

Módszerfejlesztések diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelekciójához

Doktori értekezés

Tolnai Zoltán János

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Hegyesi Hargita, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Wunderlich Lívius, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Varga Gábor, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ambrus Attila, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Egyed Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2021

Rövidítések jegyzéke	5
1. Irodalmi háttér	7
1.1. Bevezetés	7
1.2. Az aptamerek és a SELEX megjelenése	8
1.3. SELEX-hez kapcsolódó módosítások és módszerfejlesztések	10
1.3.1. A kiindulási oligonukleotid könyvtár szerepe.....	10
1.3.2. Módszerfejlesztések nagy affinitással és specificitással rendelkező aptamerek szelektálására	13
1.3.3. SELEX módszerben történt változtatások	14
1.4. Oligonukleotidok amplifikálásában, egyszálúsításában történt módszerfejlesztések 16	
1.4.1. Oligonukleotid könyvtárak amplifikálása PCR-rel	16
1.4.2. DNS egyszálúsítási technikák.....	20
1.4.2.1. Alkalikus denaturáció	22
1.4.2.2. Lambda exonukleáz emésztés.....	23
1.4.2.3. Méretkülönbség alapján történő elválasztás	25
1.4.2.4. Aszimmetrikus PCR.....	27
1.5. A SELEX ellenőrzése.....	29
1.5.1. A szelekció előrehaladtának ellenőrzése	29
1.5.2. Aptamer jelöltek ellenőrzése	31
1.6. Aptamerek felhasználása	34
1.7. Kardiovaszkuláris betegségek biomarkerei.....	36
1.7.1. Nátriuretikus peptidek	37
1.7.2. Kardiális troponin I fehérje.....	39
2. Célkitűzések	41
3. Módszerek	42
3.1. Célfehérjék előállítása	46
3.1.1. ProBNP fehérje előállításához szükséges vektor konstrukció létrehozása	46
3.1.2. ProBNP fehérje termeltetése <i>E. coli</i> BL21 autoindukciós rendszerben	48
3.1.3. cTnI, sTnI és proBNP fehérje előállítása <i>in vitro</i> translációs rendszerben.....	49
3.1.3.1. mRNS készítése, tisztítása és ellenőrzése	49
3.1.3.2. In vitro transláció	51
3.1.4. Fehérje tisztítás	51
3.1.5. Fehérjék ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel	51

3.1.6.	Fehérjék ellenőrzése Western blot módszerrel	52
3.2.	Fehérje specifikus aptamerek és spiegelmerok szelekciója	53
3.2.1.	proBNP specifikus aptamer szelektálása SELEX módszerrel	53
3.2.1.1.	SELEX célmolekuláinak kapcsolása mágneses gyöngyhöz.....	53
3.2.1.2.	SELEX	55
3.3.	Primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR).....	59
3.3.1.	PBA-PCR optimalizálása.....	59
3.3.2.	Az ssDNS hővel történő tisztítása PBA-PCR termékből	60
3.3.3.	PBA-PCR termék új generációs szekvenáltatása	61
3.3.4.	Aptamerek előállítás PBA-PCR-rel és lambda exonukleáz kezeléssel	61
3.3.5.	Aptamer jelöltek ellenőrzése Alpha módszerrel	62
3.3.6.	SELEX előrehaladtának ellenőrzése AlphaScreen módszerrel	63
3.4.	Spiegelmer alapú szendvics típusú mérés.....	63
3.4.1.	Spiegelmerok ellenőrzése biolayer interferometria módszerrel	63
3.4.1.	Spiegelmer alapú szendvics mérés ellenőrzése Alpha módszerrel.....	63
4.	Eredmények.....	65
4.1.	Primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR).....	65
4.2.	PBA-PCR optimalizálása.....	66
4.3.	Random oligonukleotid könyvtárak amplifikálása PBA-PCR-rel.....	70
4.4.	PBA-PCR alkalmazása aptamerek szűrésére és a szelekció ellenőrzésére.....	72
4.4.1.	SELEX-ben használt célmolekulák előkészítése és ellenőrzése	73
4.4.2.	ProBNP specifikus aptamerek szelektálása SELEX módszerrel.....	74
4.4.3.	AlphaScreen mérésben használt proBNP előállítása <i>E. coli</i> expressziós rendszerben.....	75
4.4.4.	PBA-PCR-rel előállított aptamer jelöltek tesztelése AlphaScreen módszerrel....	76
4.4.5.	SELEX előrehaladtának ellenőrzése AlphaScreen módszerrel	80
4.5.	Spiegelmerok szelektálása és előszűrése	82
4.5.1.	Spiegelmerok ellenőrzése biolayer interferometria módszerrel	84
4.5.2.	Spiegelmerok alkalmazása szendvics típusú mérési rendszerben	85
4.5.3.	cTnI koncentráció meghatározása spiegelmer alapú szendvics mérésben	88
5.	Megbeszélés	90
5.1.	Primer blokkolt aszimmetrikus PCR	90
5.2.	Primer blokkolt aszimmetrikus PCR felhasználása.....	94

5.3. Spiegelmer alapú szendvics mérés AlphaLisa rendszerben	96
6. Következtetések	100
7. Összefoglalás.....	102
8. Summary	103
9. Irodalomjegyzék.....	104
10. Saját publikációk jegyzéke.....	122
11. Köszönetnyilvánítás	124
12. Függelék.....	125

Rövidítések jegyzéke

Alpha	„Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay”
AMI	Akut miokardiális infarktus
ANP	A-típusú nátriuretikus peptid
APS	ammónium-perszulfát
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BLI	biolayer interferometria
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
BSA	marha szérumalbumin
CCL2	monocita kemoattraktáns protein-1
PECAM-1	vérlemezke-endotél sejtadhéziós molekula
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CNP	C-típusú nátriuretikus peptid
cTnI	kardiális troponin I
CTP	citozin-trifoszfát
CXCL12	sztróma-sejt eredetű faktor-1 α
ddPCR	droplet digitális PCR
DEPC	dietil-pirokarbonát
dIdC	poli-(dezoxi-inozin-dezoxi-citidin)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotid-trifoszfát
dsDNS	duplaszálú DNS
DTT	ditiotreitól
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EdU	C5-etinil-2' dezoxiuridin
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ELONA	„Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay”
ESC	Európai Kardiológiai Társaság
FAM	fluoreszcein-foszforamidit
GST	glutation-S-transzferáz
GTP	guanozin-trifoszfát
HER-2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
hexaHIS	6 db hisztidint tartalmazó címke
HGFR	hepatocita növekedési faktor receptor
Kd	disszociációs konstans
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LNA	zárt nukleinsav
mRNS	hírvivő RNS

MST	mikroskálás termoforézis
NGS	új generációs szekvenálás
NP	nátriuretikus peptid
NPR-A	NP receptor-A
NPR-B	NP receptor-B
NTP	nukleozid-trifoszfát
Nt-proBNP	N-terminális proBNP
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBA-PCR	primer blokkolt aszimmetrikus PCR
PBS	foszfátpufferes sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PEG	polietilén-glikol
preproBNP	szignálpeptidet tartalmazó proBNP előalak
proBNP	hasítatlan BNP hormon előalak
PVDF	poli(vinilidén-fluorid)
RFLP	restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
RNS	ribonukleinsav
rpm	fordulatszám/perc
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SELEX	„Systematic evolution of ligands by exponential enrichment”
SOMAmer	„Slow Off-rate Modified Aptamers”
SPR	felületi plazmonrezonancia
SSB fehérje	egyszálú DNS-kötő fehérje
ssDNS	egyszálú DNS
sTnI	vázizom eredetű troponin I
TAE	Tris-ecetsav-EDTA puffer oldat
TBE	Tris-bórsav-EDTA puffer oldat
TE	Tris-EDTA puffer oldat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
TFPI	szöveti faktor útvonal gátló
T _m	olvadáspont
TnC	troponin C
TnI	troponin I
TnT	troponin T
TTP	timidin-trifoszfát
UTP	uridin-trifoszfát
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGFR-2	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2
vWF	von Willebrand faktor
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. Irodalmi háttér

1.1. Bevezetés

Az orvostudomány fejlődésével egyre nagyobb jelentőséget kaptak a különböző diagnosztikai módszerek, melyek lehetővé teszik a betegségek korai stádiumban történő felismerését, valamint a kór pontos meghatározását. A pontosabb diagnózisnak köszönhetően a betegek hamarabb részesülhetnek megfelelő kezelésben, és a gyógyulás esélye szignifikánsan emelkedhet. A vírusok, baktériumok és betegségek fehérje biomarkereinek kimutatására alkalmas immundiagnosztikai módszerek fejlődése és szerepe az elmúlt évtizedekben szintén jelentősen nőtt. A méréshez szükséges antitestek előállítása történhet élő állatokban, valamint hibridóma sejtkultúrában. Az ellenanyagok korlátozott alkalmazhatósága részben a termeltetés körülményeiből adódik, mivel az antitestek termelődése csak immunogén anyagok hatására történik meg, így immunválaszt nem indukáló antigének kimutatására immundiagnosztikai módszer nem fejleszthető. Emellett a toxikus anyagok a termeltetésért felelős gazdaszervezetet vagy sejtenyészetet elpusztíthatják, ami szintén sikertelen ellenanyag-termeltetést eredményez. Az antitestek előállítása időigényes és költséges, továbbá az azonos antigénre *in vivo* termeltetett ellenanyagok eltérő minőségűek lehetnek, ami a mérések reprodukálhatóságát befolyásolhatja. Az antitestek további hátránya, hogy fehérje szerkezete környezeti hatásokra rendkívül érzékeny, így jelentősen befolyásolhatja az alkalmazható mérés körülményeit és a receptor molekula tárolhatóságát.

Az antitestek felsorolt hátrányai szükségszerűvé tették újabb, biomarkerek kimutatására is alkalmas receptorok fejlesztését. Ennek a célnak megfelelően az aptamer néven ismertté vált, olyan egyszálú oligonukleotidok, melyek az antitestekhez hasonló affinitással és szelektivitással képesek célmolekulájukhoz kapcsolódni. Receptormolekulaként való alkalmazásuk alternatívát nyújthat diagnosztikai rendszerek fejlesztéséhez, mivel előállításuk *in vitro* biológiai módszerekkel történik, építőkövei pedig nukleotidok, így használatukkor az immundiagnosztikai módszereket korlátozó tényezők kevésbé érvényesülnek. Az aptamerek széleskörű alkalmazása az 1990-es leírásuk óta azonban nem valósult meg. Ez részben azzal magyarázható, hogy a meglévő diagnosztikai rendszerek többsége jól sztenderizált, erős piaci pozíciókkal

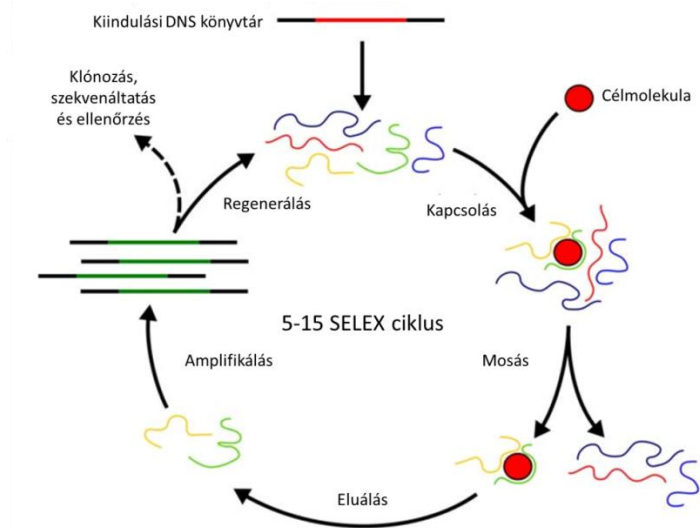
rendelkező, antitestes mérésen alapul, ami hátráltatja az újabb receptor típusok elterjedését. Emellett az aptamerek nem megfelelő, azaz csak ideális körülmények között történő karakterizálásából adódó pontatlanságok gyakorlati jelentőséggel nem rendelkező aptamerek publikálásához vezettek, ami végső soron rontotta a beléjük vetett bizalmat. Az aptamerek fejlesztéséhez és karakterizálásához szükséges egyedi és kevert DNS mintából történő egyszálú oligonukleotidok laboratóriumi előállítása sokszor nehézségekbe ütközik. Mindezek alapján várható, hogy az aptamerek előállításához szükséges molekuláris biológiai módszerek továbbfejlesztése, valamint a szelektált aptamerek pontosabb, valós mintában végzett tesztelése nagyban hozzájárulhat a diagnosztikai rendszerekben történő elterjedésükhöz.

