
PSA-H,	241	RAVGVALIGMGIPEHQLTEGVYLRHCADVGASDESALLGTFPGSDITLEEVGTMVKQT
		** ***** * ***** **
MT32,	283	EGCTLRQYCAFYAKHVWNLMLQTSPPANWVGKEFKFETRYAAFDFFGVESTASLEPAD
PSA-H,	301	EGCTLRQYCAFYAKHVWNLMLQTSPPANWVGKEFKFETRYAAFDFFGVESTASLEPAD

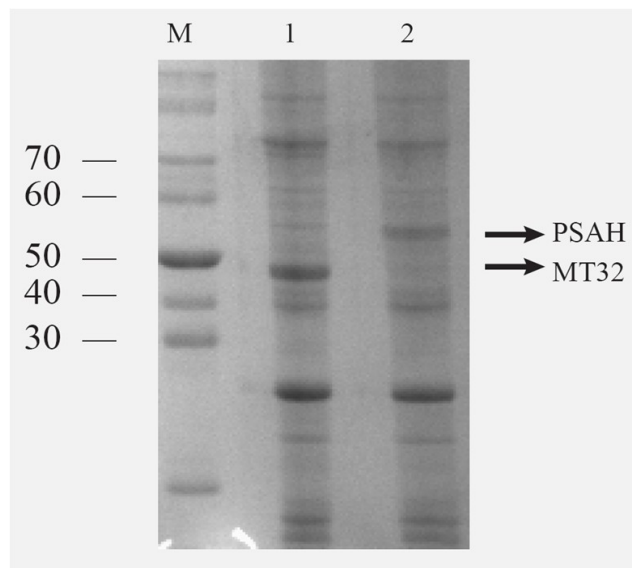
MT32,	343	GLIRLPTQ&ERVANATSKEIQMYRIRSMEGTQ&VNFGEVTGGKIGPKPVLSIRK
PSA-H,	361	GLIRLPTQ&ERVANATSKEIQMYRIRSMEGTQ&VNFGEVTGGKIGPKPVLSIRK

9. ábra: Az ASPV-izolátumok (MT32és PSA-H) burokfehérjéinek összehasonlító analízise az aminosav szekvenciák feltüntetésével. A kiemelés az azonos aminosavakat jelöli a szekvenciákban.

8.2. ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszer alkalmazásával

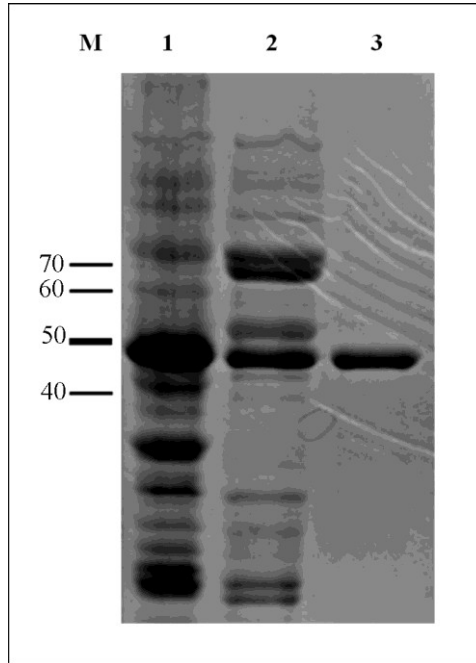
Az általunk alkalmazott aptamer szelekciós eljáráshoz nagy tisztaságú, gyantán immobilizált célfehérjére van szükség, amit bakteriális fehérjetúltermelő rendszerrel biztosítottunk. A rendelkezésünkre bocsátott pDEST17::MT32 és pDEST17::PSA-H vektor-konstrukciókkal BL21(DE3)pLysS kompetens baktériumokat transzformáltunk.

A transzformált BL21(DE3)pLysS bakteriális sejtek indukcióját optimalizálnunk kellett. A megfelelő IPTG koncentráció, indukciós hőmérséklet és időtartam meghatározása után előállítottuk a rekombináns burokfehérjéket (10. ábra), amelyeket HisBind affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával tisztítottunk. A gyantához kötött fehérjék tisztaságáról 0,5 M nátrium-kloridot és növekvő koncentrációjú imidazol tartalmazó oldatokkal, egyre intenzívebb mosási lépésekkel gondoskodtunk. Meghatároztuk a mosó puffer maximális imidazol koncentrációját (150 mM), amely hatékonyan távolítja el a szennyező fehérjéket, de még nem okoz jelentős veszteséget a burokfehérje kitermelésben. A fehérjék expresszióját és a tisztítási lépéseket 10%-os SDS-PAGE alkalmazásával és Coomassie festéssel ellenőriztük (11. ábra, 12. ábra).



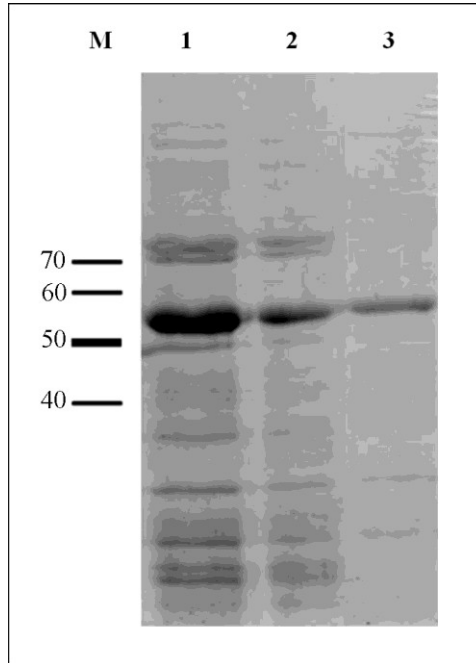
10. ábra: Túltermelt burokfehérjék kimutatása SDS-PAGE módszerrel.

Unstained Protein Ladder molekulásúly marker (kDa) (M), MT32-t (1) és PSAH-t (2) túltermelő, SDS-Laemmli mintapufferben előkészített, 50 µg fehérjetartalmú denaturált bakteriális totál fehérjekivonat, Coomassie festéssel vizualizálva. A megfelelő magasságban nyilakkal is jelzett intenzívebb sávok a túltermelt burokfehérjéket jelzik a gélen.



11. ábra: MT32 burokfehérje tisztítása His-Bind affinitás kromatográfias gyanta alkalmazásával.

Az SDS-Laemmli mintapufferben előkészített, 50 µg fehérjetartalmú denaturált bakteriális fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE alkalmazásával választottuk el, és Coomassie festéssel vizualizáltuk. Unstained Protein Ladder molekulásúly markernek megfelelő referencia pontok (kDa) (M), Szonikálással feltárt MT32 fehérjét túltermelő bakteriális kivonat centrifugális felülúszó (1), MT32 burokfehérjét túltermelő bakteriális fehérjekivonat affinitás kromatográfias gyantához kötve, a mosást megelőzően (2), Affinitás kromatográfias gyantához kötött fehérjék 3×150 mM imidazol-PBS mosás után (3). A mosási lépések hatására az affinitás kromatográfias gyantához nem specifikusan kötődött fehérjék eluálódnak, és a tiszta burokfehérje a megfelelő magasságban egy sávot szolgáltatva jelenik meg a gélen.



12. ábra: PSA-H burokkfehérje tisztítása His-Bind affinitás kromatográfias gyanta alkalmazásával.

Az SDS-Laemmli mintapufferben előkészített, 50 µg fehérjetartalmú denaturált bakteriális fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE alkalmazásával választottuk el, és Coomassie festéssel vizualizáltuk. Unstained Protein Ladder molekulásúly markernek megfelelő referencia pontok (kDa) (M), PSA-H burokkfehérjét túltermelő bakteriális fehérjekivonat affinitás kromatográfias gyantához kötve, a mosást megelőzően (1), Affinitás kromatográfias gyantához kötött fehérjék 3×100 mM imidazol-PBS mosás után (2), Affinitás kromatográfias gyantához kötött fehérjék 3×150 mM imidazol-PBS mosás után (3). A mosási lépések hatására az affinitás kromatográfias gyantához nem specifikusan kötődött fehérjék nagyrészt eluálódnak, és a tiszta burokkfehérje a megfelelő magasságban egy sávot szolgáltatva jelenik meg a gélen.

8.3. Burokkfehérje-specifikus aptamerek szelekciója

Az aptamereket, néhány kisebb változtatástól eltekintve, egy korábban publikált SELEX protokoll alapján szelektáltuk (33). A bakteriális fehérje túltermeléssel előállított, és tisztított 6×His jelölő címkével ellátott burokkfehérjéket Ni-NTA HisBind agaróz affinitás kromatográfias gyanta felületére kötöttük. A gyantán immobilizált burokkfehérjét a random oligonukleotid könyvtárral inkubáltuk, amely $\sim 10^{14}$ -féle DNS szekvenciát tartalmazott. 15 szelekciós és három kontraszelekciós ciklust követően 20-20 vírus burokkfehérje-specifikus egyszálú DNS szekvenciát határoztunk meg klónozás és szekvenálás segítségével. Az aptamer szelekció eredményeként nyert szekvenciák

variábilis szakaszait összehasonlító analízisnek vetettük alá, amelyhez a Clone Manager programot alkalmaztuk (13. ábra). Egyes szekvenciák többször is előfordultak, ezek közül mindkét fehérje esetében a leggyakrabban előfordulót választottuk ki és szintetizáltattuk nagyobb mennyiségben a további kísérleteinkhez.

```

MT32 1-10      -----gggggtgggtgggttcctttttgtgggtattgggtggtggggggca-----
MT32 18-19    caggaatgcgtaagggtttgggtggttgggt-tggttatgctatg-----
MT32 20       -----tgagggtttgggttttgggt-tggtcag-ggatggaaggctgttc
MT32 21       ---gcgatcgtgagggtttgggtattgggt-tggtcag-ggctcgcgg-----
MT32 15-17    -----ccaagggtttgggtggttgggt-tggttggtgggtgtgcagctgc--
MT32 11-14    -----cccggatgggtttgggtc-tgggt-tggaggaggggggggtattgt----

PSAH 20       ---acgtatcaagggttt-ggtattgggttggtt-gtagcgtggttg-----
PSAH 21       ---gcca----agggttt-ggtattgggttggttggtggggag--gggttat----
PSAH 19       -----cttgagggttt-ggtggttgggttggt--caaggag--g--ttgctgca
PSAH 18       --gggccctggagggttt-ggtggttgggttggt--gcagg--g--g--taagt---
PSAH 14-15    gtggcccaaagagggttt-ggtggttgggttggt--gtttg--t--g--tcc-----
PSAH 16-17    -----gcggtaagggttt-ggttttgggttggt--tatcgca--ggtttaa----
PSAH 1-9      -----agcaagggttt-ggtggttgggttggttgctggtttt--ggttggc----
PSAH 10-13    -----tgggctagggtgtcgggggtgggtggtgggttgtgtcttga-----

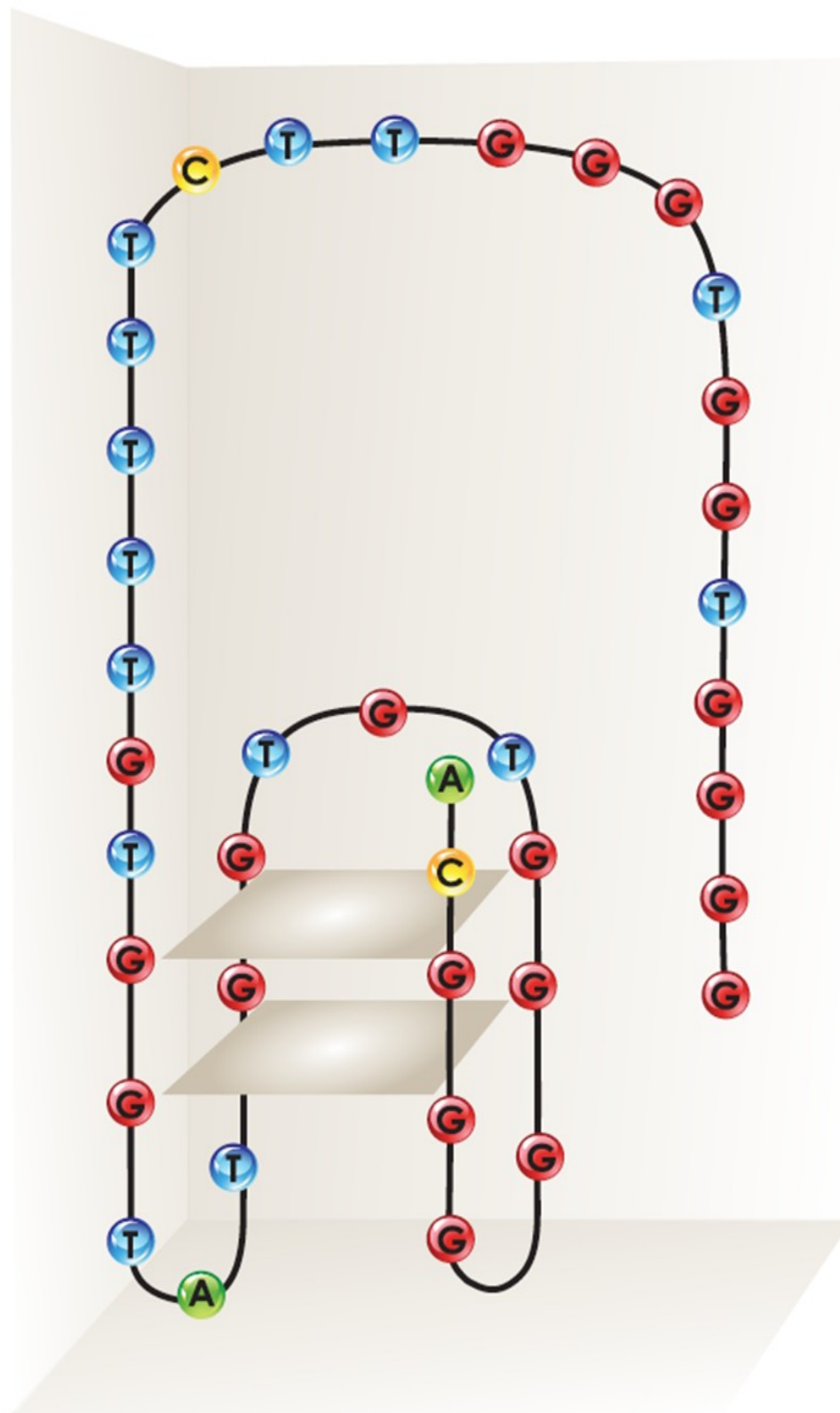
```

13. ábra: 20-20 MT32-, és PSAH-specifikus szekvencia összehasonlító analízise.