1.2. Az aptamerek és a SELEX megjelenése

1990-ben két kutatócsoport egymástól függetlenül írt le célmolekulákhoz szelektíven kapcsolódni képes oligonukleotidokat. Tuerk és Gold a gp43 T4 DNS polimerázhoz kapcsolódó aptamereket szelektált egy 8 nukleotid hosszúságú randomizált régiót tartalmazó RNS könyvtárból, az általuk elnevezett SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) módszerrel. Az eljárás során a random RNS könyvtárat a gp43 T4 DNS polimerázzal inkubálták, majd a nem kötődő szekvenciákat eltávolították a fehérjéhez kapcsolódó oligonukleotidoktól. Az RNS könyvtár random régióját határoló szekvencia T7 promotert és primerkötő részt kódolt, ennek segítségével az RNS könyvtárról reverse transzkripcióval előállított ssDNS-t PCR-rel amplifikálták, a keletkezett dsDNS-ről az RNS könyvtárat egy transzkripció lépésben regenerálták T7 RNS polimeráz segítségével. A célmolekulával történő inkubálást, a kötődő szekvenciák sokszorosítását és regenerálását több ciklusban ismételték, minek eredményeként a végső szűkített RNS könyvtárban a gp43 T4 DNS polimerázhoz kapcsolódó szekvenciák felszaporodtak. A negyedik SELEX ciklust követően a körülbelül 65 000 különböző szekvenciát tartalmazó kiindulási RNS könyvtárból már csak 16 szekvencia volt jelen nagyobb kópiaszámban, melyek maximum 4 nukleotidnyi eltérést mutattak a gp43 T4 DNS-t kötő eredeti szekvenciához képest [1].

Ellington és Szostak hasonlóképpen szelektált szerves festékekhez kötődő oligonukleotidokat, melyeket aptamereknek neveztek el, a kifejezést a latin „aptus”

illeszkedés és görög „meros” részecske szavak összevonásából alkották. A szelekcióhoz 100 nukleotid hosszú random régiót tartalmazó kiindulási RNS könyvtárat használtak, mely elméletben 10^{15} db különböző szekvenciát tartalmazott. 4-6 SELEX ciklust követően szintén azt tapasztalták, hogy a szűkített könyvtárakban feldúsultak a célmolekula-kötő szekvenciák. Míg a kiindulási könyvtár csupán 0,1%-a kapcsolódott a festékhez, addig a szelekció végén 50% fölött volt a kötődő aptamer aránya. 6 különböző festékre szelektált aptamer specificitását is ellenőrizték, és eredményeik alapján a szelektált oligonukleotidok fele kizárólag saját célmolekuláját ismerte fel [2]. A későbbiekben a szerves festékekre történő szelekciót megismételték DNS könyvtár használatával, ezzel bizonyítva, hogy ssDNS aptamerek is képesek szelektíven nagy affinitással kapcsolni célmolekulájukat [3]. Az ssDNS aptamerek előállításához használt SELEX ciklus regenerálási lépése az RNS aptamerekhez képest egyszerűsödött, mivel a kapcsolódott szekvenciák PCR-rel egyből amplifikálhatóvá váltak, a keletkezett termékből a szűkített ssDNS könyvtár regenerálása pedig egyszálúsítási lépéssel megoldható (1. ábra).



1. ábra. SELEX eljárás sematikus ábrázolása [4]. A SELEX kezdetén a kiindulási DNS könyvtárat a szelekció célmolekulával inkubálják, majd egy mosási lépéssel a nem, vagy csak gyengén kötődött oligonukleotidokat eltávolítják a rendszerből. A célmolekulához kapcsolódott aptamereket PCR-rel amplifikálják, majd egy regenerálási lépéssel ismét létrehozzák az immár szűkített egyszálú DNS könyvtárat. A SELEX ciklust 5-15 alkalommal megisméltik, míg a célmolekulájukat nagy affinitással kötő aptamerek feldúsulnak a végső szűkített DNS könyvtárban.

Az aptamereket leíró első cikkekből világossá vált milyen nagy lehetőség rejlik az *in vitro* előállítható, célmolekulájukat nagy affinitással kapcsoló oligonukleotidokban, és a későbbi közleményekben az is láthatóvá vált, hogy a SELEX eljárásához kapcsolódó módszerfejlesztések növelhetik az aptamer-szelekció hatékonyságát.

1.3. SELEX-hez kapcsolódó módosítások és módszerfejlesztések

1.3.1. A kiindulási oligonukleotid könyvtár szerepe

A szakirodalomban általános az egyetértés arról, hogy a kiindulási könyvtár minősége a szelekció sikerességének szempontjából meghatározó, hiszen a random régió maximális véletlenszerűsége biztosítja a megfelelő szekvencia diverzitást az aptamerek szelektálásához [5]. A DNS könyvtár tervezésének több fontos lépésével kapcsolatban azonban ellentétes eredmények születtek. A random régió ideális hosszát több tényező befolyásolja; túl rövid szekvencia esetén a könyvtár diverzitása nem megfelelő nagyságú, valamint bizonyos esetekben a kötődéshez szükséges másodlagos szerkezet sem tud kialakulni [6]. Legiewicz és munkatársai 6 különböző hosszúságú könyvtárral készítették szelekciót, eredményeik alapján az 50 és 70 nukleotid random régiót tartalmazó oligonukleotid könyvtárakból gyorsabban lehetett szelektálni jól működő aptamereket, mint a rövidebb könyvtárakból. Vizsgálataik alapján azonban a 90 nukleotidos random régió már túl hosszúnak bizonyult, a szelekció itt kevésbé volt hatékony [7]. Az aptamerek bioinformatikai elemzése ezeknek az eredményeknek ellentmond, a random régió mérete egy minimális hossz felett csak kismértékben befolyásolja a szelekció sikerességét, ezért általában elég a rövidebb, 30-40 nukleotid hosszúságú random régiót tartalmazó kiindulási könyvtár használata [8]. Mivel a hosszabb könyvtárak nehezebben amplifikálhatók, valamint az ezekből szelektált aptamerek előállítási költsége is nagyobb, a gyakorlatban a 30-50 bázis hosszúságú random régióból álló aptamerek terjedtek el [9]. Az oligonukleotid könyvtárak rögzített primerkötő szakaszainak tervezésével és a kötődésben betöltött szerepével a szakirodalomban szintén több közlemény is foglalkozik. Több esetben megfigyelték a primerkötő részt nem tartalmazó aptamerek erősebb [10] vagy éppen gyengébb [11] célmolekula-kötő affinitását. Ennek tudatában fejlesztettek ki olyan SELEX technológiákat, amelyeknél a szelekciós lépésben a primerkötő szakasz nem vesz részt

[12]. Bioinformatikai elemzések alapján azonban az utóbbi, körülményes eljárások nem kifizetődőek, mivel a primerkötő rész nagy általánosságban nem befolyásolja az aptamerek affinitását [8].

Nagyobb affinitással és biostabilitással rendelkező aptamerek szelektálása érdekében egyre gyakrabban használnak módosított oligonukleotid könyvtárakat a SELEX során. Ennek a legegyszerűbb változata, mikor a kiindulási könyvtár random bázisösszetételén oly módon változtatnak, hogy a teljesen random szakaszok között 8-10 nukleotid hosszúságú részeket felváltva purin, illetve pirimidin nukleotidok szerepelnek, aminek köszönhetően könnyebben kialakulhat a nagyobb affinitással rendelkező aptamerekre jellemző másodlagos hurokszerkezet [13]. A két célmolekula-kötőhellyel rendelkező, úgynevezett bivalens aptamerek általában nagyobb célmolekula-kötő affinitással rendelkeznek az egy kötőhellyel rendelkező oligonukleotidokhoz képest. A bivalens aptamerek szelektálása olyan előre definiált nanostrukturát kódoló oligonukleotid könyvtárakkal segíthető elő, melyek két egymástól elkülönülő, random nukleotidokat tartalmazó hurkot alakítanak ki [14]. Az aptamerek kötőképességének és stabilitásának növelésében jelentős áttörést hozott a módosított nukleotidokat tartalmazó könyvtárak elterjedése. A nukleotidok pentóz 2'-OH csoportjának 2' fluoro vagy 2'-O-metil csoportra történő szubsztitúciója [15,16], valamint a foszfodiészter kötés foszforotioát-kötésre történő cserélésével az aptamerek nuleáz rezisztenciája jelentősen növelhető [17].

Az oligonukleotid könyvtárak kémiai módosításainak másik nagy csoportja a bázisok kémiai tulajdonságainak bővítését célozza. Egyes adatok szerint a fehérjéknek mindössze 30%-ára lehet hagyományos oligonukleotid könyvtárból aptamereket szelektálni, mivel a célmolekulák többségéhez való kötődéshez a nukleinsavakban előforuló négyféle bázis kémiai diverzitása nem elég magas [18]. Éppen ezért aminosavszerű oldalláncokkal rendelkező módosított nukleotidok létrehozására és ezek SELEX-ben történő alkalmazására az elmúlt években több módszert fejlesztettek. A diverzitás növelése történhet a nukleinsavakat felépítő nukleotidok módosításával [19], valamint új, mesterséges bázispárok létrehozásával [20]. Ezen módosított nukleotidok alkalmazásával a szelekció a fehérjék 80-90%-ára sikeresen kivitelezhető [18], továbbá a hidrofób tulajdonságokkal is rendelkező aptamerek a hagyományos nukleotidból

felépülő oligonukleotidokhoz képest nagyobb affinitással képesek célmolekulájukhoz kötődni [21]. Módosított aptamerek szelektálása történhet Click-SELEX-szel. Ebben az esetben a módosított DNS könyvtár a kanonikus timidin helyett C5-etinil-2'-deoxiuridint (EdU) tartalmaz, melyhez azid tartalmú vegyületek kapcsolhatók klikk kémia alkalmazásával. A szelektációs lépések közötti PCR elegyében a TTP-ot (timidin trifoszfát) szintén EdU trifoszfátra cserélik. Ennek köszönhetően az amplifikált és regenerált oligonukleotid könyvtár ismét funkcionálizálható klikk kémia segítségével az újabb szelektációs lépés megkezdése előtt [22]. Aminosavszerű oldalláncokkal rendelkező aptamerek létrehozhatóak a PCR-hez adott módosított nukleotidok használatával is. Ez utóbbi módszer elterjedéséhez nagyban hozzájárultak az új, rekombináns technikával előállított DNS és RNS polimerázok, melyek lehetővé tették a módosított nukleotidokból felépülő oligonukleotid láncok *in vitro* szintézisét [23,24]. A vizsgálatok eredményei alapján a 3'-5' exonukleáz aktivitással nem rendelkező polimerázok nagyobb eséllyel képesek a módosított nukleotidok beépítésére [25].

Az aptamerek szérumban mért féléletideje post-SELEX módosításokkal tovább növelhető, nukleázokkal szembeni ellenállóképességük a szabad 3' és 5' végeken használt LNA (Locked nucleic acid) módosítással, valamint módosított nukleotidok alkalmazásával javítható [26]. A leghatékonyabb módszer az oligonukleotidok lebomlásának gátlására a spiegelmer technológia, melynél a szérumban több nap után sem tapasztalható enzimikus lebomlás [27]. Az itt alkalmazott L-konfigurációjú spiegelmerek a nagyfokú biostabilitásukat annak köszönhetik, hogy a természetben előforduló D-konfigurációjú oligonukleotidok tükörképi szerkezetét veszik fel, így a sztereoszelektív nukleáz enzimek nem képesek a lebontásukra. Spiegelmerek szintézisére a DNS polimeráz enzimek nem képesek, ezért a SELEX során hagyományos D-konfigurációjú aptamereket szelektálnak a célmolekula tükörképi párjára, majd a szelektációt követően szintetizálják meg L-konfigurációjú nukleotidokból az aptamerek tükörképi párjait, a spiegelmereket, melyek már a célmolekula eredeti konformációját ismerik fel [28]. Az eljárást megnehezíti, hogy a célmolekula enantiomer párja elengedhetetlen a szelektációhoz. Ez az elvárás fehérjék esetében akkor teljesül, ha D-aminosavakból álló fehérje áll rendelkezésre. Ez esetben a célmolekula tükörképi párjának magas szintetizálási költségei és bizonyos méret feletti kivitelezhetetlensége jelentenek problémát, ezért a szelektáció általában fehérjék egy

kiválasztott epitópjára történik [29]. Az aptamer szelekcióhoz viszonyított komplex kivitelezése és magas költsége ellenére, a technológia létjogosult, amit jól jelez több, a klinikai vizsgálatok II-es fázisában lévő spiegelmer alapú gyógyszer (lásd 1. táblázat) [30].

1.3.2. Módszerfejlesztések nagy affinitással és specificitással rendelkező aptamerek szelektálására

A SELEX módszerek közös vonása, hogy az egymást követő elválasztási lépésekben egyre nagyobb szelekciós nyomást alkalmaznak, aminek hatására csak a legmagasabb affinitással rendelkező aptamerek képesek kötődni a célmolekulájukhoz. Ez történhet a célmolekula és oligonukleotid könyvtár inkubációs idejének és a célmolekula koncentrációjának csökkentésével, valamint az inkubációt követő mosási lépések intenzitásának növelésével [31]. Aspecifikusan és gyengén kötő aptamerek eltávolítására a szelekciós oldat tartalmazhat egyre nagyobb mennyiségben alkalmazott Poly(dI-dC)-t és BSA fehérjét kompetítorként [32], a mosó puffer pedig dextranszulfátot [33]. Hordozó mátrixhoz rögzített célmolekula esetén egy vagy több negatív szelekciós lépésre is szükség lehet, melynek során a hordozó felülethez kötődő oligonukleotidokat távolítják el. Ehhez az oligonukleotid könyvtárat a célmolekulát nem tartalmazó mátrixszal inkubálják, majd a negatív szelekciós oldat felülúszóját használják a későbbi SELEX lépésben, mely ily módon a hordozó felületre specifikus oligonukleotidokat már nem tartalmazza [3]. A kontraszelekciós lépés hasonló elgondolás alapján működik, melynek célja az aptamerek specificitásának növelése. A célmolekulával homológiát mutató molekulákra végzett kontraszelekciós lépéssel az aspecifikus aptamerek eltávolíthatók az oligonukleotid könyvtárból. A módszer hatékonyságát jól jelzi, hogy az így előállított aptamerek akár egy metil csoportban eltérő molekulákat is képesek megkülönböztetni egymástól [34].

Sikeres szelekciót követően a szűkített oligonukleotid könyvtárban feldúsulnak a nagy affinitással rendelkező aptamer jelöltek, melyek bázis sorrendjét szekvenáltatással határozzák meg. Tapasztalatok alapján azonban nem mindig a legnagyobb kópiaszámban jelenlévő aptamerek rendelkeznek a legjobb affinitással, sőt a negatív szelekciók ellenére számos aspecifikus oligonukleotid felsokszorozódhat a szelekció során. Ezért az aptamerek költséges és időigényes ellenőrzése előtt érdemes

bioinformatikai módszerekkel kiválasztani a szekvenáltatásból származó ígéretes jelölteket, melyben segítséget nyújtanak a különböző motívumkereső programok, melyek a random régióban gyakran előforduló, potenciális célmolekula-kötő szekvenciák azonosítását teszik lehetővé [35]. A magas affinitással rendelkező aptamerekre jellemző hajtű és G-quadruplex struktúrák azonosításában pedig a szerkezetjósoló programok lehetnek segítségünkre [36,37]. Az új generációs szekvenálás (NGS) elterjedésével lehetőség nyílt nagymennyiségű szekvencia meghatározására, melyekkel akár az egyes SELEX ciklusokból származó szűkített könyvtárak teljes szekvencia-összetétel változása is nyomon követhető. A szelekció előrehaladtával nagyobb kópiaszámban megjelenő oligonukleotidok motívumkereső és szerkezetjósoló programmal végzett elemzésével a valószínűsíthetően jól működő aptamerek azonosíthatóak [38]. A módszer további előnye, hogy a negatív- és kontraszelekcióból származó minták szekvenáltatásával azonosíthatóvá válnak az aspecifikusan kapcsolódó oligonukleotidok [39]. A nagyobb mennyiségű szekvenciaadatok köszönhetően az NGS technikával a Sanger szekvenáltatáshoz képest általában több, nagyobb affinitással rendelkező aptamer azonosítható [4].

1.3.3. SELEX módszerben történt változtatások

A SELEX során használt célmolekulák megfelelő tisztasága és helyes térszerkezete szintén meghatározó a natív célmolekulához szelektíven kapcsolódó aptamerek sikeres szelektálásában. A szelekcióban alkalmazott célmolekula mennyisége továbbá hatással lehet a szükséges SELEX ciklusok számára, valamint az aptamerek kötőképességére, ezért számos elméleti modell foglalkozik az ideális koncentráció meghatározásával [40], melynek mennyisége a szelekció típusától függően eltérő lehet. Nitrocellulóz membrán alapú SELEX-nél például a magas háttérkötődés miatt a célmolekula mennyisége kevésbé csökkenthető a mikrofluidikai elválasztáson alapuló SELEX-hez képest, az aspecifikusan kapcsolódó aptamerek megjelenése miatt [41]. Amennyiben a célmolekula a szelekció során rögzítve van, a hordozó felületen lévő célmolekulák sűrűsége szintén meghatározó, mivel magas felületi borítottság esetén az aptamerek több célmolekulához is kapcsolódhatnak egyszerre, így kisebb affinitású, multivalens aptamerek dúsulhatnak fel a szelekció végére [42]. Számítógépes modell vizsgálatok és tapasztalati eredmények alapján a SELEX első lépésében általában a

célmolekulát és az oligonukleotid könyvtárat ekvimoláris mennyiségben érdemes alkalmazni [31].

A SELEX első leírásakor a szelekciós oldatot nitrocellulóz membránon mosták keresztül, mely során a membránon immobilizált célmolekulához tapadtak az aptamerek, míg a célmolekulához nem kötődő oligonukleotidok keresztülhaladtak rajta [1]. Ez az elválasztás azonban nem tökéletes, ugyanis a célmolekulát nem kötő oligonukleotidok egy része szintén fennakadhat a nitrocellulóz membránon, továbbá csak nagyobb méretű fehérje célmolekula esetén használható, ezért az elmúlt 30 évben a SELEX eljárásnak több tucat módosított változata jelent meg, melyek ezen hátrányok kiküszöbölését célozzák [15]. Az eljárások többségét, az oligonukleotidok és célmolekulák elválasztása alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatjuk. Első esetben mind a célmolekula, mind az oligonukleotid könyvtár szabadon található a szelekciós oldatban, erre példa a kapilláris elektroforézis SELEX (CE-SELEX), mely kiváló elválasztást tesz lehetővé, így a SELEX ciklusok száma jelentősen csökkenthető [43]. A CE-SELEX hátránya a korlátozott injektálható mintatérfogat, ami csak kisebb szekvencia diverzitással rendelkező könyvtárak használatát teszi lehetővé a többi SELEX módszerhez képest [44]. Továbbá a módszer érzékeny a pufferösszetételre, ami a CE-SELEX használhatóságát korlátozza. A SELEX módszerek egy másik nagy csoportjánál a célmolekulát hordozó felülethez, például affinitás kromatográfiás oszlophoz rögzítik, amely lehetővé teszi a célmolekulához kapcsolódó aptamerek elválasztását az oligonukleotid könyvtár többi részétől. Ennek a megközelítésnek sikerességét azonban nagyban befolyásolja az alkalmazott kromatográfiás oszlop típusa [45]. A módszer további hátránya, hogy a célmolekulából viszonylag nagy mennyiségre van szükség a SELEX során. Ezen eljárás egy továbbfejlesztett változatában a célmolekulát mágneses gyöngy felületéhez kapcsolják, aminek köszönhetően a SELEX célmolekula-igénye jelentősen csökkenthető [46]. A mágneses elválasztáson alapuló technika az egyszerű kezelhetőségének és az alkalmazható erős szelekciós nyomásnak köszönhetően széles körben elterjedt [47]. A rögzítés hatására a célmolekula natív szerkezete azonban változhat, valamint a kisméretű célmolekulák rögzítése nehézségekbe ütközhet [48]. Ezen problémák kiküszöbölésére alkották meg az elválasztási technikák harmadik típusát, melynél a hordozó felületre az oligonukleotidokat kapcsolják, míg a célmolekula szabadon található a szelekciós oldatban [39,49]. A módszer egy

módosított változata a Capture-SELEX, melynél az oligonukleotid könyvtár bázis-komplementaritás alapján egy mágneses gyöngyhöz rögzített rövid oligonukleotid szekvenciákhoz kapcsolódik. Ebben az esetben a célmolekula-kötődés hatására az oligonukleotidok térszerkezete megváltozik, aminek köszönhetően a komplementer szekvenciáról leválnak, az aspecifikus szekvenciák pedig a mágneses gyöngyhöz kapcsolatlan maradnak, így eltávolíthatók a szelekciós oldatból [50]. A negyedik nagyobb elválasztás-technikai csoportba a Cell-SELEX módszerek tartoznak [51]. Ebben az esetben az aptamerek szelekciója sejtfelszíni molekulákra történik, amelynek nagy előnye, hogy a célmolekulák így natív formában vannak jelen, továbbá a szelekció egy időben több célmolekulára is történhet, melyeknek pontos ismerete nem szükséges. A Cell-SELEX-nél az aptamerek specificitását kontraszelekciós lépés biztosítja, mely során a DNS könyvtárat a célmolekulát nem kifejező sejtekkel inkubálják, majd a kapcsolódó oligonukleotidokat eltávolítják az aptamer jelöltek közül [38,52].

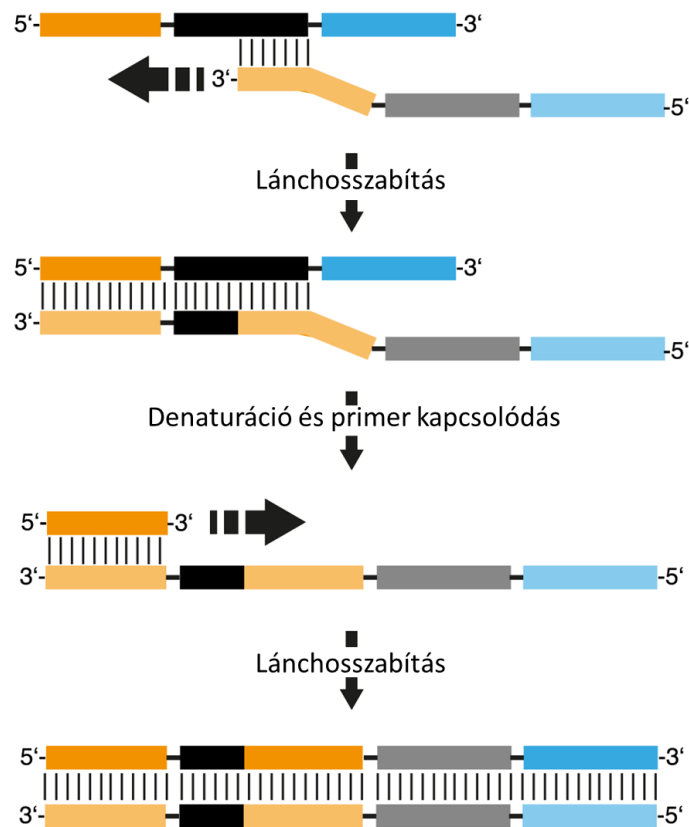
1.4. Oligonukleotidok amplifikálásában, egyszálúsításában történt módszerfejlesztések

1.4.1. Oligonukleotid könyvtárak amplifikálása PCR-rel

Szelekció során az egyes SELEX lépések közötti szűkített oligonukleotid könyvtárak amplifikálása és regenerálása, valamint a szelekció végén, a karakterizáláshoz szükséges egyes aptamer jelöltek költségghatékony előállítására *in vitro* biológiai módszerekkel történik, melynek első lépése a templátok PCR-rel történő sokszorosítása.