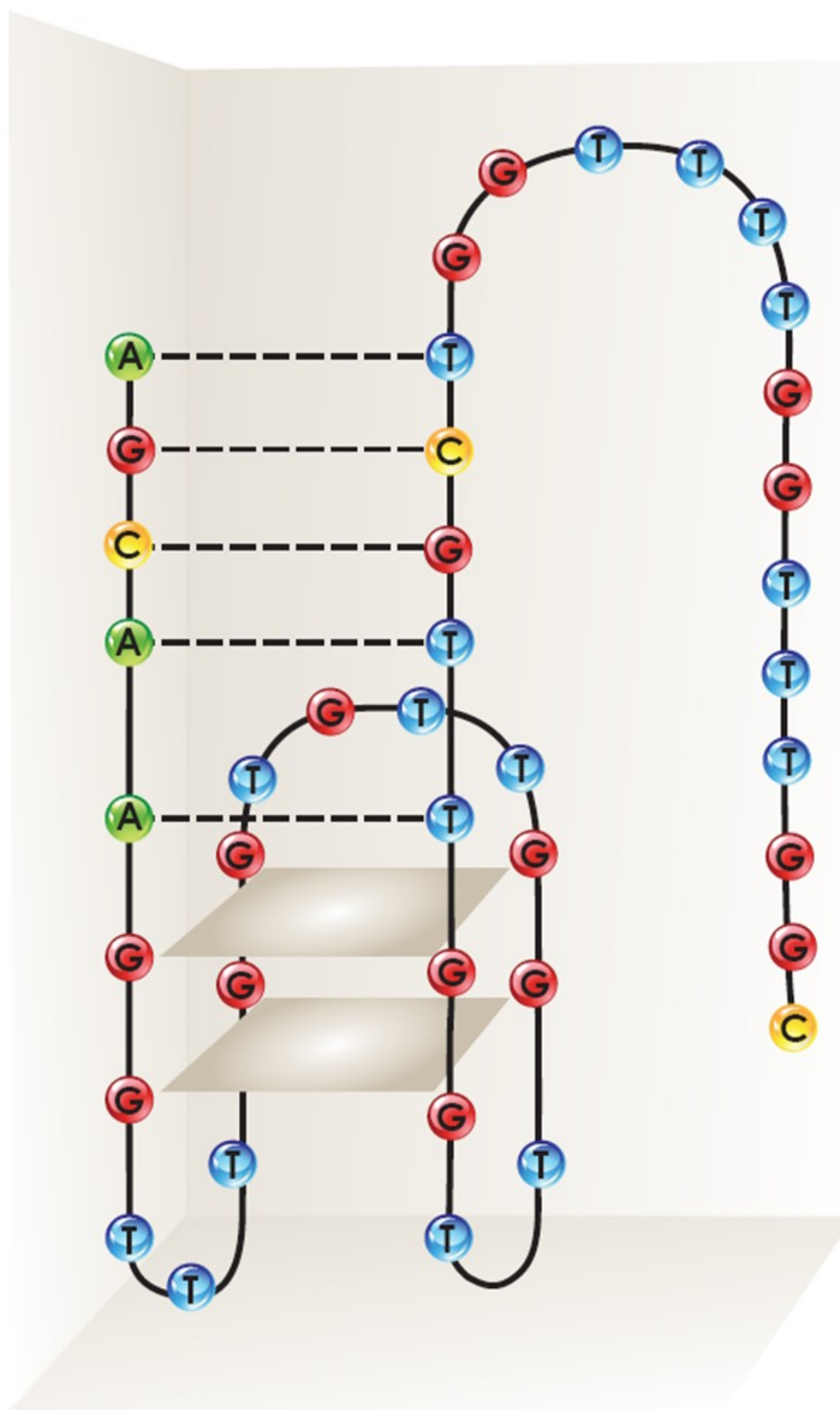
A vörössel jelölt betűk a QGRS Mapper programmal jószolt G-quadruplex szerkezetet kialakító szekvenciákat jelölik, a sötétszürke kiemelés a szekvenciák közötti szignifikáns homológiát jelöli.

8.4. A burokfehérje-kötő aptamerek prediktív másodlagos szerkezete

A QGRS Mapper interneten elérhető program alkalmazásával megvizsgáltuk, a G-quadruplexek előfordulásának lehetőségét a szekvenciákban (159). Minden aptameren belül több ilyen szakaszt találtunk, a legvalószínűbb G-quadruplexet kialakító szakaszokat vörös színnel jelöltük az ábrán (13. ábra). A burokfehérjére specifikus aptamer szekvenciák közül kiválasztottuk a leggyakrabban előfordulókat, és grafikusán is ábrázoltuk a prediktív másodlagos szerkezetüket (14. ábra, 15. ábra).



14. ábra: Az MT32 aptamer prediktív másodlagos szerkezete a nukleotidok feltüntetésével.
A szürke négyzetek a G-kvartetteket jelölik.



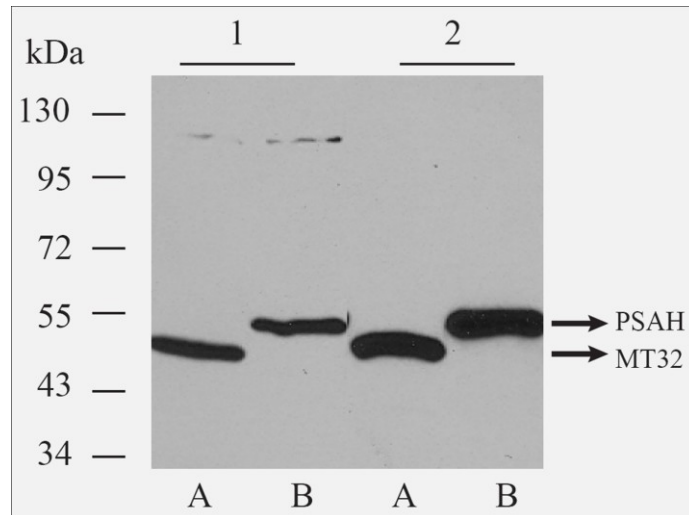
15. ábra: A PSA-H aptamer prediktív másodlagos szerkezete a nukleotidok feltüntetésével. A szürke négyzetek a G-kvartetteket, a szaggatott vonalak pedig a Watson-Crick bázispárokat jelölik.

8.5. Az aptamerek kötőképességének jellemzése felületi plazmon rezonancia (SPR) alkalmazásával

A szelektált szekvenciák közül a két leggyakrabban előfordulót SPR analízisnek vetettük alá, hogy meghatározzuk a célmolekula kötő képességüket. Az oligonukleotidok variábilis szakaszát a 3'-végen HS-(CH₂)₆-TTTT összekötő szakasszal szintetizáltattuk, és közvetlenül egy arany chip felületén immobilizáltuk (282). Az aptamerek és a tisztított burokfehérjék közötti affinitást felületi plazmon rezonanciával (SPR) határoztuk meg (283). Az aptamer-fehérje komplexek disszociációs állandóit (K_d) az SPR-görbék kinetikai analízisével számítottuk ki. A PSA-H aptamer disszociációs konstansának értéke két nagyságrenddel alacsonyabb volt a PSA-H fehérjével ($K_d=8,0 \times 10^{-9}$ M), mint az MT32-vel ($K_d=2,9 \times 10^{-7}$ M). Ezzel ellentétben az MT32 aptamer esetében csupán kis eltérést tapasztaltunk a két fehérje K_d értékében, így az MT32 fehérjével $K_d=5,5 \times 10^{-8}$ M, a PSA-H fehérjével pedig $K_d=8,3 \times 10^{-8}$ M értékeket határoztunk meg.

8.6. Western-blot analízis

A szelektált aptamerek specifikusságának vizsgálatára Western-blot analízist végeztünk a túltermelt burokfehérjéket tartalmazó bakteriális totál fehérjekivonatok alkalmazásával. A fehérjéket 10%-os SDS-PAGE-sel választottuk el, majd az általunk optimalizált protokoll szerint nitrocellulóz membránra blottoltuk, Protein Free blokkoló oldattal kezeltük, és biotin-jelölt burokfehérje-specifikus aptamerekkel inkubáltuk. Az aptamerek kötődését ExtrAvidin-HRP kapcsolása után HRP-katalizált ECL reakcióval detektáltuk. Az aptamerek specifikusan csak a denaturált burokfehérjékhez kötődtek (16. ábra).

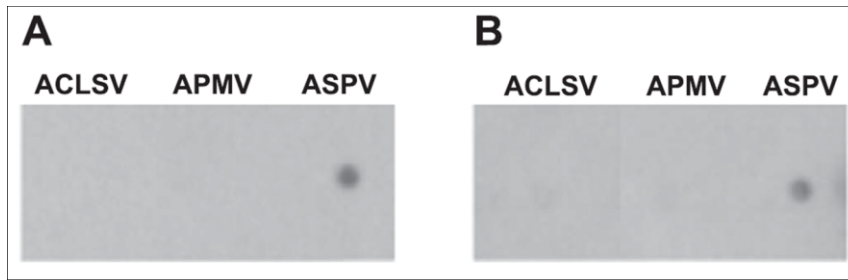


16. ábra: Az aptamerek specificitásának igazolása Western-blot analízissel.

20-20 $\mu\text{g/sáv}$ MT32 (A) és PSA-H (B) vírus burokfehérjét túlermelő totál *E. coli* fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE segítségével elválasztottunk, és nitrocellulóz membránra blottoltunk. A detektálást biotinilált MT32 (1) és PSA-H (2) aptamerekkel, ExtrAvidin-HRP kapcsolásával és ECL reakcióval végeztük. A denaturált totál bakteriális fehérjekivonatokból az aptamerek specifikusan csak a burokfehérjékhez kötődtek. A nyilak a megfelelő magasságban jelzik a burokfehérjéket.

8.7. Dot-blot analízis

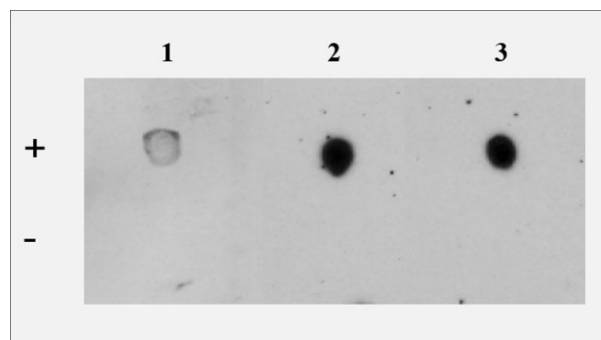
Az aptamerek specificitását natív vírusokkal is vizsgáltuk, melynek során dot-blot analízist végeztünk vírus fertőzött növények fehérjekivonataival. Kereskedelmi forgalomban beszerezhető Apple Mosaic Virus (ApMV), Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) és Apple Stem Pitting Virus (ASPV) pozitív növényi kivonatokat cseppentettünk nitrocellulóz membránra, és a detektálást a Western-blot kísérletnél leírtak szerint kiviteleztük. A natív vírusfehérjéket tartalmazó membránon jól láthatóan kimutattuk az ASPV-t mindkét aptamer segítségével, míg nem kaptunk jelet az ACLSV-t és ApMV-t tartalmazó pontokban (17. ábra).



17. ábra: Az aptamerek Dot-blot analízise ACLSV-, APMV- és ASPV-fertőzött növényi kivonatokkal.

100 ng fehérjét tartalmazó natív, vírusfertőzött növényi fehérjekivonatokat nitrocellulóz membránra cseppentettünk, majd biotin-jelölt, MT32 (A) és PSA-H (B) specifikus aptamerekkel inkubáltunk. A detektálást ExtrAvidin-HRP kapcsolásával, és ECL reakcióval végeztük.

A szelektált aptamereink és a kereskedelmi forgalomban elérhető anti-ASPV IgG antitest alkalmazhatóságát dot-blot analízissel vetettük össze. Specifikusságuk összehasonlítására natív ASPV-fertőzött és negatív kontroll növényi kivonatokot cseppentettünk nitrocellulóz membránra, és biotin-jelölt aptamerekkel vagy monoklonális anti-ASPV IgG antitesttel inkubáltuk. A detektálást HRP-konjugált anti-egér antitest, illetve ExtrAvidin-HRP kapcsolásával és ECL reakcióval végeztük. Az eredmények alapján az aptamerek körülbelül tízszer intenzívebb jelet szolgáltatottak és specifikusan csak az ASPV-t tartalmazó növényi kivonathoz kötődtek (18. ábra).



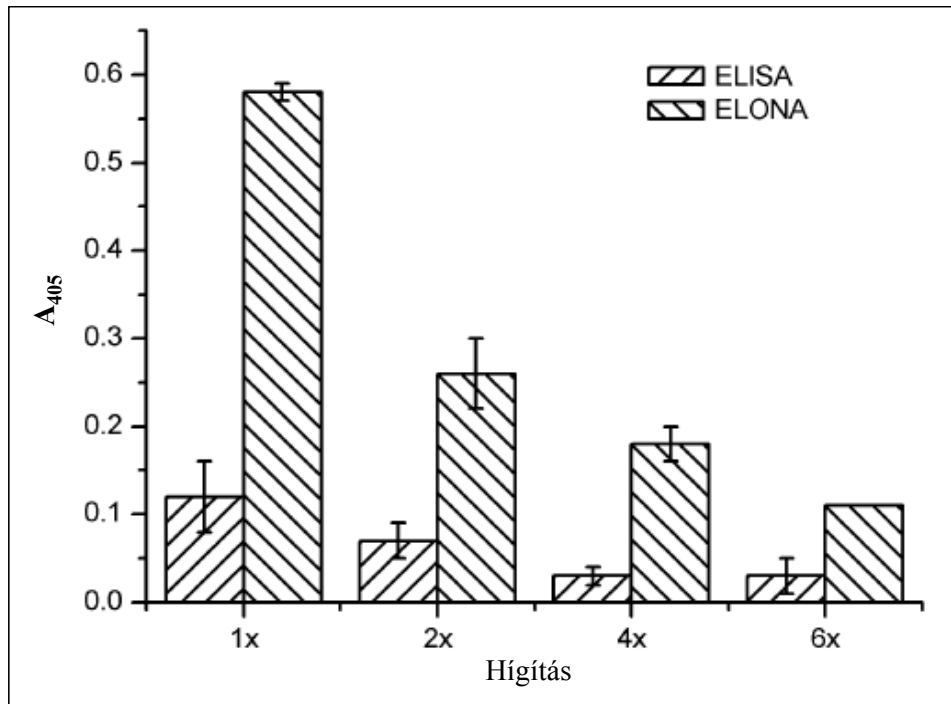
18. ábra: Az aptamerek és az anti-ASPV IgG összehasonlító vizsgálata dot-blot analízissel.

15 µg/pont vírusfertőzött (+) és negatív kontroll (-) növényekből származó fehérjekivonatokot nitrocellulóz membránra cseppentettük, majd a membránt az antitesttel (1), illetve MT32 (2) és PSA-H (3) biotin-jelölt aptamerrel inkubáltuk. A detektálást HRP-konjugált anti-egér antitest, illetve ExtrAvidin-HRP kapcsolásával és ECL reakcióval végeztük. Az aptamerek jóval intenzívebb jelet szolgáltatottak az anti-ASPV IgG-nél és nem kötődtek a kontroll kivonatokhoz.

8.8. ASPV kimutatása ELISA és ELONA módszerrel

Az aptamerek specifitásának igazolását követően két olyan kísérletet végeztünk el párhuzamosan, melyekkel azt kívántuk vizsgálni, hogy aptamereink mennyiben alkalmazhatóak az ELISA alapú vírusdiagnosztikában. A kereskedelmi forgalomban kapható, ASPV detektálásra kifejlesztett készlet komponenseit felhasználva elvégeztünk egy dupla ellenanyag, más néven szendvics ELISA meghatározást, melynek első lépéseként az anti-ASPV IgG-t mikrotiter tálcán immobilizáltuk. Az ellenanyag burkolt tálca celláit ASPV-fertőzött növényi fehérjekivonatok különböző hígításaival (1x, 2x, 4x, 6x), illetve negatív kontroll kivonattal, majd AP-konjugált anti-ASPV IgG antitesttel inkubáltuk. Az ELONA meghatározásnál az ELISA-nál leírtaknak megfelelően jártunk el, de a felismerő, AP-konjugált antitestet biotinizált PSA-H aptamerrel helyettesítettük. Az ELONA eljárás során a kötődő aptamerek detektálására egy plusz ExtrAvidin-AP-val történő inkubációs lépést iktattunk be. A kétféle módon előkészített tálcán azonos paraméterekkel, pNPP szubsztrát hozzáadásával és fotometriával határoztuk meg a kapcsolódott AP mennyiségét (19. ábra). Az ábrán feltüntetett értékeket három mérés eredményeinek átlagából, a háttér értékével korrigálva mutattuk be. A háttér a negatív növényi kivonattal háromszor mért abszorbancia értékek átlaga, ELISA esetében értéke 0,07 és ELONA esetében 0,177.

A két kísérlet eredményei alapján az ELONA érzékenyebb módszernek bizonyult, minden hígítás esetén intenzívebb jelet szolgáltatott a megfelelő ELISA-val mért értékekhez képest. Így a hatszoros hígításban mért érték is a mérési tartományba esett, míg az ELISA módszerrel már nem lehetett különbséget tenni a négyszeres és hatszoros hígításnál mért értékek között.

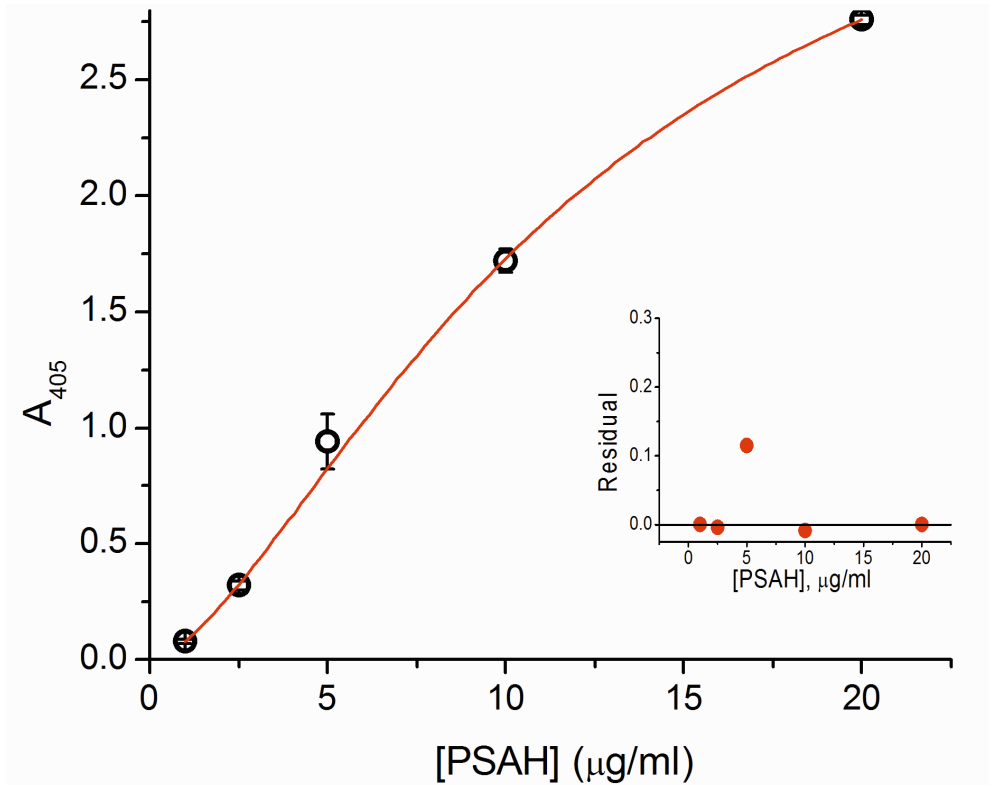


19. ábra: ASPV detektálása ELISA és ELONA módszer alkalmazásával. Az anti-ASPV IgG antitestet mikrotiter tálcán immobilizáltuk, majd az ASPV-pozitív növényi kivonat különböző hígításaival, illetve negatív kontroll kivonattal inkubáltuk. A detektálást AP-konjugált anti-ASPV IgG vagy biotinizált PSA-H aptamer és Extravidin-AP kapcsolásával, és pNPP szubsztrát hozzáadásával végeztük. A grafikonon három mérés átlagait ábrázoltam a háttér értékekkel korrigálva. Az ELONA minden pontban magasabb abszorbancia értékeket szolgáltatott, mint a megfelelő ELISA-val mért értékek.

8.9. ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel

A sikeres ellenanyag-aptamer kombinációs ELONA eljárást követően azt vizsgáltuk, hogy szelektív aptamereink alkalmasak-e a vírus burokfehérje ellenanyag használata nélküli detektálására. Az 5'-végen tiol módosítással szintetizált MT32 aptamert maleimid-aktivált mikrotiter tálcán immobilizáltuk, majd Protein Free blokkoló oldattal blokkoltuk a cellákat. Az így előkészített cellákat különböző mennyiségű tisztított PSA-H fehérjét tartalmazó bakteriális totál fehérjekivonattal inkubáltuk, és a mosási lépések elvégzése után biotinizált PSA-H aptamert tartalmazó oldattal inkubáltuk. A detektálást ExtrAvidin-AP és pNPP szubsztrát oldat hozzáadásával végeztük. A mért értékekre sztenderd negyedfokú logisztikus egyenletet illesztettünk ($R^2=0,999$) (20. ábra).

A kísérlet eredménye alapján a PSA-H fehérje tisztán aptamer alapú detektálása is megoldható, antitest alkalmazása nélkül. Az alkalikus foszfatázzal katalizált reakció akár 100 ng PSA-H protein kimutatására alkalmas mérhető jelet szolgáltatott komplex bakteriális mátrixból.



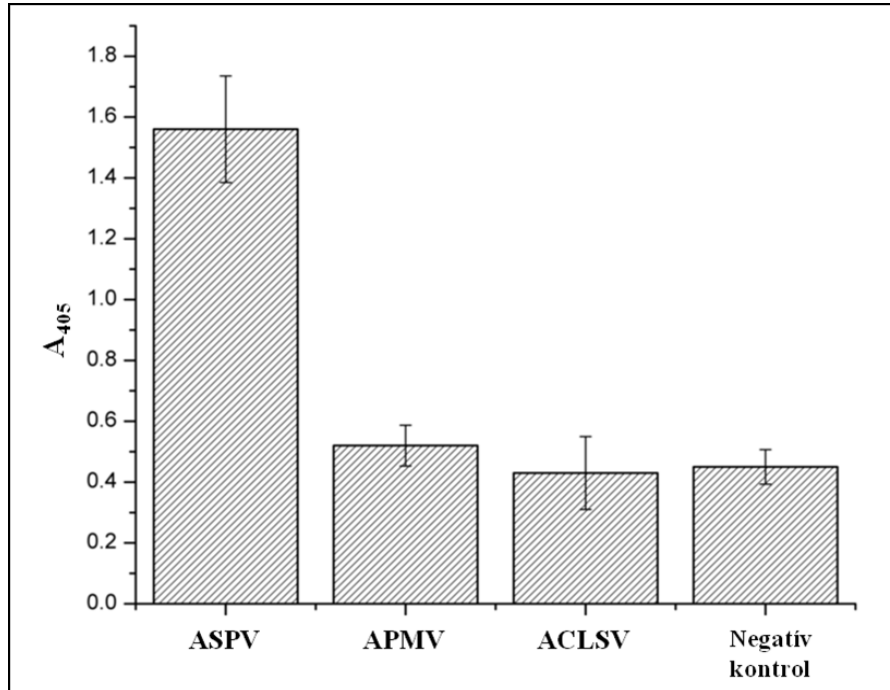
20. ábra: PSA-H burokfehérje koncentráció meghatározása DOS-ELONA módszerrel.

A tiol-módosított MT32 aptamert maleimid-aktivált mirotiter tálcán immobilizáltuk, majd különböző mennyiségű PSA-H fehérjét tartalmazó bakteriális kivonattal inkubáltuk. Az összes fehérjemennyiség értéke 50 µg/cella volt. A megkötött burokfehérjéket biotinizált PSA-H aptamer és ExtrAvidin-AP kapcsolásával, pNPP szubsztráttal detektáltuk. Az abszorbancia értékek három mérés eredményének átlagai, a háttér értékével (50 µg fehérjetartalmú bakteriális kivonat: $A_{405}=0,103$) korrigálva. A görbe illesztése négyparaméteres logisztikus modell alkalmazásával történt. Az aptamerekkel létrehozott szendvics típusú meghatározás alkalmas a PSA-H burokfehérje kimutatására komplex bakteriális mátrixból.

8.10. ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel

Miután igazoltuk, hogy a DOS-ELONA módszer alkalmas a vírus burokfehérje mérésére, az ASPV vírus partikulumok detektálására is kidolgoztunk egy eljárást. Az immobilizáláshoz és detektáláshoz egyféle aptamer, az MT32 foszforilált és biotinizált formáját alkalmaztuk. A foszforilált és 5 timidin összekötővel ellátott MT32 aptamert kovalensen kapcsoltuk az aktivált NucleoLink mikrotiter tálca felületére. A szabad kötőhelyek inaktiválása után dIdC-t tartalmazó BSA oldattal blokkoltuk, majd 10 µg fehérjetartalmú vírusmentes és ASPV-, ACLSV- vagy ApMV-fertőzött növényi fehérjekivonatokkal inkubáltuk a cellákat. A detektálás biotin-jelölt MT32 aptamer és ExtrAvidin-AP konjugátum kapcsolásával, pNPP szubsztrát hozzáadásával történt. A fotometrálassal mért jelintenzitás az ASPV-fertőzött kivonat esetében körülbelül háromszor nagyobb volt, mint az ApMV, ACLSV és a negatív kontroll esetében mért értékek (21. ábra).

A kísérlet eredménye alapján a DOS-ELONA specifikusan kimutatja az ASPV-fertőzött kivonatot, és alkalmas teljes vírusrészecskék megkötésére komplex növényi mátrixból.



21. ábra: Vírusdetektálás DOS-ELONA módszerrel növényi kivonatokból.

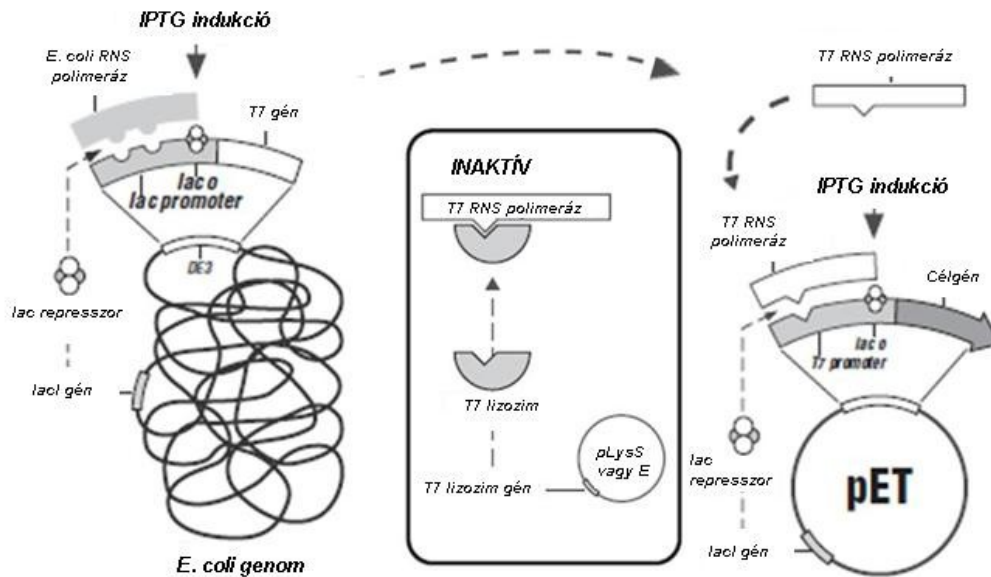
A foszforilált MT32 aptamert mikrotiter-tálca felületén immobilizáltuk, majd 10 µg fehérjét tartalmazó negatív kontroll, ASPV-, APMV- vagy ACLSV-fertőzött növényi kivonattal inkubáltuk. A megkötött vírus részecskéket biotinilált MT32 aptamerrel, ExtrAvidin-AP kapcsolásával és pNPP szubsztráttal detektáltuk. A feltüntetett értékek négy mérés eredményeinek átlagai. A mért jelintenzitás az ASPV-fertőzött kivonat esetében körülbelül háromszor nagyobb, mint az APMV, ACLSV és a negatív kontroll esetében mért értékek.

9. Megbeszélés

9.1. ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszerben

A burokfehérjék kódoló szekvenciáit pDEST17 expressziós vektorba klónozva bocsátották rendelkezésünkre. A pDEST17 vektor T7 promotert, riboszóma kötő helyet, N-terminális 6×His jelölő címkét és ampicillin rezisztencia gént kódol és fogadóvektornak alkalmas a rekombináns Gateway klónozási eljárásban. A vektor alkalmas bakteriális fehérje túltermelésre és in vitro transzkripcióra is.

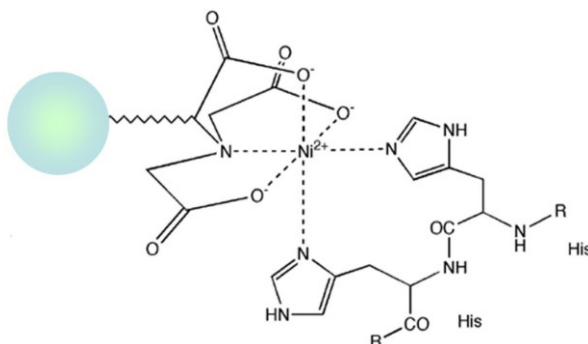
A vektor konstrukciókkal transzformált BL21(DE3)pLysS nagy hatékonyságú fehérje túltermelésre alkalmas törzs, amely lehetővé teszi bármely a T7 promoterral és riboszóma kötőhellyel rendelkező gén expresszióját. A törzs lizogén a λ -DE3 fágra, amely a T7 RNS polimerázt kódoló bakteriofág T7 I gént tartalmazza, amelyet a baktériumtörzsben a *lac* UV5 promoter szabályozása alá helyeztek. A törzs hordozza a pLysS plazmidot is, amely a T7 lizozim gént kódolja. A T7 lizozim csökkenti a T7 promoter szabályozása alatt álló célgén háttér expresszióját, de nem befolyásolja az IPTG-indukcióval kiváltott expressziós szintet (22. ábra).



22. ábra: BL21(DE3)pLysS bakteriális fehérje túltermelő rendszer sematikus ábrája.

A burokfehérjék túltermelését BL21(DE3)pLysS IPTG-indukálható bakteriális rendszerben hajtottuk végre, amelynek körülményeit optimalizálnunk kellett. Az indukció előtt szükséges a megfelelő mennyiségű fehérje termeléséhez elegendő sejtszám előállítása, amelyet denzitometriás méréssel határoztunk meg. A szuszpenziót 37 °C-on inkubáltuk, amíg el nem érte az $OD_{600}=0,5$ értéket, de nem haladta meg az $OD_{600}=1$ értéket. Megfigyeléseink alapján a túl gyors indukció következményeként a termelődött burokfehérjék hajlamosak oldhatatlan zárványtesteket képezni, amelyekből csak rossz hatásfokkal nyerhetők vissza. Az indukció során alkalmazott alacsonyabb hőmérséklettel (30 °C) és az IPTG koncentrációjának csökkentésével (0,4 mM) elkerültük a zárványtest képződést. Az optimalizált indukciós körülményeket betartva a burokfehérjék nagy része natív, oldott állapotban a felülúszóban maradt a sejtek feltárását és centrifugálását követően. Az expresszált rekombináns burokfehérjéket ezután a 6×His jelölő címkén keresztül nikkelion-aktivált affinitás kromatográfiás gyantához kötöttük (23. ábra). A feltáró és mosó pufferekhez növekvő koncentrációban adott imidazol a 6×His jelölő címkéhez hasonlóan a Ni-ion aktivált gyantához kötődik, így megakadályozza a fehérjék nem specifikus adszorpcióját, és ezáltal csökkenti a

hátteret. Mindezek figyelembevételével növekvő imidazol koncentrációval kivitelezttük a túlermelt fehérjét kötő, affinitás kromatográfiás ágy mosását, minek eredményeként nagy tisztaságú MT-32 és PSA-H fehérjét állítottunk elő.



23. ábra: 6×His jelölő címke kötődése Ni-NTA agaróz affinitáskromatográfiás gyantára.
Az NTA ágyon immobilizált Ni^{2+} koordinatív kötéseken keresztül kapcsolódik a hisztidinhez.

9.2. Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója és analízise

A patogének diagnosztizálására elsősorban nagy affinitással és specifitással rendelkező antitesteket alkalmaznak, de egyre gyakrabban fordulnak elő nukleinsav alapú meghatározási módszerek is. Ez utóbbi eljárások leggyakrabban a nukleinsav szekvencia alapján azonosítják az egyes patogéneket, az aptamerek segítségével azonban akár közvetlenül kimutathatók a patogén mikroorganizmusok és vírusok fehérjei is.