A meghatározott DNS szakaszok mesterséges sokszorosításának ötlete Kary Mullistól származik, aki a polimeráz láncreakció módszer megalkotásáért 1993-ban kémiai Nobel-díjat kapott [53]. A PCR módszer az elmúlt évtizedekben rengeteget fejlődött, alkalmazása számos más tudományterület mellett az orvostudományban is széles körben elterjedt. A sikeres PCR tervezésének egyik legfontosabb pontja a primer tapadási helyek gondos megválasztása, mellyel a melléktermék képződése elkerülhető. Genomi minták amplifikálásakor a primerek specifikus kapcsolódása DNS adatbázisok segítségével ellenőrizhető. A tervezés azonban olyan komplex DNS templátok sokszorosításánál, melyek szekvenciája csak részben ismert, nehézségekbe ütközhet. A használt primerek az ismeretlen templát több részéhez is kapcsolódhatnak, így eltérő

méretű, nem kívánatos termékek is keletkezhetnek. Ennek a valószínűsége a SELEX ciklusok során használt PCR-ben igen magas. A DNS könyvtárak random régiója 10^{14} féle különböző szekvenciát tartalmaz, melyekben előfordulhatnak az amplifikáláshoz használt primerek szekvenciái, valamint az oligonukleotidok komplementer szakaszai egymással is kapcsolódhatnak. Ha a PCR során az egyik templát random régiójához egy másik templát 3' végével kapcsolódik, akkor primerként funkcionálhat a DNS polimeráz enzim számára, így pedig eltérő méretű, részben egyszálú, részben kétszálú melléktermékek jöhetnek létre (2. ábra) [54].



2. ábra. PCR melléktermék keletkezés random DNS könyvtár amplifikálásakor [55]. Amennyiben a

PCR során az egyik templát random régiójához egy másik templát 3' végével kapcsolódik, akkor primerként funkcionálhat a DNS polimeráz számára, így pedig eltérő méretű melléktermékek jöhetnek létre. A primerkötő részek narancssárgával illetve kézzel, a szekvencia random szakasza feketével és szürkével jelölve.

Musheev és munkatársai kapilláris elektroforézissel vizsgálták az egyedi szekvencia és a DNS könyvtár amplifikálása során keletkező PCR melléktermékek dinamikáját. Eredményeik alapján, míg az egyedi szekvencia eredményes amplifikálása a reakcióelegyhez adott primerek elfogyásáig tartott, addig a DNS könyvtár szekvencia sokszorosítása során a melléktermék-képződés már a primerek elfogyása előtt megkezdődött. Mikor a PCR termék mennyisége eléri a 20-50 nM-os küszöbértéket, a termék-termék hibridizációból adódó melléktermék-képződés drasztikusan megnő az ekkor még 10x-es feleslegben lévő primer mennyiség ellenére. Továbbá eredményeikkel alátámasztották azt a hipotézist, mely szerint a hosszabb DNS könyvtárak PCR termékei nagyobb eséllyel hibridizálnak egymással, nagyobb mennyiségű mellékterméket létrehozva. 122 bázispár hosszúságú DNS könyvtárnál a melléktermék 2-3 PCR ciklussal korábbi megjelenését tapasztalták a 80 bázispár hosszúságú könyvtárhoz képest. Emellett a random régiót határoló primer szakaszok meghatározó szerepére is rávilágítottak; azonos hosszúságú, de eltérő primerekkel rendelkező könyvtáraknál eltérő mennyiségű melléktermék képződését figyelték meg, magyarázatot azonban nem találtak arra, hogy a primer-tervezés hogyan befolyásolja a melléktermék képződését [56]. Tolle és munkatársai szintén a primerkötő rész melléktermék-képződésre gyakorolt hatását vizsgálták. Korábbi munkáik során a melléktermék-képződés több formáját figyelték meg: bizonyos esetekben a PCR ellenőrzése azonos mértékben növekvő, úgynevezett létrás melléktermék keletkezését igazolta, más esetekben a minta, a sok eltérő hosszúságú melléktermék miatt agaróz gélen elmosódott formában jelentkezett. Feltételezésük szerint létrás melléktermék akkor keletkezik, ha az egyik oligonukleotid 3' vége egy másik oligonukleotid random régiójának azon szakaszához kapcsolódik, mely közvetlenül az 5' vég felőli primerkötő rész előtt helyezkedik el. A keletkezett melléktermék két reverse primerkötő részt tartalmaz, mely minden PCR ciklus során egy vagy több újabb primerkötő résszel hosszabbodhat. Ezzel szemben elmosódott PCR termék akkor tapasztalható a gélképen, ha az egyik termék 3' vége a másik termék random régiójának középső szakaszához kapcsolódik, ekkor a melléktermék PCR ciklusonkénti hosszabbodása nem tapasztalható. Hipotézisüket szekvenáltatási eredményekkel támasztották alá, valamint létrás melléktermékképzésre hajlamos egyedi szekvenciák amplifikálásával a várt melléktermék típus keletkezését tapasztalták. Megfigyeléseik alapján kijelenthető, hogy

a könyvtárak primerkötő része nagyban befolyásolja a melléktermékek képződését, melyet a PCR optimalizálásával sem lehet elkerülni [55]. A reakció elongációs lépésének kihagyása a hosszabb melléktermékek képződésének elkerülése céljából, valamint a reakcióelegyhez adott kisebb mennyiségű templát és DNS polimeráz enzim, valamint a PCR elegyhez adott SSB (*single strand binding*) fehérje bizonyos mértékben visszaszoríthatja a melléktermék képződését, azonban ezekkel a módosításokkal is csak késleltetni lehet a megjelenésüket [54–56].

Az oligonukleotid könyvtárak sokszorosítását a melléktermék-képződés mellett a PCR szekvencia-összetételt torzító hatása tovább nehezíti. A DNS könyvtár egyes oligonukleotidjai eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, a GC tartalmuk, másodlagos szerkezetük, olvadási hőmérsékletük különböző, ami jelentősen befolyásolhatja a primerek tapadását és a DNS polimeráz működését. Ennek köszönhetően a DNS könyvtár szekvenciáinak fele elveszhet, akár egyetlen PCR során [57]. Új generációs szekvenálások eredményei alapján a kiindulási oligonukleotid könyvtár és a több lépésben PCR-rel amlifikált, majd regenerált oligonukleotid könyvtár nukleotid-összetétele különbözik [58]. Takahashi és munkatársainak vizsgálata alapján a végső oligonukleotid könyvtárban az adozin nukleotidok aránya a PCR torzító hatására csökken a másik három nukleotid mennyiségéhez képest [5]. A szekvenciák egyenlőtlen sokszorozódása mellett a szekvenciák rövidülése szintén megfigyelhető az amplifikáció során. A templát guanozinban és citidinben gazdag szekvencia részei stabil hajtű struktúrákat hozhatnak létre, melyeket a DNS polimeráz enzim a replikáció során „átugorhat”, így a PCR, az eredeti templátnál rövidebb termékeket eredményezhet [59]. A guanozinban gazdag szekvenciák esetén létrejövő stabil G-quadruplex struktúrák olvadási hőmérséklete meglehetősen magas, ezért ezek amplifikálhatósága szintén rosszabb a másodlagos szerkezettel nem rendelkező oligonukleotidokhoz képest [60].

A szekvenciák egyenlőtlen amplifikációját a PCR optimalizálásával [60] és nagy pontosságú DNS polimerázok alkalmazásával próbálták orvosolni [15]. Igazi áttörést azonban csak az emulziós PCR kifejlesztése hozott, amely egyben szolgáltatott részleges megoldást a melléktermék-képződés gátlására és a különböző szekvenciák egyenletes sokszorosítására. Az eljárás során az egyes DNS molekulák amplifikálása egymástól térben elválasztva történik, az olajos közegben létrehozott vizes alapú

cseppecskék a PCR-hez szükséges összes hozzávalót tartalmazzák. Ideális esetben a cseppecskékben lévő reakcióelegyek egy-egy DNS templátot tartalmaznak, aminek köszönhetően egymással párhuzamosan történik az egyes szekvenciák amplifikációja, így a nehezebben másolódó szekvenciák is képesek a reakció során feldúsulni, valamint a keletkezett termékek nem tudnak egymásnak primerként szolgálni [61]. A ddPCR-nél (droplet digital PCR) az emulziót egy készülék segítségével hozzák létre, aminek köszönhetően azonos méretű vizes alapú cseppecskék alakulnak ki [62]. Takahashi és munkatársai kísérleteikben összehasonlították a hagyományos és a ddPCR működését SELEX módszerben. Eredményeik alapján a ddPCR-ben a reakcióból származó szekvencia-vesztés kevésbé mutatkozik, azonban a szelekció több ciklust igényel, mivel az aptamerek lassabban dúsulnak fel a szűkített oligonukleotid könyvtárakban. Megemlítendő, mindkét párhuzamosan végzett szelekcióban ugyanaz a szekvencia bizonyult a legjobbnak; ennek a jelöltnek az aránya azonban a hagyományos PCR-rel készített SELEX 5. ciklusában 85% fölött volt, míg a ddPCR ugyanazon ciklusában 20% alatti arányban volt jelen a többi szekvenciához képest. Új generációs szekvenáltatás alapján a kétféle PCR hatására eltérően változott a SELEX végére a szűkített oligonukleotid könyvtárak nukleotid összetétele. Mindkét esetben csökkent az adenozin nukleotidok aránya a másik három nukleotid mennyiségéhez képest. Azonban a hagyományos PCR-nél timinben gazdagabb szekvenciák jelentek meg, a ddPCR termékében a szekvenciák inkább guanin bázisból tartalmaztak nagyobb mennyiséget. Ennek köszönhetően a hagyományos PCR terméke pirimidinben volt gazdagabb, a ddPCR termékében a purin és pirimidin bázisok aránya közel azonos maradt [5].

Az aptamerek szelektálásához és karakterizálásához a PCR-rel előállított dsDNS terméket felhasználás előtt regenerálni kell. Az egyszálú oligonukleotid előállítása RNS aptamerek esetében *in vitro* transzkripcióval, míg DNS aptamereknél a kétszálú termék egyszálúsításával történik.

1.4.2. DNS egyszálúsítási technikák

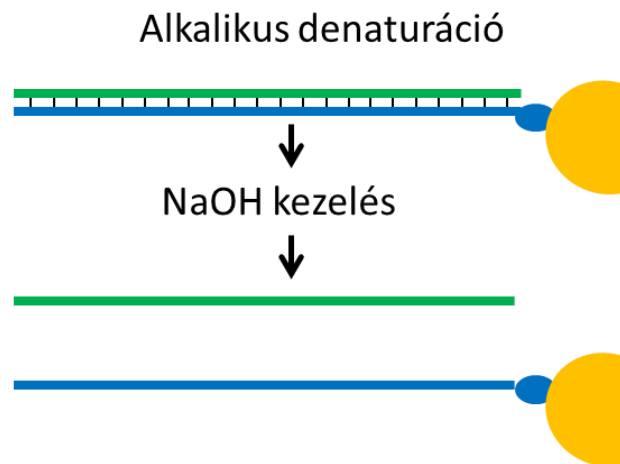
A célmolekulájukat szelektíven felismerő oligonukleotidok első alkalmazása RNS alapú aptamerekkel történt [1,2]. Amint korábban már ismertettem, Ellington és Szostak nem sokkal később bizonyította, hogy a ssDNS alapú aptamerek is képesek célmolekulájukat specifikusan felismerni [3]. Az így készített aptamerek a környezeti

hatásokkal szemben ellenállóbbak az RNS aptamerekhez képest. Mivel az RNS oligonukleotidok pentóz molekulájának 2' szénatomjához kapcsolódó hidroxil csoportja bázikus pH-n deprotonálódhat, a keletkezett reaktív oxigén atom a foszfodiészter kötés hidrolizálásával az oligonukleotid láncot hasítja, ciklikus 2'3'- foszfát molekulát létrehozva. A DNS alapú oligonukleotidok esetén a pentóz cukor molekula 2' szénatomjához egy hidrogén kapcsolódik, ennek köszönhetően lúgos környezetben a degradációjuk nem történik meg. A DNS aptamerek nagyobb stabilitásának ellenére sokáig fentmaradt az az általános vélemény, hogy az RNS aptamerek nagyobb hatékonysággal képesek kötni célmolekulájukat a feltételezett stabilabb szerkezetük miatt, ennek köszönhetően az 1990 és 2007 között szelektált aptamerek 70%-a RNS aptamer volt. Több száz, eltérő célmolekula típusra szelektív RNS és DNS aptamer kötőképességének összehasonlítása azonban cáfolta ezt az elképzelést; a kétféle aptamertípus hasonló K_d értékekkel rendelkezik [63,64]. Ezeknek a megfigyeléseknek köszönhetően a trend megváltozott, 2008 és 2013 között szelektált aptamerek 70%-a már DNS aptamer volt [63]. A nagyobb stabilitás mellett az egyszerűbben kivitelezhető szelekció is a DNS aptamerekre történő átállás mellett szólt. RNS aptamerek szelektálásakor a SELEX ciklusok közötti szűkített könyvtárak regenerálása reverz transzkripció, PCR amplifikáció, és transzkripció lépésekből áll, ugyanez a regenerálási folyamat a DNS aptamerek esetén két lépésben történik, melynek során a PCR dsDNS termékét az újabb szelekciós ciklus előtt egyszálúsítják.