A DNS aptamerek szelektálása több szempontból is célszerűnek tűnt. Ellentétben az RNS aptamerekkel a DNS aptamerek amplifikációja során nincs szükség reverz transzkripció lépésre, továbbá a biológiai mintákban a DNS a degradációnak kevésbé kitéve, mint az RNS (142). A szelekcióhoz egy olyan korábban publikált SELEX módszert alkalmaztunk kisebb módosításokkal (33), amely elméletileg bármilyen molekuláris biológiai laborban elvégezhető és nem igényel bonyolult műszerezettséget. A szelekciós körülményeket fokozatosan változtatva növeltük a szelekciós nyomást. Esetünkben ez annyit jelentett, hogy csökkenő burokfehérje mennyiséget használtunk az egymást követő szelekciós lépések során, így növeltük a

nagy affinitású oligonukleotidok populációját. A kezdetben alkalmazott nagyobb fehérjemennyiség kivédi a könyvtárban egy-egy, esetleg néhány kópiában jelen lévő nagy affinitású szekvenciák elvesztését. A későbbi ciklusok során a PCR amplifikáció következtében már sok nagy affinitású és specifitású szekvencia áll rendelkezésre, melyek közül a legerősebben kötődők foglalják el a rendelkezésre álló kötőhelyeket a fehérjén, így ekkor már csökkenthető a célfehérje mennyisége. A szelekciós nyomás további növelésére a fehérje-oligonukleotid komplexet hordozó affinitás-kromatográfiás gyantát intenzíven mostuk és a szelekciós pufferhez feleslegben adott dIdC és BSA alkalmazásával elimináltuk azokat a szekvenciákat, amelyek nem specifikusan kötődtek a fehérjékhez. Egy vírustörzs két izolátumából származó olyan burokfehérjékre szelektáltuk az aptamereket, amelyek csak igen kis mértékben térnek el egymástól, ezért az aptamerek specifikusságának növelése érdekében három kontraszelekciós lépést is elvégeztünk a két fehérje felcserélésével, ekkor a szelekció további lépéseit a felülúszóban maradt, nem kötődött szekvenciákkal folytattuk.

A klónozással és szekvenálással nyert szekvenciákat összehasonlító analízisnek vetettük alá a Clone Manager program alkalmazásával. A szelekció hat MT32- és nyolc PSA-H-specifikus aptamert eredményezett (13. ábra). A burokfehérjékre szelektált aptamerek az MT32 esetében 50%-ban, a PSA-H esetében pedig 45%-ban azonos szekvenciák voltak, a két csoport között azonban nem találtunk megegyező szekvenciákat. Ebből arra lehet következtetni, hogy a fehérjék különböző epitópjaihoz kötődhetnek az aptamerek. A leggyakrabban előforduló szekvenciák az MT32 esetében tíz (MT32 1-10), míg a PSA-H esetében kilenc klónban fordultak elő (PSA-H 1-9), ami alátámasztja, hogy az alkalmazott módszerrel sikeresen feldúsítottuk a célfehérjékre specifikus aptamereket.

9.3. A burokfehérje-kötő aptamerek prediktív másodlagos szerkezete

Mivel az aptamerek másodlagos szerkezete határozza meg célmolekula kötő képességüket, ebből a szempontból is megvizsgáltuk a szekvenálással nyert MT32-t és PSA-H-t kötő oligonukleotidokat. Az aptamer szekvenciák prediktív másodlagos szerkezetének meghatározására és ábrázolására leggyakrabban az mfold programot alkalmazzák (158), amellyel elsősorban hajtú és hurok szerkezetek kialakulását lehet

jósolni és megjeleníteni, azonban ezzel a programmal nem tudtunk kimutatni stabil másodlagos szerkezeteket a szekvenciákban. Az mfold program azonban nem alkalmazható a G-quadruplexek kimutatására. A G-quadruplexeknek nevezett négyszálú szerkezeteket planáris, négy guanozinból álló tetramerek stabilizálják (G-kvartett), amelyekben a guanozinok a Hoogsteen-féle bázispárosodás szerint kapcsolódnak. Elsőként a trombin-specifikus aptamer esetében mutatták ki NMR vizsgálattal az aptamer térbeli szerkezetének kialakulásában kulcsfontosságú struktúrát (156). Azóta különböző G-quadruplex szerkezetet kialakító aptamereket tanulmányoztak, és megállapították, hogy sok esetben a szerkezet kialakulása szükséges a célmolekula specifikus megkötéséhez (284). A szerkezet kialakulásának egyik feltétele, hogy a szekvencia magas guanozin tartalommal rendelkezzen. Mivel a leggyakrabban előforduló aptamer szekvenciáink guanozin tartalma szokatlanul magas, ~50% körül volt, valószínűsítettük, hogy G-quadruplex szerkezetet alakítanak ki.

A QGRS mapper jósló programot alkalmaztuk, amely az aptamer szekvenciákban több lehetséges G-quadruplex szerkezetet kialakító szekvencia részletet is feltüntetett, és ezek közül a legstabilabbakat választottuk ki (159). A szelektált szekvenciák összehasonlító analízise alapján a homológ szekvencia részeket lefedik a QGRS mapper programmal feltételezett G-quadruplex struktúrát kialakító szakaszokat mindkét csoport esetében, bár a leggyakrabban előforduló MT32 aptamer (MT32 1-10) hasonlít legkevésbé az összes többi oligonukleotidra.

A két leggyakrabban előforduló aptamer esetében a legnagyobb valószínűséggel kialakuló szerkezetet grafikusán is megjelenítettük (14. ábra, 15. ábra). Az ábrán feltüntettük, hogy a PSA-H aptamert a G-quadruplex szerkezet mellett tovább stabilizálja egy kettőszálú szakasz, amely öt bázispárból áll. A jelenség megmagyarázhatja a fehérje-aptamer komplex disszociációs konstansának alacsony értékét és, hogy a szekvenálással nyert nyolcféle PSA-H-specifikus oligonukleotid közül ez a leggyakrabban előforduló szekvencia.

Az ábrák hipotetikusak, a szabad aptamer oldatban kialakított legvalószínűbb szerkezetét mutatják be, azonban a szálak lefutásának irányát és az aptamer szerkezetének változását a burokfehérje megkötésekor nem lehet az általunk alkalmazott programmal megjósolni. A valódi szerkezetet csupán a fehérje-aptamer komplexének vizsgálatával lehet megállapítani.

9.4. Az aptamerek disszociációs konstansa

Az SPR analízis és az azt követő számítások eredményeként kapott 10^{-9} - 10^{-8} M tartományba eső disszociációs konstans értékek megegyezők vagy nagyságrendekkel alacsonyabbak voltak a korábban publikált hepatitis és influenza-specifikus aptamerekénél (241) (238) (217). A két aptamer közül a PSA-H bizonyult specifikusabbnak mivel a PSA-H fehérjével kialakított kötésének disszociációs konstansa (8×10^{-9} M) két nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint az MT32 fehérjével mért érték ($2,9 \times 10^{-7}$ M), míg az MT32 aptamer mindkét fehérjével nagyjából azonos, 10^{-8} M érték körüli disszociációs konstanssal jellemezhető komplexet alakított ki. Az MT32 aptamer valószínűleg egy olyan közös epitóphoz kötődik, amely mindkét fehérjében megtalálható, ezért ezt az aptamert többféle ASPV izolátumból származó burokfehérje detektálására is lehet alkalmazni.

Szelekciós módszerünk eredményességét bizonyítja, hogy a disszociációs konstansok értéke alapján sikerült nagy affinitású aptamereket szelektálnunk, amelyek alkalmasak új burokfehérje meghatározási módszerek kifejlesztésére.

9.5. Western-blot analízis aptamerek alkalmazásával

A Western-blot kísérlet körülményeit optimalizálnunk kellett. A háttér csökkentésére többféle membránt és blokkoló oldatot is kipróbáltunk, illetve meghatároztuk a szükséges aptamer koncentrációt. Tapasztalataink szerint a PVDF membránhoz nem specifikusan kötődött az aptamer vagy az ExtrAvidin-HRP konjugátum, és nagy háttérrel eredményezett a filmen történő előhíváskor. Ezt a kötődést egyik általunk alkalmazott blokkoló oldattal sem sikerült megszüntetnünk, ezért nitrocellulóz membránt alkalmaztunk további kísérleteinkhez. Különböző blokkoló oldatokat vizsgáltunk és eredményeink alapján az alkalmazott 5% tejpor, 5% BSA, Superblock blokkoló oldat és Protein Free blokkoló oldat közül a legalacsonyabb nem specifikus kötődést a Protein Free blokkoló oldattal értük el. A továbbiakban az ideális aptamer koncentrációt határoztuk meg, melynek során a kezdeti 100-ról 50 pmol/ml értékre csökkentettük az alkalmazott végkoncentrációt. Az optimalizált Western-blot kísérlet alapján az

aptamerek specifikusan kötődtek a denaturált burokfehérjékhez és nem szolgáltatottak háttérrel. Az aptamerek szelekciójához ugyan natív burokfehérjéket alkalmaztunk, a denaturáció mégsem okozott problémát a felismerésben, ami a gyakorlati felhasználás szempontjából kedvező eredmény, mivel így a minta-előkészítés nem befolyásolja a vírusfehérjék detektálását. Az aptamerek a komplex bakteriális fehérjéket tartalmazó mátrixból csak a burokfehérjékhez kötődtek azonban ezek között a körülmények között mindkét aptamer mindkét fehérjét felismerte és ugyanolyan intenzitású jelet szolgáltatott (16. ábra).

9.6. Dot-blot analízis aptamerek alkalmazásával

Általánosságban elmondható, hogy a PCR-alapú vírusdetektálási módszerek érzékenysége több nagyságrenddel nagyobb az immunológiai módszerekénél. A dot-blot technika azonban költséghatékony, egyszerűen és gyorsan kivitelezhető, ezért megfelelő módszernek bizonyul a vírusfertőzés kimutatására akár helyszíni vizsgálatokhoz is (285, 286).

Elvégeztünk egy kísérletet annak megállapítására, hogy az aptamerek alkalmasak lehetnek-e az antitestek helyettesítésére dot-blot analízisben. Az eredmények alapján mindkét aptamer specifikusan és szelektíven felismerte az ASPV-fertőzött kivonatot. Továbbá nem tapasztaltunk nem specifikus kötődést a komplex növényi fehérjéket tartalmazó mátrixban sem (17. ábra). Egy másik dot-blot kísérlettel a kereskedelmi forgalomban beszerezhető anti-ASPV IgG monoklonális antitest érzékenységét hasonlítottuk össze az aptamerekével. A dot-blot analízis alapján az antitest is alkalmas a fertőzött kivonat kimutatására, azonban denzitometriás mérések alapján a kapott jel intenzitása körülbelül tízszeres az aptamerekkel detektált pontokban az antitesttel detektált ponthoz viszonyítva (18. ábra). Ez az eredmény feltételezhetően azzal magyarázható, hogy a fertőzött kivonat vírusrészecskéket tartalmaz, amelyek a felszínükön számtalan kópiában tartalmazzák ugyanazt a burokfehérjét, így egy részecskéhez több aptamer is kötődhet. Mivel az aptamer jóval kisebb méretű az antitestnél, több tud hozzákötődni egy vírus részecskéhez, amely így több közvetítő molekula révén nagyobb jelet szolgáltat. Ez a magyarázat azonban hipotetikus, mivel az általunk alkalmazott anti-ASPV IgG és másodlagos antitest disszociációs konstansait

nem ismerjük, így a jelintenzitás különbsége az antitestek kisebb affinitásával is magyarázható.

9.7. ASPV kimutatása ELISA és ELONA módszerrel

Az ELONA a hagyományos ELISA módszer alternatív változata (222), amelyben a szendvics típusú meghatározásban az egyik kötő antitestet aptamer helyettesíti. Tíz éve publikálták az első ELONA meghatározást, amely biztató eredményeket hozott, ennek ellenére nem terjedt el általánosan és csupán néhány közleményben mutatnak be a kimutatási módszerrel kapott eredményeket. (112, 222, 287). A módszer alkalmas az aptamerek specifitásának vizsgálatára és a specifikus antitestek és aptamerek érzékenységének összehasonlítására. Emellett a módszer fontos előnyei, hogy a detektáló antitestek helyettesíthetők aptamerekkel, illetve, hogy teljes vírusrészecskék megkötésekor a kisméretű aptamerekből több kötődhet ki, mint antitestből, így nagyobb intenzitású jelet szolgáltathat.

A kereskedelmi forgalomban beszerezhető ASPV-specifikus monoklonális antitestet és egy ezt felhasználó komplett ELISA készletet használtunk referenciaként, és elvégeztünk egy kísérletet, amelyben a konjugált antitestet helyettesítettük biotinilált aptamerrel. Az eredmények alapján az aptamerrel végzett ELONA érzékenyebbnek bizonyult az ELISA-nál, minden pontban körülbelül ötször intenzívebb jelet produkált, így hatszoros hígításban is alkalmas volt a vírus kimutatására (19. ábra).

Az ELONA módszer specifikus és érzékeny, azonban továbbra sem nélkülözi a megfelelő antitestek alkalmazását, ezért nem jelent valódi alternatívát a hagyományos ELISA módszerek mellett.

9.8. ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel

Az antitestek előállításának és használatának korlátozó tényezőit kiküszöbölendő egy olyan módszer fejlesztését tűztük ki célul, amely alkalmas a vírus burokfehérjék tisztán aptamer alapú detektálására.

Az eddig létrehozott kettős aptamer alapú szendvics detektálási módszereket leginkább a bioszenzorokban használták ki fehérjedetektálási módszerek

érzékenységének javítására (288), azonban ismert az ELISA alternatívájának tekinthető ún. ALISA módszer (Sandwich Aptamer-linked Immobilized Sorbent Assay) is (289). Az eljárás alkalmas *Francisella tularensis* baktériumok detektálására reprodukálhatósága azonban kérdéses, mivel az *F. tularensis* antigén megkötéséhez nem egy meghatározott aptamert hanem egy kötőképesség alapján feldúsított oligonukleotid elegyet immobilizáltak nem specifikusan, hidrofób és ionos kölcsönhatások segítségével egy mikrotiter tálca felületére, illetve ugyanezt az elegyet biotinilált formában alkalmazták detektálásra. Ezzel ellentétben DOS-ELONA kísérletünkben a meghatározott szekvenciájú, kötő aptamert kovalensen, irányítottan kötöttük a felülethez az oligonukleotid módosított 3' végén keresztül, továbbá a detektálásra alkalmazott aptamer szekvenciája is ismert volt. Kísérletünkhöz bakteriális rendszerben előállított tisztított burokfehérjét alkalmaztunk, amelyet ismert fehérjekoncentrációjú bakteriális kivonattal hígítottunk, így pontosan beállíthattuk a mikrotiter tálca celláiba kerülő burokfehérje mennyiségeket és emellett a teljes fehérje mennyiséget állandó értéken tarthattuk. A sandwich assay típusú meghatározáshoz nem használhattunk csupán egyféle aptamert, mivel annak egy fehérjemolekulán csak egy kötőhelye van. Kísérletünk tervezésénél tehát abból indultunk ki, hogy a disszociációs konstansok értéke alapján mindkét aptamer mindkét fehérjét képes megkötni, csak más affinitással. Feltételeztük, hogy az aptamerek két különböző helyen kötődnek a fehérjékhez mivel más a szerkezetük, így alkalmasak lesznek a szendvics-típusú meghatározáshoz. A kísérlet körülményeit ebben az esetben is optimalizálnunk kellett. Így meghatároztuk a szükséges aptamer koncentrációkat és a megfelelő blokkoló oldatot. Az elvégzett kísérlet eredménye alapján a szendvics elrendezésnek köszönhetően igen specifikus, jól reprodukálható fehérje kimutatási módszert hoztunk létre (20. ábra).