A DNS aptamerek elterjedésével egyre nagyobb figyelem összpontosult a különböző egyszálúsítási technikákra, hiszen a SELEX sikeressége nagyban múlik az ssDNS könyvtár regenerálási hatékonyságán, továbbá a szelekció végén a kölcsönhatás ellenőrzéshez szükséges aptamer jelöltek előállítására szintén ezzel a módszerrel valósítható meg. Egyszálúsítási technikákkal szemben elvárás, hogy nagy tisztaságú ssDNS-t eredményezzenek minimális szekvencia-veszteség mellett. A dsDNS egyszálúsítása történhet alkalikus denaturációval, az egyik szál exonukleáz enzimmel történő emésztésével, aszimmetrikus PCR-rel vagy a DNS szálak méretkülönbség alapján történő elválasztásával. A felsorolt módszereknek egymással szemben vannak előnyeik és hátrányaik, ezeket alkalmazásuk előtt, a kísérlet céljának függvényében mérlegelni szükséges.

1.4.2.1. Alkalikus denaturáció

Az alkalikus denaturáció a legelterjedtebb egyszálúsítási technika, melynek alapja, hogy a biotinilált reverse primerrel előállított PCR terméket sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyhöz kapcsolják, majd a nem biotinilált DNS-szálat NaOH-os denaturációval választják el az immobilizált komplementer száltól (3. ábra) [65].



3. ábra. Alkalikus denaturációval történő egyszálúsítás. A biotinilált reverse primerrel előállított PCR terméket sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyhöz kapcsolják, majd a nem biotinilált DNS-szálat NaOH-os denaturációval választják el az immobilizált komplementer száltól. Sztreptavidinnel borított mágneses gyöngy narancssárgával, DNS szához kapcsolt biotin kék oválissal jelölve. DNS szálak kékekkel illetve zölddel színezzve.

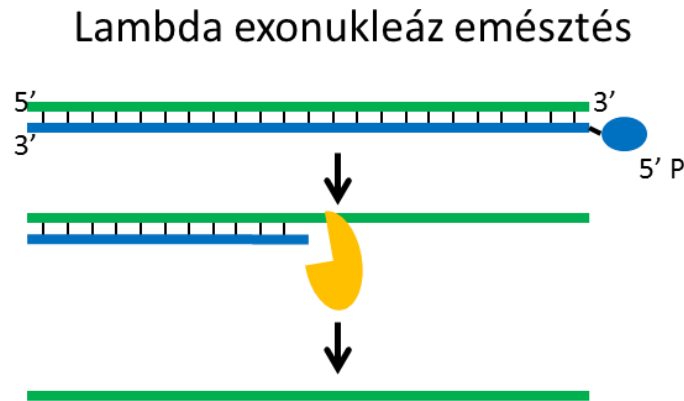
A DNS szálak közötti hidrogénhidak felbontása a módszer egy módosított változatában hővel történik, ebben az esetben azonban a sztreptavidin is nagymértékben leválik a mágneses gyöngy felszínéről a biotinilált komplementer szállal együtt, emiatt a felülúszó nagymennyiségű dsDNS szennyeződést tartalmaz [66]. Hultman és munkatársai a módszer 1989-es leírásakor 150 mM-os NaOH oldatot használtak az egyszálúsításhoz [65], azonban kiderült, hogy a magas NaOH koncentráció szintén a sztreptavidin gyöngyről történő leválását okozhatja. A dsDNS miatt jelentkező szekvencia-vesztés mellett a szelekciós pufferbe kerülő sztreptavidinnek is káros hatása lehet a SELEX kimenetelére nézve. A szennyeződésként megjelenő sztreptavidin célmolekulaként szolgálhat a szelekció során [67], továbbá a sejtek aggregálódását

okozhatja Cell-SELEX során [68], ami szintén a szelekció sikertelenségét eredményezheti. Az alkalikus egyszálúsítás optimalizálását több kutatócsoport is vizsgálta. Geoffrey K. Kilili és munkatársai a különböző koncentrációban adott NaOH hatását vizsgálta; eredményeik alapján a 10 és 20 mM koncentrációban adott NaOH hatására a dsDNS még nem jelent meg az egyszálú termék mellett a felülúszóban, továbbá a Western blot vizsgálatok alapján a sztreptavidin sem mosódott le a gyöngyökről. 75 és 150 mM-os NaOH oldattal történő eluálás hatására azonban már jelentős mennyiségű dsDNS és sztreptavidin jelent meg a felülúszóban. A cikk szerzői továbbá nagy különbséget tapasztaltak a különböző gyártóktól származó gyöngyök alkalmazhatóságában. Eredményeik alapján az eluálás hatására a Dynabeads gyöngyökről mosódik le a legkisebb mennyiségben a sztreptavidin, míg a Sera-Mag gyöngyökről már 10 mM-os NaOH-eluáló oldat hatására jelentős mennyiségű sztreptavidin vált le [69]. A sztreptavidines gyöngyök prekondicionálása segíthet abban, hogy az ssDNS eluálásakor kevesebb sztreptavidin kerüljön a felülúszóba, ehhez használat előtt a mágneses gyöngyöket 100-200 mM NaOH oldatban inkubálják 5 percen keresztül [70]. A mintában lévő fehérje-szennyeződés – oligonukleotid-vesztés árán - fenol kloroformos extrakcióval eltávolítható, azonban ezzel a módszerrel a dsDNS-t és az amplifikációból származó PCR melléktermékeket nem lehet elválasztani a ssDNS-től, ezért ezek képződésére érzékeny a módszer [67]. Az alkalikus denaturáció az ismertetett hátrányainak ellenére megbízhatóan működik és gyorsan kivitelezhető. Az eljárás mikrofluidikai rendszerben történő automatizálására is történtek kísérletek [71], ennek köszönhetően számos közlemény jelent meg, melyben a szelekció során ezt az egyszálúsítási módszert használták [72].

1.4.2.2. Lambda exonukleáz emésztés

A lambda exonukleáz enzimmel történő DNS egyszálúsítási eljárást először Higuchi és munkatársai írták le 1989-ben [73]. Az egyszálúsításhoz használt lambda exonukleáz enzim a lambda bakteriofágból származik és a virális dsDNS törés javításában játszik fontos szerepet. Az enzim az 5' végen foszforilált dsDNS-ek 5'-3' irányba történő szelektív emésztését végzi. A lambda exonukleáz enzim alacsony aktivitást mutat az 5' végen nem foszforilált dsDNS és ssDNS mintákon [74].

A módszer alapja, hogy a felesleges DNS szálakat a PCR során 5' végén foszforilált primer segítségével állítják elő. Az amplifikálást követően a PCR termékhez lambda exonukleáz enzimet adnak, mely nagy hatékonysággal emészt a dsDNS 5' végén foszforilált szálakat (4. ábra).



4. ábra. Lambda exonukleáz enzimmel történő egyszálúsítás. A felesleges DNS szálakat a PCR-ben 5' végén foszforilált primer segítségével állítják elő, majd a PCR termékhez lambda exonukleáz enzimet adnak, mely nagy hatékonysággal emészt a dsDNS 5' végén foszforilált szálakat. Lambda exonukleáz narancssárgával, 5' foszfát csoportot kék oválissal jelölve. DNS szálak késsel illetve zölddel színezve.

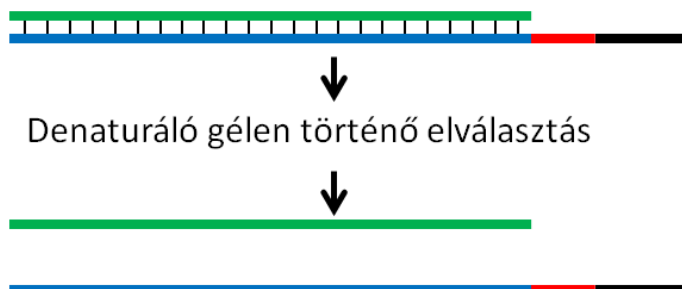
A felesleges szál emésztése történhet T7 exonukleáz enzimmel is, azonban ez a módszer sokkal kevésbé elterjedt. A T7 enzim 5'-3' irányban emészt a DNS szálakat. A megőrizni kívánt DNS szálakat foszforotioát kötésekkel tartalmazó primerekkel állítják elő, így a módosított cukor-foszfát váz védi a keletkezett szálakat az enzim exonukleáz aktivitásától [75]. A lambda exonukleáz nagy processzivitású enzim; a DNS-hez kapcsolódva marad, míg a teljes foszforilált szál emésztése meg nem történik. Ezzel szemben a T7 enzim az emésztés során többször leválik a DNS szárról [76]. Az emésztés hatékonyságától függetlenül a két enzim hasonló tisztaságú és mennyiségű ssDNS-t eredményez [67]. Az emésztés hatékonyságát mindkét enzim esetén nagyban befolyásolja a minta összetétele. A tisztítatlan PCR termékben a feleslegben lévő primerek, nukleotidok és polimeráz enzim rontják az emésztés határfokát, ezért javasolt a termék tisztítása az exonukleáz hozzáadása előtt, mely folyamat viszont óhatatlanul

oligonukleotid-veszteséggel jár [67,77]. A maximális ssDNS előállításához a lambda exonukleáz-kezelés időtartamának optimalizálása szükséges, ugyanis az enzim kis mértékben, de képes az egyszálú terméket is emészteni [78]. A maximális ssDNS : dsDNS arány eléréséhez szükséges idő az irodalmi adatok alapján 20 perc és 2 óra között változik [67,72,79]. A dsDNS szennyeződés, a tökéletlen emésztés mellett, származhat a reverse primerek 5' foszforiláltságának részleges hiányából is, ugyanis az ezekről a primerekről szintetizált DNS szálakat az enzim nem képes emészteni [80]. További problémát jelent, hogy a primerek készítése során, a foszfát csoportot ideiglenesen blokkoló csoportokkal védik, melyek a szintézist követő teljes eltávolításuk hiányában szintén gátolhatják a lambda exonukleáz működését [79]. A sztreptavidines gyönggyel történő egyszálúsításhoz hasonlóan az exonukleáz kezeléssel előállított ssDNS terméket is tisztítani kell felhasználás előtt, mivel a lambda exonukleáz enzim célmolekulaként szolgálhatna bizonyos szelekció típusoknál az aptamer jelöltek számára. Erre a célra leggyakrabban a fenol kloroformos extrakciót használnak, azonban az eljárás során akár a termék 30%-a is elveszhet [79]. Összességében a lambda exonukleáz kezeléssel nagy mennyiségű, tiszta ssDNS állítható elő, ezért az egyszálúsítás magasabb költségeinek ellenére is elterjedt a használata. Lambda exonukleáz kezeléssel például hepatitisz C vírus polimeráz enzimre [81], prion fehérjére [82] és sztreptavidinre [83] is előállítottak alacsony Kd-vel rendelkező aptamereket.