9.9. ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel

A burokfehérje meghatározására fejlesztett DOS-ELONA mintájára olyan detektálási módszer fejlesztését tűztük ki célul, amellyel vírusrészecskéket is kimutathatunk fertőzött növényi kivonatból. A burokfehérje kimutatásához alkalmazott maleimid-aktivált mikrotiter tálca arra alkalmas volt, hogy a bakteriális fehérjéket tartalmazó mátrixból specifikusan kimutassuk a túltermelt burokfehérjét, azonban a növényi

fehérjekivonat valószínűleg a nagy mennyiségben előforduló polifenolos vegyületeknek köszönhetően nem specifikusan kötődött a felülethez, így másik immobilizálási módszert kellett keresnünk. Foszforilált MT32 aptamerrel módosítottunk NucleoLink mikrotiter tálcát, majd vírusmentes, és ASPV-t, ApMV-t, vagy ACLSV-t tartalmazó növényi kivonatokkal inkubáltuk. Az újfajta mikrotiter tálca alkalmazásával kiküszöböltük a növényi mátrix nem specifikus kötődéséből származó háttérrel.

Ahogy azt már korábban is kiemeltem, az ASPV vírus felszínén számos kópiában megtalálható a burokfehérje, ami elméletileg lehetővé teszi, hogy akár egyféle aptamerrel is detektálhassuk a vírust. A szendvics-típusú vírusdetektálás elvégzésekor, elegendően magas vírusszám esetén ugyanis nem kell attól tartanunk, hogy a már megkötött burokfehérjét a második aptamer kiszorítja az elsővel alkotott komplexéből, mivel egy megkötött vírus részecskéhez számtalan felismerő aptamer kötődhet, ami megsokszorozza a mérhető jelet. Ennél a megközelítésnél azonban szem előtt kell tartanunk, hogy ha a vírusszám nagyon alacsony, akkor előfordulhat, hogy a nagyobb koncentrációban jelen lévő biotinizált aptamer kiszorítja a vírust a felületen kötött aptamerrel kialakított kötéséből.

A kereskedelmi forgalomban kapható kivonat az MT32 burokfehérjét tartalmazza, így a fentebb részletezett megfontolást figyelembe véve, a kísérletben az MT32 aptamer foszforilált formáját a lemezen immobilizáltuk, míg a biotinnal módosítottat detektálásra alkalmaztuk. Az ExtrAvidin-AP, és az AP-szubsztrát hozzáadása után a detektált abszorbancia értékek alapján a negatív kontroll értékeivel megegyező értékeket mértünk az ApMV és ACLSV-fertőzött kivonatok esetében, míg az ASPV-t tartalmazó minták esetében a mért jelintenzitás ennek háromszorosa volt (21. ábra).

A módszer érzékenységét bizonyítja, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható ASPV-pozitív növényi kivonatot húszszoros hígításban alkalmaztuk a DOS-ELONA meghatározásban. Ezzel szemben az ASPV detektálására kifejlesztett ELISA készlet, amely ugyancsak alkalmas a vírus kimutatására már hatszoros hígításban is a háttér értékéhez közeli jelet szolgáltatott. Az aptamerek érzékenysége a kísérleti eredményeink alapján jobbnak bizonyult az ASPV-specifikus antitestnél. Általánosságban azonban nem lehet kijelenteni, hogy az aptamerek érzékenysége jobb az antitestekénél, mivel az általunk alkalmazott antitestnek nem ismerjük a kötőképességét.

Az DOS-ELONA módszer ezen felül kiaknázza az aptamerek egyik legfontosabb előnyét, hogy méretük kisebb az antitestekénél. Emiatt ugyanis több aptamer kötődhet a vírus kapszidjához, mint ahány IgG molekula, így az aptamerekkel történő vírusdetektálás nagyobb intenzitású jelet szolgáltathat ugyanakkora vírusszám mellett.

10. Következtetések

- Egy korábban publikált, affinitás kromatográfiás gyantán immobilizált célfehérjéken alapuló aptamer szelekciós módszer módosított változatát sikeresen alkalmaztuk burokfehérje specifikus aptamerek szelekciójára, amellyel igazoltuk, hogy az eljárás általánosan alkalmazható. A szelekció sikerét bizonyítja, hogy az eljárás általánosan alkalmazható. A szelekció sikerét bizonyítja, hogy az SPR analízis alapján az aptamerek nagy affinitású kötést alakítanak ki a burokfehérjékkel. A disszociációs konstansok értékei a mikro- és nanomoláris tartományba esnek, így affinitásuk hasonló vagy magasabb, mint a korábban, más megközelítésekkel izolált vírus specifikus aptamereké.
- A szelektált aptamereket sikeresen alkalmaztuk a vírusfertőzött növényi kivonatok kimutatására többféle diagnosztikai módszer alkalmazásával. Az aptamerek mind a natív, mind a denaturált burokfehérjéket specifikusan felismerik, amit a dot-blot és Western-blot kísérletek eredményei támasztanak alá. Az aptamerek tehát alkalmasak a klasszikus bioanalitikai módszerekben az antitestek helyettesítésére, amelyhez csupán a kimutatási módszer körülményeinek optimalizálására van szükség.
- A szelektált aptamerek egyik előnyös tulajdonságaként kiemelhető, hogy a minta előkészítés valószínűleg nem befolyásolja a fehérjén az aptamer kötődéséhez szükséges motívumok hozzáférhetőségét. Ez a megállapítás arra alapozható, hogy az aptamereket tisztított burokfehérjékre szelektáltuk, amelyeket natív és denaturált állapotban is felismernek. Ezzel ellentétben az ASPV-specifikus antitest a denaturált fehérjéhez nem kötődik, így valószínűsíthető, hogy az antitest által felismert epitópok hozzáférhetősége függ a minta előkészítés folyamataitól, ami a gyakorlati felhasználás során negatív eredményhez vezethet.
- Egy korábban publikált, kevésbé elterjedt ELONA módszer mintájára elvégzett kísérlet eredményei alapján is kijelenthető, hogy az aptamerek alkalmasak az

antitestek helyettesítésére, és komplex növényi mátrixban nagy érzékenységu víruskimutatást tesznek lehetővé.

- Legfontosabb eredményünk egy új, tisztán aptamer alapú meghatározási módszer, a DOS-ELONA fejlesztése, amellyel kiküszöböltük az eredeti ELONA módszer antitest igényét, így azok előállításából és alkalmazásából fakadó hátrányokat. A módszer csupán aptamerek alkalmazásával lehetővé teszi a burokfehérje koncentráció pontos meghatározását komplex, bakteriális fehérjéket tartalmazó mátrixból is, és a meghatározás elvégezhető egy általános felszereltségu laboratóriumban is.
- Az általunk kifejlesztett DOS-ELONA módszer alkalmas az ASPV-fertözött növényi kivonatok kimutatására és érzékenysége felülmúlja az elérhető ASPV-detektáló ELISA módszert. Ebben a meghatározásban kihasználtuk a vírus kapszid felépítését, így ugyanazt az aptamert alkalmazhattuk a vírus részecskék kikötéséhez és detektáláshoz is, ami tovább egyszerűsítette az analízist, és az aptamerek antitesteknél kisebb mérete révén a jelintenzitás növekedését eredményezte.
- Az aptamerek egyre népszerűbb felismerő molekulák, ennek ellenére csak kevés publikációban számolnak be olyan diagnosztikai alkalmazásokról, amelyekben komplex mátrixból történik a meghatározás. Az általunk bemutatott DOS-ELONA módszerek alkalmasak komplex bakteriális és növényi fehérjéket tartalmazó mátrixból is a burokfehérje és a teljes vírus meghatározására.

11. Összefoglalás

A vírusok evolúciója a gyakran előforduló mutációk következtében gyors, ezért különösen nagy kihívást jelent olyan vírusdiagnosztikai protokollok létrehozása, amelyek lépést tudnak tartani a vírusok evolúciós sebességével, és alkalmasak a folyamatosan megjelenő új törzsek detektálására. A patogének fehérje komponenseinek detektálásánál szinte elkerülhetetlen az antitestek alkalmazása, legtöbbször immobilizált immunglobulinokat használnak a célmolekulák specifikus megkötésére. Mivel az antitestek alapvető fontosságúak a legnépszerűbb vírusdiagnosztikai tesztekben, az új módszerek fejlesztésénél a nagy szelektivitással bíró antitestek előállítását jelenti az egyik legnagyobb kihívást. Figyelembe véve az aptamerek előnyös tulajdonságait: stabilitásukat, kis méretüket és a különböző igényekhez könnyen igazítható szelektív eljárást, az aptamerek várhatóan az antitestek versenytársai lesznek a vírusdiagnosztikában.

A disszertációban bemutatom az első növényi vírus-specifikus aptamerek szelektívát. Az aptamerekkel végzett kísérleteink eredményei alátámasztják, hogy kiválóan alkalmazhatóak vírusdiagnosztikai meghatározásokban, akár komplex minták analízisére, és megfelelő eszközei lehetnek az egyszerű és költséghatékony vírusdiagnosztikai rendszerek fejlesztésének. A munkánk során tanulmányozott vírus, az ASPV detektálásának gyakorlati jelentősége a gyümölcsfák szaporítóanyagainak látens vírusfertőzöttségének kizárása. Habár a növény diagnosztikai terület jelentősége nem összemérhető a humán patogének diagnosztikájával, az általunk kidolgozott metodikák megoldást nyújthatnak a növényi vírusfertőzöttség gyors és költséghatékony kimutatására, így társadalmi hasznosságuk kétségtelen. Mindemellett az ASPV-re egy olyan vírus modellként is tekinthetünk, amelynek felépítése alapvetően nem különbözik egyes humán patogénektől, felhasználása során nincs szükség különösebb biztonsági előírások betartására, és kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető a vírusfertőzött fehérje kivonat. Ezek alapján feltételezhető, hogy bemutatott eredményeink jelentősége túlmutat a növényi vírusdiagnosztika területén és alapot nyújthatnak további, a humán patogén vírusok kimutatására irányuló módszerek kimunkálására.

12. Summary

Because of the high mutation rates, the evolution of viruses is fast; therefore, the development of virus detecting protocols, which keep up with the evolution of viruses and suitable for detecting the continuously appearing new strains is especially challenging. The use of antibodies in pathogen detection is almost inevitable because immobilized immunoglobulins are used most frequently for specific capture of the targeted analytes. Since antibodies are basic components of the most popular virus diagnostic tests, generation of highly selective antibodies remains one of the major bottlenecks of method development. Considering their *in vitro* selection procedure, stability, and small size, aptamers could be competitors of antibodies as specific receptor molecules in virus diagnostic methods.

In the dissertation, I present the selection of the first plant virus-specific aptamers, which bind specifically the viral coat proteins. The presented experimental results suggest that the aptamers are suitable for virus detecting methods, even for analysis of complex samples and appropriate tools for development of general and cost effective virus detecting systems in the future. The practical significance of ASPV detection is the testing of the propagating material of fruit trees for virus infection. Though the significance of ASPV detection is not as high as the detection of human pathogens, the presented, aptamer based protocols offer various fast, cost-effective approaches for plant virus detection; thus, their practical utility is indubitable. Additionally, ASPV is an appropriate virus model since its application does not need safety requirements, the virus infected protein samples are available from commercial sources, and its structure basically does not differ from certain human pathogens. Therefore, the importance of presented results is not limited to plant diagnostic, but they could provide foundations for development of aptamer based human pathogen virus detecting methods.

13. Saját publikációk jegyzéke

1. Selection and versatile application of virus specific aptamers

Zsófia Balogh, Viola Bardóczy, Gergely Lautner, Beata Komorowska, Róbert E. Gyurcsányi, Tamás Mészáros (2010)

The FASEB Journal, 2010 Nov. 24, (11):4187-95. Epub 2010 Jul 12.

IF.: 6,401

2. Aptamer based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging.

Lautner, G., Balogh, Zs., Bardóczy, V., Mészáros T., Gyurcsányi, R., E. (2010),

Analyst, 2010 May, 135(5):918-26. Epub 2010 Feb 11.

IF.: 3,272

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet Patobiokémiai Kutatócsoportja munkatársainak, ahol doktorandusz hallgatóként folytattam tanulmányaimat és kutatómunkámat 2008-2011 között. Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Mészáros Tamásnak, aki szakmai tanácsaival, és kritikai észrevételeivel nagyban segítette munkámat, valamint segítséget nyújtott az értekezés hibáinak kijavításában. Köszönettel tartozom Dr. Mandl József professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak. Emellett köszönet illeti a kísérletekhez nyújtott elméleti és gyakorlati hozzájárulásáért Dr. Gyurcsányi E. Róbert egyetemi docenst és Lautner Gergely Ph.D. hallgatót a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék munkatársait. Továbbá a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségéért köszönet illeti Dr. Bardóczy Violát a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék volt Ph.D. hallgatóját. Végezetül köszönettel tartozom Beata Komorowskának (Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland), a szakmai hozzájárulásáért és a rendelkezésemre bocsátott anyagokért.

Irodalomjegyzék

1. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249, 505-510.
2. Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346, 818-822.
3. Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures, *Nature* 355, 850-852.
4. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., and Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science* 263, 1425-1429.
5. Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., and Peyrin, E. (2003) A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC, *J Am Chem Soc* 125, 8672-8679.
6. Deng, Q., German, I., Buchanan, D., and Kennedy, R. T. (2001) Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase, *Anal Chem* 73, 5415-5421.
7. German, I., Buchanan, D. D., and Kennedy, R. T. (1998) Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis, *Anal Chem* 70, 4540-4545.
8. Davis, K. A., Lin, Y., Abrams, B., and Jayasena, S. D. (1998) Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry, *Nucleic Acids Res* 26, 3915-3924.
9. O'Sullivan, C. K. (2002) Aptasensors--the future of biosensing?, *Anal Bioanal Chem* 372, 44-48.
10. Tombelli, S., Minunni, M., and Mascini, M. (2005) Analytical applications of aptamers, *Biosens Bioelectron* 20, 2424-2434.
11. Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256, 495-497.
12. Jayasena, S. D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clin Chem* 45, 1628-1650.

13. Cook, D. (1995) Monoclonal antibodies in diagnostic immunoassays, In *Monoclonal antibodies* (Ritter, M., Ed.), pp 180–208, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
14. Hudson, P. J., and Souriau, C. (2003) Engineered antibodies, *Nat Med* 9, 129-134.
15. Mairal, T., Ozalp, V. C., Lozano Sanchez, P., Mir, M., Katakis, I., and O'Sullivan, C. K. (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications, *Anal Bioanal Chem* 390, 989-1007.
16. Cox, J. C., Rudolph, P., and Ellington, A. D. (1998) Automated RNA selection, *Biotechnol Prog* 14, 845-850.
17. Cox, J. C., Rajendran, M., Riedel, T., Davidson, E. A., Sooter, L. J., Bayer, T. S., Schmitz-Brown, M., and Ellington, A. D. (2002) Automated acquisition of aptamer sequences, *Comb Chem High Throughput Screen* 5, 289-299.
18. Eulberg, D., Buchner, K., Maasch, C., and Klussmann, S. (2005) Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist, *Nucleic Acids Res* 33, e45.
19. Hybarger, G., Bynum, J., Williams, R. F., Valdes, J. J., and Chambers, J. P. (2006) A microfluidic SELEX prototype, *Anal Bioanal Chem* 384, 191-198.
20. Kawazoe, N., Ito, Y., and Imanishi, Y. (1996) Patterned staining by fluorescein-labeled oligonucleotides obtained by in vitro selection, *Anal Chem* 68, 4309-4311.
21. Nimjee, S. M., Rusconi, C. P., and Sullenger, B. A. (2005) Aptamers: an emerging class of therapeutics, *Annu Rev Med* 56, 555-583.
22. Rimmele, M. (2003) Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments, *Chembiochem* 4, 963-971.
23. Burgstaller, P., Girod, A., and Blind, M. (2002) Aptamers as tools for target prioritization and lead identification, *Drug Discov Today* 7, 1221-1228.
24. Goringer, H. U., Homann, M., and Lörger, M. (2003) In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules, *Int J Parasitol* 33, 1309-1317.
25. Gopinath, S. C. (2007) Methods developed for SELEX, *Anal Bioanal Chem* 387, 171-182.

26. Liu, J., and Stormo, G. D. (2005) Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions, *Nucleic Acids Res* 33, e141.
27. Pristoupil, T. I., and Kramlova, M. (1968) Microchromatographic separation of ribonucleic acids from proteins on nitrocellulose membranes, *J Chromatogr* 32, 769-770.
28. Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M. G., Reyes, G. B., Gonzalez Solveyra, C., and Santa-Coloma, T. A. (2001) Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein, *J Immunol Methods* 252, 191-197.
29. Schneider, D., Gold, L., and Platt, T. (1993) Selective enrichment of RNA species for tight binding to Escherichia coli rho factor, *FASEB J* 7, 201-207.
30. Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B. (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Anal Bioanal Chem* 383, 83-91.
31. Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Hwang, J., Kuno, A., Hasegawa, T., and Nishikawa, S. (2003) RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region, *J Biochem* 133, 263-270.
32. Lupold, S. E., Hicke, B. J., Lin, Y., and Coffey, D. S. (2002) Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen, *Cancer Res* 62, 4029-4033.
33. Murphy, M. B., Fuller, S. T., Richardson, P. M., and Doyle, S. A. (2003) An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification, *Nucleic Acids Res* 31, e110.
34. Misono, T. S., and Kumar, P. K. (2005) Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance, *Anal Biochem* 342, 312-317.
35. Mendonsa, S. D., and Bowser, M. T. (2004) In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis, *Anal Chem* 76, 5387-5392.

36. Mosing, R. K., Mendonsa, S. D., and Bowser, M. T. (2005) Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase, *Anal Chem* 77, 6107-6112.
37. Tang, J., Xie, J., Shao, N., and Yan, Y. (2006) The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods, *Electrophoresis* 27, 1303-1311.
38. Tsai, R. Y., and Reed, R. R. (1998) Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz, *Mol Cell Biol* 18, 6447-6456.
39. Rhie, A., Kirby, L., Sayer, N., Wellesley, R., Disterer, P., Sylvester, I., Gill, A., Hope, J., James, W., and Tahiri-Alaoui, A. (2003) Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion, *J Biol Chem* 278, 39697-39705.
40. Mendonsa, S. D., and Bowser, M. T. (2005) In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis, *J Am Chem Soc* 127, 9382-9383.
41. He, Y. Y., Stockley, P. G., and Gold, L. (1996) In vitro evolution of the DNA binding sites of Escherichia coli methionine repressor, MetJ, *J Mol Biol* 255, 55-66.
42. Marshall, K. A., and Ellington, A. D. (2000) In vitro selection of RNA aptamers, *Methods Enzymol* 318, 193-214.
43. Cerchia, L., Esposito, C. L., Jacobs, A. H., Tavitian, B., and de Franciscis, V. (2009) Differential SELEX in human glioma cell lines, *PLoS One* 4, e7971.
44. Theis, M. G., Knorre, A., Kellersch, B., Moelleken, J., Wieland, F., Kolanus, W., and Famulok, M. (2004) Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11221-11226.
45. Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M. H., Kretzschmar, H. A., Famulok, M., and Winnacker, E. L. (1997) RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP, *J Virol* 71, 8790-8797.
46. Fitzwater, T., and Polisky, B. (1996) A SELEX primer, *Methods Enzymol* 267, 275-301.

47. Walder, R. Y., Hayes, J. R., and Walder, J. A. (1993) Use of PCR primers containing a 3'-terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences, *Nucleic Acids Res* 21, 4339-4343.
48. Williams, K. P., and Bartel, D. P. (1995) PCR product with strands of unequal length, *Nucleic Acids Res* 23, 4220-4221.
49. Naimuddin, M., Kitamura, K., Kinoshita, Y., Honda-Takahashi, Y., Murakami, M., Ito, M., Yamamoto, K., Hanada, K., Husimi, Y., and Nishigaki, K. (2007) Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library, *J Mol Recognit* 20, 58-68.
50. Wu, L., and Curran, J. F. (1999) An allosteric synthetic DNA, *Nucleic Acids Res* 27, 1512-1516.
51. Fitter, S., and James, R. (2005) Deconvolution of a complex target using DNA aptamers, *J Biol Chem* 280, 34193-34201.
52. Vant-Hull, B., Payano-Baez, A., Davis, R. H., and Gold, L. (1998) The mathematics of SELEX against complex targets, *J Mol Biol* 278, 579-597.
53. Djordjevic, M., and Sengupta, A. M. (2006) Quantitative modeling and data analysis of SELEX experiments, *Phys Biol* 3, 13-28.
54. Berezovski, M., Drabovich, A., Krylova, S. M., Musheev, M., Okhonin, V., Petrov, A., and Krylov, S. N. (2005) Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers, *J Am Chem Soc* 127, 3165-3171.
55. Cho, M., Xiao, Y., Nie, J., Stewart, R., Csordas, A. T., Oh, S. S., Thomson, J. A., and Soh, H. T. (2010) Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15373-15378.
56. Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., and Thompson, J. D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs, *Nucleic Acids Res* 31, 3497-3500.
57. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

58. Burke, D. H., Scates, L., Andrews, K., and Gold, L. (1996) Bent pseudoknots and novel RNA inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) reverse transcriptase, *J Mol Biol* 264, 650-666.
59. Ruckman, J., Green, L. S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W. L., Henninger, D. D., Claesson-Welsh, L., and Janjic, N. (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain, *J Biol Chem* 273, 20556-20567.
60. Wilson, C., Nix, J., and Szostak, J. (1998) Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot, *Biochemistry* 37, 14410-14419.
61. Held, D. M., Greathouse, S. T., Agrawal, A., and Burke, D. H. (2003) Evolutionary landscapes for the acquisition of new ligand recognition by RNA aptamers, *J Mol Evol* 57, 299-308.
62. Huang, Z., and Szostak, J. W. (2003) Evolution of aptamers with a new specificity and new secondary structures from an ATP aptamer, *RNA* 9, 1456-1463.
63. Vater, A., Jarosch, F., Buchner, K., and Klussmann, S. (2003) Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX, *Nucleic Acids Res* 31, e130.
64. Eulberg, D., and Klussmann, S. (2003) Spiegelmers: biostable aptamers, *Chembiochem* 4, 979-983.
65. Faulhammer, D., Eschgfaller, B., Stark, S., Burgstaller, P., Englberger, W., Erfurth, J., Kleinjung, F., Rupp, J., Dan Vulcu, S., Schroder, W., Vonhoff, S., Nawrath, H., Gillen, C., and Klussmann, S. (2004) Biostable aptamers with antagonistic properties to the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ, *RNA* 10, 516-527.
66. Jensen, K. B., Atkinson, B. L., Willis, M. C., Koch, T. H., and Gold, L. (1995) Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12220-12224.

67. White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., and Sullenger, B. (2001) Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX, *Mol Ther* 4, 567-573.
68. Radrizzani, M., Broccardo, M., Gonzalez Solveyra, C., Bianchini, M., Reyes, G. B., Cafferata, E. G., and Santa-Coloma, T. A. (1999) Oligobodies: bench made synthetic antibodies, *Medicina (B Aires)* 59, 753-758.
69. Famulok, M. (1999) Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules, *Curr Opin Struct Biol* 9, 324-329.
70. Wilson, D. S., and Szostak, J. W. (1999) In vitro selection of functional nucleic acids, *Annu Rev Biochem* 68, 611-647.
71. Green, L. S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L. A., Feistner, B. D., Gill, S. C., Jucker, F. M., and Janjic, N. (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, *Chem Biol* 2, 683-695.
72. Jellinek, D., Green, L. S., Bell, C., and Janjic, N. (1994) Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor, *Biochemistry* 33, 10450-10456.
73. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., and Yarus, M. (1995) Diversity of oligonucleotide functions, *Annu Rev Biochem* 64, 763-797.
74. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature* 355, 564-566.
75. Thomas, M., Chedin, S., Carles, C., Riva, M., Famulok, M., and Sentenac, A. (1997) Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers, *J Biol Chem* 272, 27980-27986.
76. Tuerk, C., MacDougall, S., and Gold, L. (1992) RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6988-6992.
77. Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., and Resch, A. (2005) Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 367-374.

78. Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., and de Franciscis, V. (2002) Nucleic acid aptamers in cancer medicine, *FEBS Lett* 528, 12-16.
79. Pestourie, C., Tavitian, B., and Duconge, F. (2005) Aptamers against extracellular targets for in vivo applications, *Biochimie* 87, 921-930.
80. Zhang, Z., Blank, M., and Schluesener, H. J. (2004) Nucleic acid aptamers in human viral disease, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52, 307-315.
81. Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M., and Schluesener, H. (2001) Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen, *J Biol Chem* 276, 16464-16468.
82. Ulrich, H., Magdesian, M. H., Alves, M. J., and Colli, W. (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of Trypanosoma cruzi and inhibit cell invasion, *J Biol Chem* 277, 20756-20762.
83. Gilbert, B. A., Sha, M., Wathen, S. T., and Rando, R. R. (1997) RNA aptamers that specifically bind to a K Ras-derived farnesylated peptide, *Bioorg Med Chem* 5, 1115-1122.
84. Betat, H., Vogel, S., Struhalla, M., Forster, H. H., Famulok, M., Welzel, P., and Hahn, U. (2003) Aptamers that recognize the lipid moiety of the antibiotic moenomycin A, *Biol Chem* 384, 1497-1500.
85. Ding, J. L., Gan, S. T., and Ho, B. (2008) Single-stranded DNA oligoaptamers: molecular recognition and LPS antagonism are length- and secondary structure-dependent, *J Innate Immun* 1, 46-58.
86. Yarus, M. (1998) Amino acids as RNA ligands: a direct-RNA-template theory for the code's origin, *J Mol Evol* 47, 109-117.
87. Haller, A. A., and Sarnow, P. (1997) In vitro selection of a 7-methyl-guanosine binding RNA that inhibits translation of capped mRNA molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8521-8526.
88. Sassanfar, M., and Szostak, J. W. (1993) An RNA motif that binds ATP, *Nature* 364, 550-553.
89. Mannironi, C., Di Nardo, A., Fruscoloni, P., and Tocchini-Valentini, G. P. (1997) In vitro selection of dopamine RNA ligands, *Biochemistry* 36, 9726-9734.

90. Tsiang, M., Gibbs, C. S., Griffin, L. C., Dunn, K. E., and Leung, L. L. (1995) Selection of a suppressor mutation that restores affinity of an oligonucleotide inhibitor for thrombin using in vitro genetics, *J Biol Chem* 270, 19370-19376.
91. Biroccio, A., Hamm, J., Incitti, I., De Francesco, R., and Tomei, L. (2002) Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase, *J Virol* 76, 3688-3696.
92. Fisher, T. S., Joshi, P., and Prasad, V. R. (2002) Mutations that confer resistance to template-analog inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 reverse transcriptase lead to severe defects in HIV replication, *J Virol* 76, 4068-4072.
93. Ciesiolka, J., Gorski, J., and Yarus, M. (1995) Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺, *RNA* 1, 538-550.
94. Hofmann, H. P., Limmer, S., Hornung, V., and Sprinzl, M. (1997) Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair, *RNA* 3, 1289-1300.
95. Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R., and Strehlitz, B. (2005) In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine, *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1928-1934.
96. Meli, M., Vergne, J., Decout, J. L., and Maurel, M. C. (2002) Adenine-aptamer complexes: a bipartite RNA site that binds the adenine nucleic base, *J Biol Chem* 277, 2104-2111.
97. Koizumi, M., and Breaker, R. R. (2000) Molecular recognition of cAMP by an RNA aptamer, *Biochemistry* 39, 8983-8992.
98. Lauhon, C. T., and Szostak, J. W. (1995) RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors, *J Am Chem Soc* 117, 1246-1257.
99. Anderson, P. C., and Mecozi, S. (2005) Identification of a 14mer RNA that recognizes and binds flavin mononucleotide with high affinity, *Nucleic Acids Res* 33, 6992-6999.
100. Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A., and Famulok, M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity, *Nucleic Acids Res* 24, 1029-1036.

101. Famulok, M. (1994) Molecular recognition of amino-acids by RNA–aptamers— an L-citrulline binding RNA motif and its evolution into an L-arginine binder, *J. Am. Chem. Soc.* *116*, 1698–1706.
102. Majerfeld, I., and Yarus, M. (1998) Isoleucine:RNA sites with associated coding sequences, *RNA* *4*, 471-478.
103. Lozupone, C., Changayil, S., Majerfeld, I., and Yarus, M. (2003) Selection of the simplest RNA that binds isoleucine, *RNA* *9*, 1315-1322.
104. Yang, Q., Goldstein, I. J., Mei, H. Y., and Engelke, D. R. (1998) DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5462-5467.
105. Masud, M. M., Kuwahara, M., Ozaki, H., and Sawai, H. (2004) Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX, *Bioorg Med Chem* *12*, 1111-1120.
106. Kwon, M., Chun, S. M., Jeong, S., and Yu, J. (2001) In vitro selection of RNA against kanamycin B, *Mol Cells* *11*, 303-311.
107. Berens, C., Thain, A., and Schroeder, R. (2001) A tetracycline-binding RNA aptamer, *Bioorg Med Chem* *9*, 2549-2556.
108. Burke, D. H., Hoffman, D. C., Brown, A., Hansen, M., Pardi, A., and Gold, L. (1997) RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol, *Chem Biol* *4*, 833-843.
109. Kubik, M. F., Bell, C., Fitzwater, T., Watson, S. R., and Tasset, D. M. (1997) Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding, *J Immunol* *159*, 259-267.
110. Zhan, L. S., Zhuo, H.L., Wang, H.Z., Peng, J.C., Wang, Q.L. (2005) Screening and characterization of aptamers of hepatitis C virus NS3 helicase, *Progr. Biochem. Biophys.* *32*, 245-250.
111. Mallikaratchy, P., Stahelin, R. V., Cao, Z., Cho, W., and Tan, W. (2006) Selection of DNA ligands for protein kinase C-delta, *Chem Commun (Camb)*, 3229-3231.

112. Ferreira, C. S., Matthews, C. S., and Missailidis, S. (2006) DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers, *Tumour Biol* 27, 289-301.
113. Homann, M., and Goring, H. U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes, *Nucleic Acids Res* 27, 2006-2014.
114. Shanguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C. J., and Tan, W. (2006) Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11838-11843.
115. Breaker, R. R. (1997) DNA aptamers and DNA enzymes, *Curr Opin Chem Biol* 1, 26-31.
116. Conrad, R. C., Giver, L., Tian, Y., and Ellington, A. D. (1996) In vitro selection of nucleic acid aptamers that bind proteins, *Methods Enzymol* 267, 336-367.
117. Klussmann, S. (2006) Functional Oligonucleotides and Their Applications, In *The Aptamer Handbook.*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim.
118. Hamm, J. (1996) Characterisation of antibody-binding RNAs selected from structurally constrained libraries, *Nucleic Acids Res* 24, 2220-2227.
119. Hamm, J., Huber, J., and Luhrmann, R. (1997) Anti-idiotypic RNA selected with an anti-nuclear export signal antibody is actively transported in oocytes and inhibits Rev- and cap-dependent RNA export, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12839-12844.
120. Fan, P., Suri, A. K., Fiala, R., Live, D., and Patel, D. J. (1996) Molecular recognition in the FMN-RNA aptamer complex, *J Mol Biol* 258, 480-500.
121. Davis, J. H., and Szostak, J. W. (2002) Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11616-11621.
122. Pan, W., and Clawson, G. A. (2009) The shorter the better: reducing fixed primer regions of oligonucleotide libraries for aptamer selection, *Molecules* 14, 1353-1369.
123. Kopylov, A. M., and Spiridonova, V. A. (2000) [Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX], *Mol Biol (Mosk)* 34, 1097-1113.