1.4.2.3. Méretkülönbség alapján történő elválasztás

A méretkülönbség alapján történő elválasztásnál a PCR-ben létrehozott termék egyik szála hosszabb a komplementer szekvenciánál, ami lehetőséget biztosít a két DNS szál urea tartalmú, denaturáló polikarilamid gélen történő elválasztására. A módszer első leírása 1995-ből, Kelly P. Williams-től és David P. Bartel-től származik [84]. Módszertani leírásukban kémiai módosított primer használatával hozták létre az eltérő hosszúságú DNS szálakat. A módosított primer 3 különböző funkcióval rendelkező részből áll: a 3' végen található komplementer szekvencia primerként működik, a szekvencia középső részén egy polietilén-glikol terminátor szakasz helyezkedik el, mely meggátolja a primer további részének replikációját, a keletkező szálak méretbeli különbségét pedig az 5' végen található, át nem másolódó poliA szekvencia biztosítja (5. ábra).

Méretkülönbség alapján történő elválasztás

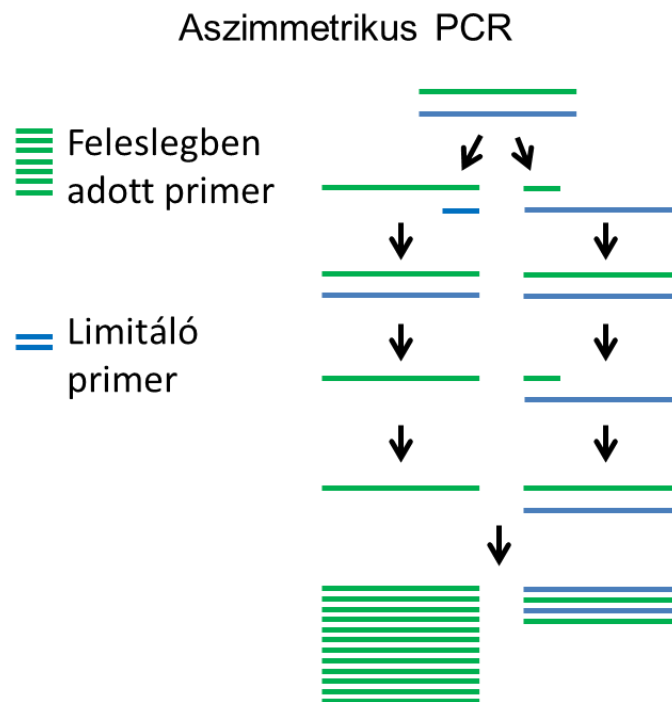


5. ábra. Méretkülönbség alapján történő egyszálúsítás. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel elválaszthatók egymástól a PCR-ben módosított reverse primerekkel előállított, eltérő hosszúságú komplementer ssDNS szálak. A módosított primer át nem íródó szakasza pirossal, a méretkülönbséget okozó poliA szekvencia feketével jelölve. DNS szálak kézzel illetve zölddel színezve.

Eltérő hosszúságú komplementer szálakat az egyik primer szekvencia 5' végére tervezett GC-ben gazdag hajtűstruktúrák segítségével is létre lehet hozni, melyek a magas olvadási hőmérsékletük miatt a helyesen megválasztott olvadási hőmérsékletű PCR során nem másolódnak át [85]. Azonban a hajtűstruktúrán belüli hidrogénkötések még ilyen körülmények között is részlegesen felbomolhatnak, így a polimeráz enzim a szekvencia teljes hosszát képes átmásolni, egyenlő hosszúságú komplementer szálakat létrehozva. Az így keletkezett egyenlő hosszúságú komplementer szekvenciák urea denaturáló gélen történő elválasztására nincs lehetőség, ezért ez a módszer a kémiai módosított primereket használó párjánál rosszabb hatásfokú [70]. Az ureás denaturáló poliakrilamid gél hatékonyan választja el az egyszálú termékeket egymástól. A gélből történő tisztításnak köszönhetően a módszer kevésbé érzékeny a PCR melléktermék-képződés káros hatására, mint az alkalikus denaturációs és lambda exonukleáz kezelési módszerek [67]. Habár a gélből történő tisztítás DNS veszteséggel jár, azonban ennek mértéke nem nagyobb az alkalikus módszernél is tapasztalható termékmennyiség csökkenésnél [70]. A módszer legnagyobb hátránya, hogy meglehetősen időigényes, ezért használata a többi egyszálúsítási technikához képest kevésbé elterjedt. Ezzel a módszerrel előállított aptamerekre viszonylag kevés példa található a szakirodalomban [86].

1.4.2.4. Aszimmetrikus PCR

Az 1988-ban Gyllensten és munkatársai által leírt aszimmetrikus PCR az első és egyben legegyszerűbb egyszálú DNS előállításra alkalmas módszer. Az aszimmetrikus PCR kezdeti reakcióelegye, a szimmetrikus PCR-rel ellentétben, eltérő mennyiségű primert tartalmaz, a limitáló primer mennyisége általában egy-két nagyságrenddel alacsonyabb a feleslegben adott primer koncentrációjához képest. Míg a hagyományos PCR-nél a polimeráz enzim minden ciklusban átmásolja a templát DNS mindkét szálát, addig az aszimmetrikus PCR-nél a termék mennyiségének exponenciális növekedése csak a reakció kezdeti fázisában valósul meg, a limitáló primerek elfogyását követően, a polimeráz enzim csak a feleslegben adott primerről képes újabb DNS szálakat szintetizálni, ennek következményeként a PCR terméken belül megnő az egyszálú DNS-ek aránya (6. ábra) [87].



6. ábra. Aszimmetrikus PCR. Az eltérő koncentrációban alkalmazott forward és reverse primereknek köszönhetően az aszimmetrikus PCR-ben a limitáló primerek elhasználódását követően, a feleslegben adott primerekről egyszálú termék keletkezik. A feleslegben adott primer rövidebb, a róla készülő DNS szál hosszabb zöld szakasszal jelölve, a limitáló primer és a meghosszabbításával készült DNS szál kékkel jelölve.

A keletkezett ssDNS mennyiségét és az ssDNS : dsDNS arányát nagymértékben a limitáló és a feleslegben adott primerek aránya határozza meg. Amennyiben az ideálisnál kevesebb limitáló primer kerül a reakcióelegybe, akkor nem keletkezik megfelelő mennyiségű dsDNS a reakció exponenciális szakaszában, következésképpen a reakció lineáris szakaszában nem lesz elegendő templát-mennyiség az ssDNS képzéshez. Túl nagy mennyiségű limitáló primer használata esetén viszont a PCR termékben megnő a dsDNS mennyisége az ssDNS-hez képest. Irodalmi adatok alapján az ideális primer arány DNS könyvtáranként változik, ezért a SELEX megkezdése előtt érdemes az aszimmetrikus PCR-t optimalizálni [88–90]. Az aszimmetrikus PCR egy továbbfejlesztett változatában a termékképződés exponenciális és lineáris szakaszát különválasztják a tisztább ssDNS előállítás érdekében. Ennél a módszernél az első PCR-ben állítják elő a megfelelő mennyiségű templátot, míg a második, egyféle primert tartalmazó PCR az ssDNS előállítására szolgál [90,91]. A számos optimalizációra és módszerfejlesztésre tett kísérlet ellenére az aszimmetrikus PCR működésének hatékonysága sokszor elmarad a szimmetrikus PCR-étől, melyre Sanchez és munkatársai találtak magyarázatot. Elméletük szerint a problémát a feleslegben adott primerek és a limitáló primerek szekvencia alapján számítottól eltérő olvadási hőmérséklete (T_m) jelenti. A limitáló primerek PCR során jelentkező alacsonyabb olvadási hőmérséklete abból ered, hogy a primer tervezésnél az olvadási hőmérséklet meghatározásakor nem veszik figyelembe a limitáló primer alacsonyabb koncentrációját. Az általuk fejlesztett „*Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR*”-nél a primerek tervezésekor a „*nearest neighbour*” módszert alkalmazzák, mely a primer koncentrációkat is figyelembe veszi az oligonukleotidok olvadási hőmérsékletének meghatározásakor. Ennek köszönhetően a LATE-PCR-nél a limitáló és a feleslegben lévő primerek a PCR-ben azonos olvadási hőmérséklettel rendelkeznek, aminek köszönhetően nagyobb mennyiségű ssDNS keletkezik az aszimmetrikus PCR során [92].

Kevert szekvenciák aszimmetrikus PCR-rel történő sokszorosítása és egyszálúsítása során a melléktermék képződés szintén problémát jelent, ezért a PCR ciklusok számának optimalizálása szintén elengedhetetlen [88–90]. Az alkalmazott PCR ciklusok számának csökkentésével azonban az egyszálú termékek mennyisége is csökken, erre a problémára jelent megoldást az aszimmetrikus PCR és az emulziós PCR

kombinálása. Emulziós aszimmetrikus PCR módszerrel Shao és munkatársai a hagyományos aszimmetrikus PCR 25. ciklusában megjelenő melléktermék-képződést az 50. ciklust követően sem tapasztalták [93]. Az aszimmetrikus PCR hátránya a fejezetben bemutatott másik három egyszálúsítási technikával szemben, hogy az ssDNS mellett nagy arányban van jelen dsDNS. Tisztítatlan aszimmetrikus PCR termékkel készült sikeres szelekciókra találunk példát a szakirodalomban [94,95], azonban elterjedtebb az ssDNS poliakrilamid gélből történő kivágása és tisztítása a minta használata előtt [96]. A gélből történő tisztítás során jelentkező DNS veszteség kiküszöbölésére több technikát fejlesztettek ki. A „*Capture and Release (CaR)*” módszer során mágneses gyöngyhöz rövid oligonukleotidokat kapcsolnak, amelyek a szekvencia-komplementaritás alapján képesek az aszimmetrikus PCR-ből az egyszálú terméket kapcsolni, majd tisztítást követően az ssDNS hővel eluálható a gyöngyökről [97]. A tisztítás fordított megközelítéssel is működik; biotinilált limitáló primerrel előállított aszimmetrikus PCR termékéből a biotinilált dsDNS sztreptavidines mágneses gyöngyhöz kapcsolható, így az ssDNS-től elválasztható [98]. A szakirodalomban az aszimmetrikus PCR és az exonukleáz kezelés kombinálására is találunk példát, ebben az esetben a dsDNS exonukleáz enzimmel történő emésztésével növelik az ssDNS arányát az aszimmetrikus PCR termékében [67]. A módszer fejlesztésével foglalkozó tanulmányok jelentős számának és olcsó kivitelezhetőségének köszönhetően az aszimmetrikus PCR elterjedten alkalmazzák az aptamerek szelektálásához és karakterizálásához [72].

1.5. A SELEX ellenőrzése

1.5.1. A szelekció előrehaladtának ellenőrzése

Megfelelő affinitással rendelkező aptamerek szelektálásához általában 5-15 SELEX ciklus szükséges, melynek számát a szelekció típusa [41] és a célmolekula tulajdonságai [99] jelentősen befolyásolhatják. Az optimálisnál nagyobb számú SELEX ciklus negatívan befolyásolhatja a szelekció kimenetelét, mivel az előző fejezetekben részletezett okok miatt, akár az aspecifikus és gyengén kötődő aptamerek kerülhetnek túlsúlyba a jól működő aptamerekkel szemben. Emellett az indokoltnál több lépést tartalmazó SELEX nagyobb költségekkel jár, és több időt is igényel. Ezen okokból kifolyólag fontos a szelekció előrehaladtának vizsgálata, melyről az egyes SELEX

ciklusok végéről származó, szűkített oligonukleotid könyvtárak szekvencia-összetételének, illetve célmolekulakötő-képességének vizsgálatával tájékozódhatunk. A szelekció ellenőrzése ezentúl arról is fontos információval szolgálhat, hogy szükséges-e újabb negatív szelekciós lépést elvégezni, valamint a szelekciós nyomást érdemes-e tovább fokozni. A vizsgálat jelentőségének megfelelően több tanulmány is megjelent, melyekben eltérő módon vizsgálták a szelekció progresszióját.