124. Kusser, W. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution, *J Biotechnol* 74, 27-38.
125. Andreola, M. L., Calmels, C., Michel, J., Toulme, J. J., and Litvak, S. (2000) Towards the selection of phosphorothioate aptamers optimizing in vitro selection steps with phosphorothioate nucleotides, *Eur J Biochem* 267, 5032-5040.
126. Jhaveri, S., Olwin, B., and Ellington, A. D. (1998) In vitro selection of phosphorothiolated aptamers, *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2285-2290.
127. King, D. J., Ventura, D. A., Brasier, A. R., and Gorenstein, D. G. (1998) Novel combinatorial selection of phosphorothioate oligonucleotide aptamers, *Biochemistry* 37, 16489-16493.
128. Somasunderam, A., Ferguson, M. R., Rojo, D. R., Thiviyanathan, V., Li, X., O'Brien, W. A., and Gorenstein, D. G. (2005) Combinatorial selection, inhibition, and antiviral activity of DNA thioaptamers targeting the RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase, *Biochemistry* 44, 10388-10395.
129. Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S. C., and Jayasena, S. D. (1994) Modified RNA sequence pools for in vitro selection, *Nucleic Acids Res* 22, 5229-5234.
130. Pagratis, N. C., Bell, C., Chang, Y. F., Jennings, S., Fitzwater, T., Jellinek, D., and Dang, C. (1997) Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor, *Nat Biotechnol* 15, 68-73.
131. Yan, X., Gao, X., and Zhang, Z. (2004) Isolation and characterization of 2'-amino-modified RNA aptamers for human TNFalpha, *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2, 32-42.
132. Burmeister, P. E., Lewis, S. D., Silva, R. F., Preiss, J. R., Horwitz, L. R., Pendergrast, P. S., McCauley, T. G., Kurz, J. C., Epstein, D. M., Wilson, C., and Keefe, A. D. (2005) Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF, *Chem Biol* 12, 25-33.
133. Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A., and Furste, J. P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine, *Nat Biotechnol* 14, 1112-1115.
134. Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V. A., and Furste, J. P. (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine, *Nat Biotechnol* 14, 1116-1119.

135. Williams, K. P., Liu, X. H., Schumacher, T. N., Lin, H. Y., Ausiello, D. A., Kim, P. S., and Bartel, D. P. (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11285-11290.
136. Golden, M. C., Collins, B. D., Willis, M. C., and Koch, T. H. (2000) Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers, *J Biotechnol* 81, 167-178.
137. Baldrich Rubio E., Campàs i Homs M., O'Sullivan, C. K. (2004) Aptamers: Powerful Molecular Tools for Therapeutics and Diagnostics, In *Molecular Analysis and Genome Discovery* (Harbron, S., Rapley R., Ed.), John Wiley & Sons.
138. Kuwahara, M., Ohbayashi, T., Hanawa, K., Shoji, A., Ozaki, A. N., Ozaki, H., and Sawai, H. (2002) Enzymatic incorporation of chemically-modified nucleotides into DNAs, *Nucleic Acids Res Suppl*, 83-84.
139. Kuwahara, M., Takahata, Y., Shoji, A., Ozaki, A. N., Ozaki, H., and Sawai, H. (2003) Substrate properties of C5-substituted pyrimidine 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates for thermostable DNA polymerases during PCR, *Bioorg Med Chem Lett* 13, 3735-3738.
140. Ohbayashi, T., Kuwahara, M., Hasegawa, M., Kasamatsu, T., Tamura, T., and Sawai, H. (2005) Expansion of repertoire of modified DNAs prepared by PCR using KOD Dash DNA polymerase, *Org Biomol Chem* 3, 2463-2468.
141. Shoji, A., Kuwahara, M., Ozaki, H., and Sawai, H. (2007) Modified DNA aptamer that binds the (R)-isomer of a thalidomide derivative with high enantioselectivity, *J Am Chem Soc* 129, 1456-1464.
142. Dougan, H., Lyster, D. M., Vo, C. V., Stafford, A., Weitz, J. I., and Hobbs, J. B. (2000) Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood, *Nucl Med Biol* 27, 289-297.
143. Marro, M. L., Daniels, D. A., McNamee, A., Andrew, D. P., Chapman, T. D., Jiang, M. S., Wu, Z., Smith, J. L., Patel, K. K., and Gearing, K. L. (2005) Identification of potent and selective RNA antagonists of the IFN-gamma-inducible CXCL10 chemokine, *Biochemistry* 44, 8449-8460.
144. Pan, W., Craven, R. C., Qiu, Q., Wilson, C. B., Wills, J. W., Golovine, S., and Wang, J. F. (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11509-11513.

145. Patel, D. J., Suri, A. K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R. A., and Nonin, S. (1997) Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes, *J Mol Biol* 272, 645-664.
146. Hermann, T., and Patel, D. J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Science* 287, 820-825.
147. Deval, J., D'Abramo, C. M., Zhao, Z., McCormick, S., Coutsinos, D., Hess, S., Kvaratskhelia, M., and Gotte, M. (2007) High resolution footprinting of the hepatitis C virus polymerase NS5B in complex with RNA, *J Biol Chem* 282, 16907-16916.
148. Long, S. B., Long, M. B., White, R. R., and Sullenger, B. A. (2008) Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin, *RNA* 14, 2504-2512.
149. Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C. Y., Montelione, G. T., and Krug, R. M. (1999) RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids, *RNA* 5, 195-205.
150. Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E. E., Gibson, T., Boni, I., and Gold, L. (1995) High-affinity RNA ligands to Escherichia coli ribosomes and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites, *Biochemistry* 34, 3640-3648.
151. Convery, M. A., Rowsell, S., Stonehouse, N. J., Ellington, A. D., Hirao, I., Murray, J. B., Peabody, D. S., Phillips, S. E., and Stockley, P. G. (1998) Crystal structure of an RNA aptamer-protein complex at 2.8 Å resolution, *Nat Struct Biol* 5, 133-139.
152. Jing, N., Rando, R. F., Pommier, Y., and Hogan, M. E. (1997) Ion selective folding of loop domains in a potent anti-HIV oligonucleotide, *Biochemistry* 36, 12498-12505.
153. Phan, A. T. (2010) Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences, *FEBS J* 277, 1107-1117.
154. Andreola, M. L., Pileur, F., Calmels, C., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., Toulme, J. J., and Litvak, S. (2001) DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display in vitro antiviral activity, *Biochemistry* 40, 10087-10094.

155. Kulbachinskiy, A. V. (2007) Methods for selection of aptamers to protein targets, *Biochemistry (Mosc)* 72, 1505-1518.
156. Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A., and Feigon, J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3745-3749.
157. Gopinath, S. C. (2009) Mapping of RNA-protein interactions, *Anal Chim Acta* 636, 117-128.
158. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.
159. Kikin, O., D'Antonio, L., and Bagga, P. S. (2006) QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences, *Nucleic Acids Research* 34, W676-682.
160. Forster, C., Brauer, A. B., Brode, S., Schmidt, K. S., Perbandt, M., Meyer, A., Rypniewski, W., Betzel, C., Kurreck, J., Furste, J. P., and Erdmann, V. A. (2006) Comparative crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of locked nucleic acid and RNA stems of a tenascin C-binding aptamer, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62, 665-668.
161. Kelly, J. A., Feigon, J., and Yeates, T. O. (1996) Reconciliation of the X-ray and NMR structures of the thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG), *J Mol Biol* 256, 417-422.
162. Schneider, C., and Suhnel, J. (1999) A molecular dynamics simulation of the flavin mononucleotide-RNA aptamer complex, *Biopolymers* 50, 287-302.
163. Soukup, G. A., and Breaker, R. R. (1999) Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA, *RNA* 5, 1308-1325.
164. Ulrich, H., Trujillo, C. A., Nery, A. A., Alves, J. M., Majumder, P., Resende, R. R., and Martins, A. H. (2006) DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications, *Comb Chem High Throughput Screen* 9, 619-632.
165. Keefe, A. D., Pai, S., and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics, *Nat Rev Drug Discov.* 9, 537-550.

166. Healy, J. M., Lewis, S. D., Kurz, M., Boomer, R. M., Thompson, K. M., Wilson, C., and McCauley, T. G. (2004) Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions, *Pharm Res* 21, 2234-2246.
167. Kawaguchi, T., Asakawa, H., Tashiro, Y., Juni, K., and Sueishi, T. (1995) Stability, specific binding activity, and plasma concentration in mice of an oligodeoxynucleotide modified at 5'-terminal with poly(ethylene glycol), *Biol Pharm Bull* 18, 474-476.
168. Watson, S. R., Chang, Y. F., O'Connell, D., Weigand, L., Ringquist, S., and Parma, D. H. (2000) Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10, 63-75.
169. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliensky, V., Limmer, S., Manoharan, M., and Vornlocher, H. P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs, *Nature* 432, 173-178.
170. Rusconi, C. P., Roberts, J. D., Pitoc, G. A., Nimjee, S. M., White, R. R., Quick, G., Jr., Scardino, E., Fay, W. P., and Sullenger, B. A. (2004) Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo, *Nat Biotechnol* 22, 1423-1428.
171. Armstrong, J. K., Hempel, G., Koling, S., Chan, L. S., Fisher, T., Meiselman, H. J., and Garratty, G. (2007) Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients, *Cancer* 110, 103-111.
172. Henry, S. P., Kim, T.W., Kramer-Stickland, K., Zanardi, T.A., Fey, R.A., and Levin A.A., (2008) Toxicologic Properties of 2-O-Methoxyethyl Chimeric Antisense Inhibitors in Animals and Man, In *Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications* (Crooke, S., T., Ed.) 2 ed., pp 327-364, ISIS Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, California, USA.
173. Bouchard, P. R., Hutabarat, R. M., and Thompson, K. M. (2010) Discovery and development of therapeutic aptamers, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 237-257.

174. Chen, C. H., Chernis, G. A., Hoang, V. Q., and Landgraf, R. (2003) Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9226-9231.
175. Hale, S. P., and Schimmel, P. (1996) Protein synthesis editing by a DNA aptamer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2755-2758.
176. Shum, K. T., and Tanner, J. A. (2008) Differential inhibitory activities and stabilisation of DNA aptamers against the SARS coronavirus helicase, *Chembiochem* 9, 3037-3045.
177. Sheehan, J. P., and Lan, H. C. (1998) Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex, *Blood* 92, 1617-1625.
178. Rusconi, C. P., Scardino, E., Layzer, J., Pitoc, G. A., Ortel, T. L., Monroe, D., and Sullenger, B. A. (2002) RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa, *Nature* 419, 90-94.
179. Chan, M. Y., Cohen, M. G., Dyke, C. K., Myles, S. K., Aberle, L. G., Lin, M., Walder, J., Steinhubl, S. R., Gilchrist, I. C., Kleiman, N. S., Vorchheimer, D. A., Chronos, N., Melloni, C., Alexander, J. H., Harrington, R. A., Tonkens, R. M., Becker, R. C., and Rusconi, C. P. (2008) Phase 1b randomized study of antidote-controlled modulation of factor IXa activity in patients with stable coronary artery disease, *Circulation* 117, 2865-2874.
180. Huang, R. H., Fremont, D. H., Diener, J. L., Schaub, R. G., and Sadler, J. E. (2009) A structural explanation for the antithrombotic activity of ARC1172, a DNA aptamer that binds von Willebrand factor domain A1, *Structure* 17, 1476-1484.
181. Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schatzl, H. M., Winnacker, E. L., and Famulok, M. (2002) Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation, *Chembiochem* 3, 717-725.
182. White, R. R., Shan, S., Rusconi, C. P., Shetty, G., Dewhirst, M. W., Kontos, C. D., and Sullenger, B. A. (2003) Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5028-5033.

183. Aurup, H., Williams, D. M., and Eckstein, F. (1992) 2'-Fluoro- and 2'-amino-2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates as substrates for T7 RNA polymerase, *Biochemistry* 31, 9636-9641.
184. Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr., Feinsod, M., and Guyer, D. R. (2004) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration, *N Engl J Med* 351, 2805-2816.
185. James, W. (2007) Aptamers in the virologists' toolkit, *J Gen Virol* 88, 351-364.
186. Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Jr., Guyer, D. R., and Adamis, A. P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat Rev Drug Discov* 5, 123-132.
187. Maberley, D. (2005) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration, *Issues Emerg Health Technol*, 1-4.
188. Bless, N. M., Smith, D., Charlton, J., Czermak, B. J., Schmal, H., Friedl, H. P., and Ward, P. A. (1997) Protective effects of an aptamer inhibitor of neutrophil elastase in lung inflammatory injury, *Curr Biol* 7, 877-880.
189. Mann, A. P., Somasunderam, A., Nieves-Alicea, R., Li, X., Hu, A., Sood, A. K., Ferrari, M., Gorenstein, D. G., and Tanaka, T. (2010) Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: potential application for inflamed vasculature targeting, *PLoS One* 5.
190. Wurster, S. E., Bida, J. P., Her, Y. F., and Maher, L. J., 3rd. (2009) Characterization of anti-NF-kappaB RNA aptamer-binding specificity in vitro and in the yeast three-hybrid system, *Nucleic Acids Res* 37, 6214-6224.
191. Biesecker, G., Dihel, L., Enney, K., and Bendele, R. A. (1999) Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5, *Immunopharmacology* 42, 219-230.
192. Ishizaki, J., Nevins, J. R., and Sullenger, B. A. (1996) Inhibition of cell proliferation by an RNA ligand that selectively blocks E2F function, *Nat Med* 2, 1386-1389.
193. Hicke, B. J., Marion, C., Chang, Y. F., Gould, T., Lynott, C. K., Parma, D., Schmidt, P. G., and Warren, S. (2001) Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein, *J Biol Chem* 276, 48644-48654.

194. Ireson, C. R., and Kelland, L. R. (2006) Discovery and development of anticancer aptamers, *Mol Cancer Ther* 5, 2957-2962.
195. Lee, S. W., and Sullenger, B. A. (1996) Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that selectively blocks autoantibody binding to insulin receptors on human lymphocytes, *J Exp Med* 184, 315-324.
196. Lee, S. W., and Sullenger, B. A. (1997) Isolation of a nuclease-resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies, *Nat Biotechnol* 15, 41-45.
197. Seo, H. S., and Lee S. W., (2000) In vitro selection of the 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide decoy RNA inhibitor of myasthenia autoantibodies., *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 7070-7073.
198. White, R. R., Sullenger, B. A., and Rusconi, C. P. (2000) Developing aptamers into therapeutics, *J Clin Invest* 106, 929-934.
199. Famulok, M., and Verma, S. (2002) In vivo-applied functional RNAs as tools in proteomics and genomics research, *Trends Biotechnol* 20, 462-466.
200. Good, P. D., Krikos, A. J., Li, S. X., Bertrand, E., Lee, N. S., Giver, L., Ellington, A., Zaia, J. A., Rossi, J. J., and Engelke, D. R. (1997) Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei, *Gene Ther* 4, 45-54.
201. Usman, N., and Blatt, L. M. (2000) Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics, *J Clin Invest* 106, 1197-1202.
202. Chakravarthy, U., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr., Goldbaum, M., Guyer, D. R., Katz, B., and Patel, M. (2006) Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration, *Ophthalmology* 113, 1508 e1501-1525.
203. Bates, P. J., Laber, D. A., Miller, D. M., Thomas, S. D., and Trent, J. O. (2009) Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer, *Exp Mol Pathol* 86, 151-164.
204. Bates, P. J., Kahlon, J. B., Thomas, S. D., Trent, J. O., and Miller, D. M. (1999) Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding, *J Biol Chem* 274, 26369-26377.
205. Teng, Y., Girvan, A. C., Casson, L. K., Pierce, W. M., Jr., Qian, M., Thomas, S. D., and Bates, P. J. (2007) AS1411 alters the localization of a complex

- containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin, *Cancer Res* 67, 10491-10500.
206. Yu, D., Wang, D., Zhu, F. G., Bhagat, L., Dai, M., Kandimalla, E. R., and Agrawal, S. (2009) Modifications incorporated in CpG motifs of oligodeoxynucleotides lead to antagonist activity of toll-like receptors 7 and 9, *J Med Chem* 52, 5108-5114.
207. Cooper, C. L., Ahluwalia, N. K., Efler, S. M., Vollmer, J., Krieg, A. M., and Davis, H. L. (2008) Immunostimulatory effects of three classes of CpG oligodeoxynucleotides on PBMC from HCV chronic carriers, *J Immune Based Ther Vaccines* 6, 3.
208. Krieg, A. M. (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, *Nat Rev Drug Discov* 5, 471-484.
209. Krieg, A. M. (2008) Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer, *Oncogene* 27, 161-167.
210. Goebel, N., Berridge, B., Wroblewski, V. J., and Brown-Augsburger, P. L. (2007) Development of a sensitive and specific in situ hybridization technique for the cellular localization of antisense oligodeoxynucleotide drugs in tissue sections, *Toxicol Pathol* 35, 541-548.
211. Sayyed, S. G., Hagele, H., Kulkarni, O. P., Endlich, K., Segerer, S., Eulberg, D., Klussmann, S., and Anders, H. J. (2009) Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes, *Diabetologia* 52, 2445-2454.
212. Kulkarni, O., Pawar, R. D., Purschke, W., Eulberg, D., Selve, N., Buchner, K., Ninichuk, V., Segerer, S., Vielhauer, V., Klussmann, S., and Anders, H. J. (2007) Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice, *J Am Soc Nephrol* 18, 2350-2358.
213. Maasch, C., Buchner, K., Eulberg, D., Vonhoff, S., and Klussmann, S. (2008) Physicochemical stability of NOX-E36, a 40mer L-RNA (Spiegelmer) for therapeutic applications, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 61-62.

214. Hicke, B. J., Stephens, A. W., Gould, T., Chang, Y. F., Lynott, C. K., Heil, J., Borkowski, S., Hilger, C. S., Cook, G., Warren, S., and Schmidt, P. G. (2006) Tumor targeting by an aptamer, *J Nucl Med* 47, 668-678.
215. Herr, J. K., Smith, J. E., Medley, C. D., Shangguan, D., and Tan, W. (2006) Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells, *Anal Chem* 78, 2918-2924.
216. Jeon, S. H., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T., and Arnon, R. (2004) A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin, *J Biol Chem* 279, 48410-48419.
217. Gopinath, S. C., Misono, T. S., Kawasaki, K., Mizuno, T., Imai, M., Odagiri, T., and Kumar, P. K. (2006) An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion, *J Gen Virol* 87, 479-487.
218. Guthrie, J. W., Hamula, C. L., Zhang, H., and Le, X. C. (2006) Assays for cytokines using aptamers, *Methods* 38, 324-330.
219. Hicke, B. J., and Stephens, A. W. (2000) Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy, *J Clin Invest* 106, 923-928.
220. Tang, Z., Shangguan, D., Wang, K., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H. W., Li, Y., and Tan, W. (2007) Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells, *Anal Chem* 79, 4900-4907.
221. Daniels, D. A., Chen, H., Hicke, B. J., Swiderek, K. M., and Gold, L. (2003) A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15416-15421.
222. Drolet, D. W., Moon-McDermott, L., and Romig, T. S. (1996) An enzyme-linked oligonucleotide assay, *Nat Biotechnol* 14, 1021-1025.
223. Goldstein, E., Donovan, R. M., and Dickover, R. (1990) Laboratory tests used in diagnosis and treatment of AIDS, *Bratisl Lek Listy* 91, 747-752.
224. Czepiel, J., Biesiada, G., and Mach, T. (2008) Viral hepatitis C, *Pol Arch Med Wewn* 118, 734-740.
225. Xie, L., Wu, X. D., Huang, D. Z., Chen, H. L., He, L. X., Wang, J., and Han, D. K. (2007) Clinical application and analysis of hepatitis C virus NS3 antigen detection by ELISA in human serum, *Chin Med J (Engl)* 120, 294-299.

226. Amano, Y., and Cheng, Q. (2005) Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors, *Anal Bioanal Chem* 381, 156-164.
227. Torres-Chavolla, E., and Alocilja, E. C. (2009) Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens, *Biosens Bioelectron* 24, 3175-3182.
228. Tang, Z., Parekh, P., Turner, P., Moyer, R. W., and Tan, W. (2009) Generating aptamers for recognition of virus-infected cells, *Clin Chem* 55, 813-822.
229. Kumar, P. K., Machida, K., Urvil, P. T., Kakiuchi, N., Vishnuvardhan, D., Shimotohno, K., Taira, K., and Nishikawa, S. (1997) Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA, *Virology* 237, 270-282.
230. Gottwein, J. M., and Bukh, J. (2008) Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems, *Adv Virus Res* 71, 51-133.
231. Bellecave, P., and Moradpour, D. (2008) A fresh look at interferon-alpha signaling and treatment outcomes in chronic hepatitis C, *Hepatology* 48, 1330-1333.
232. Sarasin-Filipowicz, M., Oakeley, E. J., Duong, F. H., Christen, V., Terracciano, L., Filipowicz, W., and Heim, M. H. (2008) Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7034-7039.
233. Seme, K., Poljak, M., Babic, D. Z., Mocilnik, T., and Vince, A. (2005) The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review, *J Clin Virol* 32, 92-101.
234. Schiff, E. R., de Medina, M., and Kahn, R. S. (1999) New perspectives in the diagnosis of hepatitis C, *Semin Liver Dis* 19 Suppl 1, 3-15.
235. Menegazzi, P., Reho, E., Ulivi, M., Varnier, O. E., Lillo, F. B., and Tagliaferro, L. (2008) Rapid and accurate quantification of different HCV genotypes by LightCycler Real Time PCR and direct sequencing of HCV amplicons, *New Microbiol* 31, 181-187.
236. Cock De, L., Hutse, V., and Vranckx, R. (2005) Correlation between detection of antibodies against hepatitis C virus in oral fluid and hepatitis C virus RNA in serum, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24, 566-568.

237. Bouvier-Alias, M., Patel, K., Dahari, H., Beaucourt, S., Larderie, P., Blatt, L., Hezode, C., Picchio, G., Dhumeaux, D., Neumann, A. U., McHutchison, J. G., and Pawlotsky, J. M. (2002) Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication, *Hepatology* 36, 211-218.
238. Chen, F., Hu, Y., Li, D., Chen, H., and Zhang, X. L. (2009) CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2, *PLoS One* 4, e8142.
239. Fukuda, K., Vishnuvardhan, D., Sekiya, S., Hwang, J., Kakiuchi, N., Taira, K., Shimotohno, K., Kumar, P. K., and Nishikawa, S. (2000) Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease, *Eur J Biochem* 267, 3685-3694.
240. Bellecave, P., Cazenave, C., Rumi, J., Staedel, C., Cosnefroy, O., Andreola, M. L., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., and Astier-Gin, T. (2008) Inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase by DNA aptamers: mechanism of inhibition of in vitro RNA synthesis and effect on HCV-infected cells, *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2097-2110.
241. Jones, L. A., Clancy, L. E., Rawlinson, W. D., and White, P. A. (2006) High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity, *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3019-3027.
242. Tallet-Lopez, B., Aldaz-Carroll, L., Chabas, S., Dausse, E., Staedel, C., and Toulme, J. J. (2003) Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation, *Nucleic Acids Res* 31, 734-742.
243. Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Kuno, A., Hasegawa, T., and Nishikawa, S. (2005) A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain IIIId, *Nucleic Acids Res* 33, 683-692.
244. Konno, K., Nishikawa, S., Hasegawa, T., and Fukuda, K. (2007) Isolation of RNA aptamers specific for the HCV minus-IRES domain I, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 393-394.

245. Feng, H., and Hu, K.-h. (2008) Aptamers against viral hepatitis: from rational design to practical application, 315-320.
246. Ghanem, A., Mayer, D., Chase, G., Tegge, W., Frank, R., Kochs, G., Garcia-Sastre, A., and Schwemmle, M. (2007) Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase, *J Virol* 81, 7801-7804.
247. Ong, A. K., and Hayden, F. G. (2007) John F. Enders lecture 2006: antivirals for influenza, *J Infect Dis* 196, 181-190.
248. Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu Rev Biochem* 69, 531-569.
249. Cheng, C., Dong, J., Yao, L., Chen, A., Jia, R., Huan, L., Guo, J., Shu, Y., and Zhang, Z. (2008) Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX, *Biochem Biophys Res Commun* 366, 670-674.
250. Tan, G. T., Wickramasinghe, A., Verma, S., Singh, R., Hughes, S. H., Pezzuto, J. M., Baba, M., and Mohan, P. (1992) Potential anti-AIDS naphthalenesulfonic acid derivatives. Synthesis and inhibition of HIV-1 induced cytopathogenesis and HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase activities, *Journal of Medicinal Chemistry* 35 4846-4853.
251. Freeman, G. A., Andrews Iii, C. W., 3rd, Hopkins, A. L., Lowell, G. S., Schaller, L. T., Cowan, J. R., Gonzales, S. S., Koszalka, G. W., Hazen, R. J., Boone, L. R., Ferris, R. G., Creech, K. L., Roberts, G. B., Short, S. A., Weaver, K., Reynolds, D. J., Milton, J., Ren, J., Stuart, D. I., Stammers, D. K., and Chan, J. H. (2004) Design of non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with improved drug resistance properties. 2, *J Med Chem* 47, 5923-5936.
252. Kensch, O., Connolly, B. A., Steinhoff, H. J., McGregor, A., Goody, R. S., and Restle, T. (2000) HIV-1 reverse transcriptase-pseudoknot RNA aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity, *J Biol Chem* 275, 18271-18278.
253. Joshi, P., and Prasad, V. R. (2002) Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by template analog reverse transcriptase inhibitors derived by SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment), *J Virol* 76, 6545-6557.

254. Khati, M., Schuman, M., Ibrahim, J., Sattentau, Q., Gordon, S., and James, W. (2003) Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'F-RNA aptamers, *J Virol* 77, 12692-12698.
255. Wyatt, J. R., Vickers, T. A., Roberson, J. L., Buckheit, R. W., Jr., Klimkait, T., DeBaets, E., Davis, P. W., Rayner, B., Imbach, J. L., and Ecker, D. J. (1994) Combinatorially selected guanosine-quartet structure is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus envelope-mediated cell fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1356-1360.
256. Yamamoto, R., Katahira, M., Nishikawa, S., Baba, T., Taira, K., and Kumar, P. K. (2000) A novel RNA motif that binds efficiently and specifically to the Ttat protein of HIV and inhibits the trans-activation by Tat of transcription in vitro and in vivo, *Genes Cells* 5, 371-388.
257. Minunni, M., Tombelli, S., Gullotto, A., Luzi, E., and Mascini, M. (2004) Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein, *Biosens Bioelectron* 20, 1149-1156.
258. Tombelli, S., Minunni, M., Luzi, E., and Mascini, M. (2005) Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein, *Bioelectrochemistry* 67, 135-141.
259. Lee, S., Kim, Y. S., Jo, M., Jin, M., Lee, D. K., and Kim, S. (2007) Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen, *Biochem Biophys Res Commun* 358, 47-52.
260. Hwang, B., Cho, J. S., Yeo, H. J., Kim, J. H., Chung, K. M., Han, K., Jang, S. K., and Lee, S. W. (2004) Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus, *RNA* 10, 1277-1290.
261. DeStefano, J. J., and Cristofaro, J. V. (2006) Selection of primer-template sequences that bind human immunodeficiency virus reverse transcriptase with high affinity, *Nucleic Acids Res* 34, 130-139.
262. Jang, K. J., Lee, N. R., Yeo, W. S., Jeong, Y. J., and Kim, D. E. (2008) Isolation of inhibitory RNA aptamers against severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/Helicase, *Biochem Biophys Res Commun* 366, 738-744.

263. Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Panke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stocklein, W., Dahmen, C., Pauli, G., and Kage, A. (2007) One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX, *BMC Biotechnol* 7, 48.
264. Smith, W. W. (1954) Occurrence of "stem pitting" and necrosis in some body stocks of apple trees, *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 63, 101-113.
265. Jelkmann, W. (1994) Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses, *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1535-1542.
266. Martelli, G. P., and Jelkmann, W. (1998) Foveavirus, a new plant virus genus, *Arch Virol* 143, 1245-1249.
267. Koganezawa H., M. B. (1989) A New Type of Elongated Virus Isolated from Apple Trees Containing the Stem Pitting Agent, *Japan. Plant Dis.* 74 610-614.
268. Németh, M. (1986) *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*, Akadémiai kiadó, Budapest.
269. Yoshikawa N., M. H., Oda Y., Isogai M. and Takahashi T. (2001) Genome heterogeneity of apple stem pitting virus in apple trees, *Acta Hort. (ISHS)* 550, 285-290.
270. Yanase H., a. Y. A. (1982) *Malus sieboldii* MO-65 as a new indicator plant for apple stem pitting virus, *Bull. Fruit Tree Res.* C9, 69-77.
271. Komorowska, B., Malinowski, T., and Michalczyk, L. (2010) Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of Apple stem pitting virus, *J Virol Methods* 168, 242-247.
272. MacKenzie Donald J. , M. M. A., Mukerji Srma , Green Margaret (1997) Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *Plant Disease* 81, 222-226.
273. Kummert J, M. V. L. A., Rufflard G. (1998) Sensitive detection of apple stem grooving and applestem spitting viruses from infected apple trees by RT-PCR, *Acta Horticulturae* 472, 97-104.

274. Klerks, M. M., Leone, G., Lindner, J. L., Schoen, C. D., and van den Heuvel, J. F. J. M. (2001) Rapid and sensitive detection of Apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons, *Phytopathology* 91, 1085-1091.
275. Kummert, J., Malice, M., Marbot, S., Lepoivre, P., Steyer, S. and Oger, R. . (2004) Sampling protocols and risk of error significance in molecular detection tests for fruit trees certification, *Acta Hort. (ISHS)* 657, 541-546.
276. Gugerli, P., Ramel, M.E. (2004) Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of apple stem pitting and pear yellow vein viruses in apple and pear, *Acta Hort. (ISHS)* 657, 59-69.
277. Paunović, S. a. J., D. (2008) Comparative results of detection of pome fruit viruses by different methods., *Acta Hort. (ISHS)* 781, 147-154.
278. Malionwski T, K. B., Gokis T. (1998) Detection of apple stem spitting virus and pear vein yellow virus using reverse transcription polymerase chain reaction, *Acta Horticulturae* 472, 87-95.
279. Schwarz K, J. W. (1998) Detection and characterization of European apple stem spitting virus isolates of apple and pear by PCR and partial sequence analysis, *Acta Horticulturae* 472, 75-86.
280. Menzel, W., Zahn, V., and Maiss, E. (2003) Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses, *J Virol Methods* 110, 153-157.
281. Croft, H., Malinowski, T., Krizbai, L., Mikec, I., Kajic, V., Reed, C., Varga, A., and James, D. (2008) Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus, *J Virol Methods* 153, 203-213.
282. Balamurugan, S., Obubuafo, A., McCarley, R. L., Soper, S. A., and Spivak, D. A. (2008) Effect of linker structure on surface density of aptamer monolayers and their corresponding protein binding efficiency, *Anal Chem* 80, 9630-9634.
283. Lautner, G., Balogh, Z., Bardoczy, V., Meszaros, T., and Gyurcsanyi, R. E. (2010) Aptamer-based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging, *Analyst* 135, 918-926.

284. Gatto, B., Palumbo, M., and Sissi, C. (2009) Nucleic acid aptamers based on the G-quadruplex structure: therapeutic and diagnostic potential, *Curr Med Chem* 16, 1248-1265.
285. Reina, J., Padilla, E., Alonso, F., Ruiz De Gopegui, E., Munar, M., and Mari, M. (2002) Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (directigen flu A+B) for simultaneous and differential detection of influenza a and B virus antigens from respiratory samples, *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3515-3517.
286. Nadala, E. C. B., and Loh, P. C. (2000) Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp, *J Virol Methods* 84, 175-179.
287. Papamichael, K. I., Kreuzer, M. P., and Guilbault, G. G. (2007) Viability of allergy (IgE) detection using an alternative aptamer receptor and electrochemical means, *Sensor Actuat B-Chem* 121, 178-186.
288. Ikebukuro, K., Kiyohara, C., and Sode, K. (2004) Electrochemical detection of protein using a double aptamer sandwich, *Anal Lett* 37, 2901-2909.
289. Vivekananda, J., and Kiel, J. L. (2006) Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by aptamer-linked immobilized sorbent assay, *Lab Invest* 86, 610-618.