Az alkalmazott módszereket két nagyobb csoportba oszthatjuk a vizsgálat típusától függően. Az első csoportba azok a módszerek tartoznak, melyeknél az oligonukleotid könyvtár szekvencia-diverzitás változását követik nyomon. Az egyik ilyen típusú eljárás a restriktív fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP), mellyel ellenőrizhető a DNS könyvtárak homogenitása. Többféle restriktív endonukleáz enzimmel történő emésztés hatására a magas szekvencia-diverzitású kiindulási könyvtár nagyobb mértékben fragmentálódik, mint a szelekció végéről származó, szűkített DNS könyvtár. Az eredmények azonban nehezen értékelhetőek, és a többi módszerhez képest kevesebb információt nyújtanak. [100]. A DNS könyvtárak diverzitásának vizsgálatára egy másik megoldás az olvadáspont analízis. Az olvadási hőmérséklet értékét a mintában lévő DNS duplexek stabilitása határozza meg, kevert szekvencia esetén az olvadási görbén általában több csúcs látható, a nem megfelelően bázispárosodott, hetero duplexek esetén alacsonyabb olvadási hőmérséklet, míg a teljes hosszában komplementer szekvenciák hibridizációjával kialakított, homo duplexek esetén magasabb olvadási hőmérséklet figyelhető meg. A szelekció előrehaladtával a könyvtár diverzitása csökken, hetero duplexek kialakulása egyre kisebb arányban történik meg, ennek megfelelően a homo duplexekre jellemző csúcs az olvadási görbén fokozatosan növekszik. Emellett a magas kópia számban jelenlévő aptamerek, olvadási pontjuknak megfelelő, külön csúccsal is megjelenhetnek az olvadási görbén [100,101]. A szelekciós lépések során változó szekvencia-összetétel vizsgálatra a legújabb és legdirektebb módszer az új generációs szekvenálással kivitelezett analízis [102].

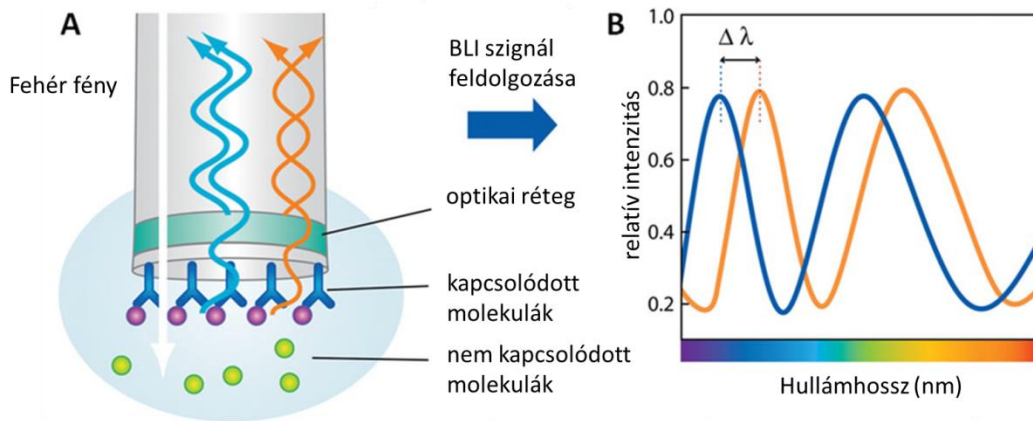
A szelekció vizsgálatának másik csoportja az oligonukleotid könyvtárak célmolekula-kötő képességének mérésén alapul, így ezek a vizsgálatok nem csak a diverzitás csökkenéséről szolgáltatnak információt, hanem az aptamerek működéséről is. Ezen vizsgálatok közé tartozik például a FAM jelöléssel ellátott könyvtárak

célmolekulakötő-képességének meghatározása fluoreszcencia intenzitás mérés alapján [100], a felületi plazmonrezonancia (SPR) [103], AlphaScreen [104] és ELONA (*enzyme-linked oligonucleotide assay*) mérések [105]. A szelekció előrehaladtát vizsgáló módszerekről több összehasonlító elemzés készült. A szelekció során tapasztalható csökkenő oligonukleotid könyvtár diverzitás és a szekvenálás alapján azonosított célmolekula-kötő motívumok dúsulása mellett magasabb célmolekula-kötő képesség volt megfigyelhető, ennek alapján a szekvenálás-diverzitás vizsgálaton alapuló módszerek eredményei összhangban állnak a célmolekula-kötő képességet mérő vizsgálatokkal [100,103].

1.5.2. Aptamer jelöltek ellenőrzése

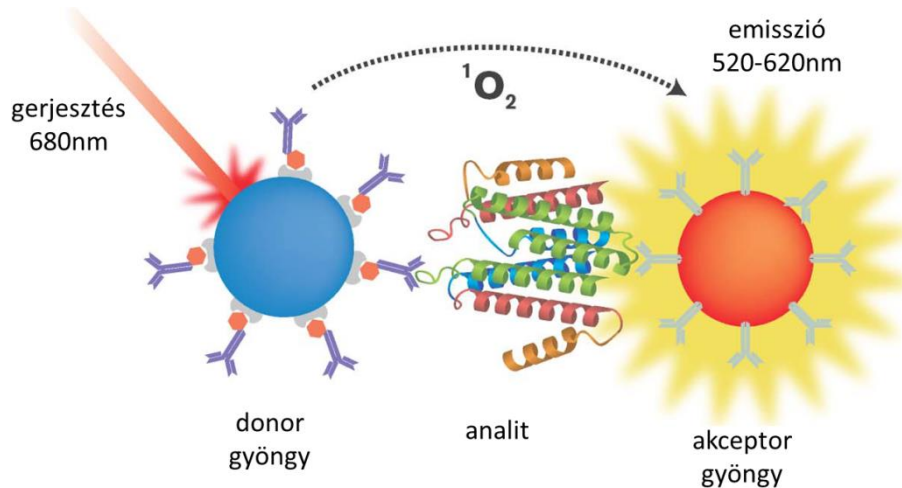
A SELEX utolsó ciklusa után maradt szűkített oligonukleotid könyvtár nagyszámú, különböző affinitású és specificitású aptamert tartalmaz, melyek egyedi ellenőrzése komoly technikai kihívást jelent. A számos lehetséges módszer alapos ismertetésétől eltekintek, csak az általam alkalmazott metodikákat mutatom be részletesebben.

Az aptamer jelöltek affinitás kromatográfiás oszlopon, dialízissel vagy ultraszűréssel történő karakterizálása az elválasztás alapján történő mérések közé tartoznak [106]. Az oldatban az aptamer, illetve ligand immobilizálását nem igénylő kölcsönhatások vizsgálatára lehetőséget nyújthat a fluoreszcencia polarizáció [107] és a MicroScale termoforézis (MST) [108]. A jelölésmentes, de immobilizációval járó kinetikai mérések között találjuk a felületi plazmonrezonanciát (SPR) [106] és biolayer interferometriát (BLI) [109,110]. Ez utóbbi módszernél az aptamerek a bioszenzor optikai rétegének felületére vannak kapcsolva. A készülék fehér fényt emittál a szenzoron keresztül és az optikai rétegről visszaverődő fény hullámhosszát detektálja. A szenzor felületét borító aptamerekhez kötődő célmolekulák az optikai réteg vastagságát megváltoztatják, aminek hatására a visszaverődő fény hullámhossza megváltozik, így a készülék valós időben képes detektálni a kölcsönhatás létrejöttét és megszűnését (7. ábra) [111].



7. ábra. Biolayer interferometria mérés alapja [112]. A szenzor felületéhez kapcsolt aptamerekhez kötődő célmolekulák az optikai réteg vastagságát megváltoztatják, aminek hatására a készülék által kibocsájtott fehér fény visszaverődő hullámhossza megváltozik, így a készülék valós időben képes detektálni a kölcsönhatás létrejöttét és megszűnését.

Egyedi aptamerek karakterizálására és aptamer párok szendvics típusú mérésben történő ellenőrzésére egyaránt megbízható módszert jelent az AlphaScreen (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*) technika. A mérés során a kölcsönható molekulák közül az egyik donor, a másik akceptor gyöngyhöz van kapcsolva. 680 nm hullámhosszúságú fény hatására a donor gyöngy a környező oxigén molekulákból gerjesztett szingulett oxigént hoz létre, mely az oldatban körülbelül 200 nm-es távolságot képes megtenni a gerjesztett állapotának elvesztése előtt. Amennyiben a két Alpha gyöngy megfelelő közelségbe kerül egymáshoz, a szingulett oxigén energiája átadódhat az akceptor gyöngynek, aminek hatására az akceptor gyöngy 520-620 nm hullámhossz közötti fényt emittál. A két Alpha gyöngy megfelelő közelségbe a kölcsönható molekulákon keresztül kerülhet (8. ábra). A módszer mosási lépéseket nem igényel, alkalmazhatósága széles puffer-tartományban igazolt [113].



8. ábra. AlphaScreen mérés alapja [113]. A kölcsönható molekulákat Alpha akceptor és donor gyöngyökhöz kapcsolják. A 680 nm hullámhosszú fényvel gerjesztett donor gyöngyök szingulet oxigént adnak le, melynek energiája átadódhat az akceptor gyöngyöknek, kemilumineszcens jelet létrehozva. Ehhez azonban szükséges, hogy a két Alpha gyöngy megfelelő közelségbe legyen egymással, amit a kölcsönható molekulák tesznek lehetővé.

Az AlphaLisa technológia az alkalmazott akceptor gyöngyök szűkebb emissziós spektruma (607-623 nm) miatt kevésbé érzékeny a hemoglobin okozta interferenciára, ennek köszönhetően az AlphaLisa mérés szérumban is elvégezhető [114]. Dausse és munkatársai 2011-ben felismerték a AlphaScreen technikában rejlő lehetőségeket és kifejlesztették az ezen alapuló HAPIScreen módszert, mellyel nagyszámú aptamer jelölt egyidejű vizsgálata elvégezhető, a módszer továbbá alkalmas a szelekció progressziójának vizsgálatára is [104]. Az Alpha módszerek szendvics típusú mérésben való alkalmazhatóságát több cikkben igazolták [114,115].

Szendvics típusú méréssel a diagnosztikai rendszerek szelektivitása jelentősen növelhető az egy receptort alkalmazó mérésekhez képest. A szendvics típusú mérésekben használható aptamer párok kiválasztása azonban összetettebb vizsgálatokat igényel. A külön-külön nagy affinitással rendelkező aptamereknek a célmolekula eltérő epitópjához kell kapcsolódnuk, ezért az aptamerek egymással párban történő használhatóságát is igazolni kell. A szendvics típusú méréshez szükséges aptamer pár származhat azonos szelekcióból, ebben az esetben először megvizsgálják az egyedi szekvenciák célmolekula-kötő képességét, majd a legígéretesebb jelöltek működését párban is ellenőrzik [116]. A szendvics méréshez szükséges aptamer pár

oligonukleotidjai külön szelekcióból is származhatnak. A hagyományos és módosított nukleotid könyvtárból szelektált aptamerek - az oligonukleotidok eltérő tulajdonságai miatt - általában a célmolekula eltérő epitópjára specifikusak, így a szendvics típusú méréshez alkalmas aptamer párok ezzel a megközelítéssel nagyobb valószínűséggel azonosíthatóak [33]. A mérési módszerek nagy számából látható, hogy az aptamerek kötődésének vizsgálatára nincs egységesen használható módszer, az alkalmazott eljárást a célmolekulák mibenléte és az aptamer várható alkalmazása határozza meg. Az aptamerek kinetikai paramétereinek meghatározása során problémát jelent, hogy az eltérő mérések alapján az aptamerek affinitása jelentősen különböző lehet [38,106]. Az eltérés egyfelől onnan adódhat, hogy a módszerek egy részében a célmolekula és az aptamer szabad formában van jelen az oldatban, míg más esetben legalább az egyik molekula rögzítve van a karakterizálás során, ami gátolhatja a kölcsönhatás kialakulását. Emellett a mérés körülményei is nagyban befolyásolhatják az aptamerek affinitását, ezért célszerű a karakterizálást olyan rendszerben végezni, melyben később az aptamereket alkalmazni kívánják. Amennyiben lehetőség van rá, érdemes több eltérő típusú mérés eredménye alapján kiválasztani a legígéretesebb aptamer jelölteket.

1.6. Aptamerek felhasználása

Az előző fejezetekben leírtak alapján látható, hogy aptamerek szelektálására és karakterizálására nincs egy egységesen kidolgozott módszer, ami a terápiás és diagnosztikai célra történő alkalmazásukat lényegesen lassítja. Továbbá a meglévő diagnosztikai rendszerek többsége antitestes mérésen alapul, így kevés biotechnológiai cég érdekelt az újabb, aptamer alapú mérési rendszerek fejlesztésében, ezért az aptamerek széleskörű gyakorlati alkalmazása még nem történt meg. Az utóbbi évek kutatási eredményei azonban igazolják, hogy az aptamerek a tudomány több területén eredményesen felhasználhatóak, így például környezetvédelmi monitoring során a toxinok és nehéz fém szennyezés kimutatására alkalmasak [117], orvostudományban pedig terápiás és diagnosztikai célra egyaránt alkalmasnak tűnek. A Macugen volt az első terápiás célra alkalmazott gyógyszer készítmény, melyet az időskori makula degenerációra fejlesztettek ki. A módosított, RNS alapú aptamer a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorhoz (VEGF) kapcsolódik, mely így nem képes kifejteni érképzést stimuláló hatását [118]. Emellett két másik szembetegséget célzó aptamer és

egy antikoaguláns hatású oligonukleotid a klinikai tesztek harmadik fázisába került, valamint több daganatos és gyulladásoos betegséget, anémiát és antikoagulációt célzó aptamer és spiegelmer a klinikai vizsgálatok kettős fázisában tart (1. táblázat) [30].

1. táblázat. Terápiás célú aptamerek a klinikai vizsgálatokban [30]

Aptamer	Célmolekula	Indikáció	Klinikai fázis
Macugen (pegaptanib, EYE001)	VEGF ₁₆₅	Szembetegség	Fázis IV.
Zimura (ARC1905)	Komplement faktor C5	Szembetegség	Fázis II./III
Fovista (E10030)	PDGF	Szembetegség	Fázis III.
REG1 (pegnivacogin)	véralvadási faktor IXa	Antikoaguláns	Fázis III.
ARC1779	vWF	Antikoaguláns	Fázis III.
NU172	Trombin	Antikoaguláns	Fázis II.
ARC19499 (BAX499)	TFPI	Antikoaguláns	Fázis II.
AS1411	Nukleolin	Daganatos betegség	Fázis II.
NOX-A12 (olaptésed pegol)	CXCL12	Daganatos betegség	Fázis II.
NOX-E36 (emapticap pegol)	CCL2	Gyulladásoos betegség	Fázis II.
NOX-H94 (lexaptepid pegol)	Hepcidin peptid hormon	Anémia	Fázis II.

Különbözö diagnosztikai rendszerekben alkalmazott aptamerekböl rengeteget találhatunk a szakirodalomban, ennek ellenére viszonylag kevés aptamer-alapú diagnosztikai termék került kereskedelmi forgalomba. Ezen kevés termékek közö tartozik a Neoverures Biotechnology Inc. Ochratoxin A és Aflatoxin kimutatására alkalmas termékei, a PECAM-1, az EGFR, a HGFR, az ICAM-2, a VEGFR-2 és a HER-2 biomarkereket kifejező sejtek áramlási citometriai módszerrel történő izolációjához fejlesztett AptoCyto, valamint ugyanezen biomarkerek pull-down módszerben történő izolálásához készített AptoPrep termékek. Továbbá a trombin

fehérjére és ételmérgezést okozó patogénekre fejlesztett diagnosztikai aptamerek (2. táblázat) [119]. Mindközül a legérdekesebbnek és legígéretesebbnek a SomaLogic cég SOMAmer-eken (Slow Off-rate Modified Aptamers) alapuló platformja bizonyul [18]. A SomaScan-nek nevezett mérés az antitestek multiplex mérésben történő korlátozott alkalmazhatóságát orvosolja [120] oly módon, hogy egyszerre több ezer fehérje jelenlétének és mennyiségének vizsgálatát teszi lehetővé. A módszer betegségek új biomarkereinek azonosítását is lehetővé teszi nagyszámú beteg és egészséges kontroll minták összehasonlítása révén [21]. SomaScan méréssel újabb biomarkereket sikerült azonosítani több daganatos és kardiovaszkuláris betegségre, Alzheimer kórra, tuberkulózisra és krónikus vesebetegségre [21,121–123].

2. táblázat. Kereskedelmi forgalomban kapható aptamer alapú diagnosztikai termékek [119]

Termék	Vállalat	Alkalmazás
OTA-Sense and AflaSense	Neoventures Biotechnology Inc.	Mikotoxinok (Ochratoxin A és Aflatoxin) kimutatása élelmiszerből
AptoCyto	AptSci Inc	Biomarker pozitív sejtek izolálása
AptoPrep	AptSci Inc	Biomarker pozitív sejtek és fehérjék pull-down módszerrel történő izolálása
SomaScan	SomaLogic	Biomarkerek multiplex vizsgálata
CibusDx	CibusDx	Ételmérgezést okozó patogének detektálása
OLIGOBIND	Sekisui diagnostics	Aktív trombin detektálása

1.7. Kardiovaszkuláris betegségek biomarkerei

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. A szív és érrendszeri betegségekre általában jellemző, hogy hosszabb idő alatt alakulnak ki, melyet több tényező együttesen befolyásol, ezért a prevenció és a korai diagnózis ezen betegségek esetében kiemelten fontos, melyek fejlődésének köszönhetően a kardiovaszkuláris betegségek okozta halálozási arányok az elmúlt években jelentősen csökkentek [124]. Akut miokardiális infarktus (AMI) és szívelégtelenség felismerésében és az alkalmazandó kezelés meghatározásában kiemelt fontossággal bírnak a betegségre jellemző biomarkerek. AMI diagnosztizálásában, az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2018-ban kiadott, legfrissebb ajánlása szerint kulcsfontosságú a kardiális troponin szint vizsgálata [125]. Az Európai Kardiológiai

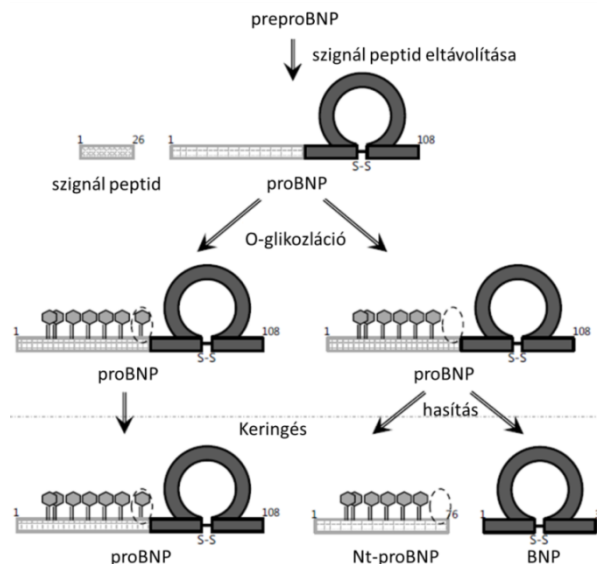
Társaság (ESC) ajánlása szerint a BNP (B-típusú nátriuretikus peptid) és a Nt-proBNP peptidek szérumszintjének mérése szívelégtelenség fennállásakor meghatározó lehet, ugyanis a betegség tünetei sokszor nem specifikusak. Bizonytalan diagnózis esetén a biomarkerek negatív prediktív értékéből adódóan megbízhatóan használhatóak a szívelégtelenség kizárására [126].

1.7.1. Nátriuretikus peptidek

A nátriuretikus peptidek (NP) családjának első tagját, a szív pitvarában termelődő ANP-t (*atrial/A-type natriuretic peptide*), 1983-ben írták le [127]. A legnagyobb mennyiségben a szívkamrában expresszáldó BNP peptid hormont pedig 1988-ban izolálták sertés agyból [128], innen származik kissé megtévesztő elnevezése is (*brain/B-type natriuretic peptide*). Néhány évvel később azonosították, szintén sertés agyból, a peptid család harmadik tagját, a CNP-t (*C-type natriuretic peptide*) [129]. A nátriuretikus peptidek nagymértékű strukturális hasonlóságot mutatnak, mindhárom fehérjénél kialakul egy diszulfid híd a polipeptid láncon belül, létrehozva a fehérje C-terminálisán egy 17 aminosav hosszúságú gyűrűs szerkezetet, melyet az ANP és BNP esetén egy további 5-6 aminosav hosszúságú szakasz követ. Ennek a rövid peptid szakasznak fontos szerepe lehet a hormonok receptorhoz történő kötődésben [130]. A nagyobb hasonlóságot mutató ANP és BNP az NP receptor-A-hoz (NPR-A) kapcsolódva fejtik ki endokrin, parakrin és autokrin hatásukat, míg a kisebb mennyiségben expresszáldó CNP peptid a NP receptor-B-hez (NPR-B) kötődve váltja ki autokrin és parakrin hatását. Mindkét esetben az NPR receptorok az intracelluláris cGMP szint emelésével közvetítik a nátriuretikus peptidek hatását, melyek a kardiovaszkuláris homeosztázis szabályozásában érvényesülnek, elősegítik a nátriurezist, a diurezist és a vazodilatációt, valamint a szív anti-remodelling irányításában is részt vesznek [131].

A nátriuretikus peptidek biológiailag aktív formájukat egy érési folyamaton keresztül nyerik el. A 134 aminosav hosszúságú preproBNP a pitvari és kamrai miokardiális sejtekben termelődik, a szignál peptid eltávolításával jön létre a 108 aminosav hosszúságú proBNP fehérje. A transz-Golgi apparátusban a proBNP O-glikozilálódik [132]. A megfelelően glikozilált peptidet a furin enzim tovább hasítja egy 76 aminosav hosszúságú inaktív Nt-proBNP peptidre és egy 32 aminosav hosszú BNP

hormonra [133], melyek szekréciónak granulumban raktározódnak. A 71-es aminosavon glikozilált proBNP hasítását a furin enzim nem végzi el, így a 108 aminosav hosszúságú peptid is megjelenhet a keringésben (9. ábra) [134].



9. ábra. BNP hormon érése [135]. A preproBNP szignál szekvenciájának eltávolításával jön létre a proBNP fehérje, mely a transz-Golgi apparátusban O-glikozilálódik. Véráramba kerülés előtt a furin enzim a peptidet tovább hasítja, létrehozva az Nt-proBNP-t és a biológiailag aktív BNP hormont.

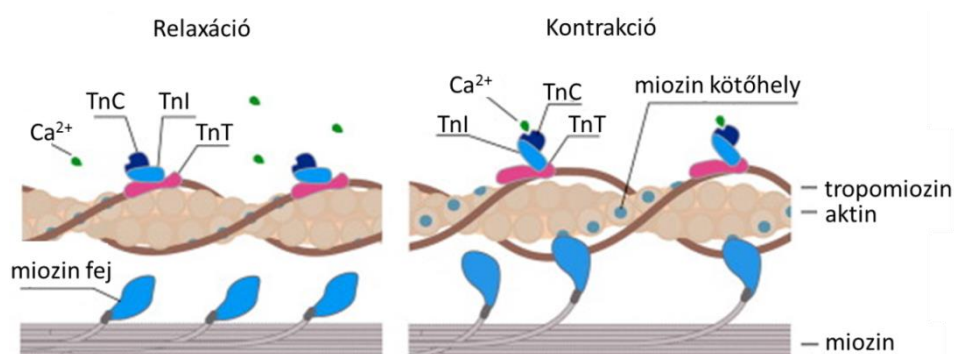
A BNP fehérje véráramba ürülésének és génexpressziójának elsődleges stimulusa a szívkamra falában létrejövő nyomás- és volumenterhelés, ennek eredményeként szívelégtelenség esetén emelkedett BNP és Nt-proBNP szint tapasztalható. A keringési rendszerbe kerülő BNP fehérje biológiai felezési ideje mindössze 20 perc, míg a vele egy időben ekvimoláris mennyiségben a véráramba kerülő Nt-proBNP felezési ideje 70 perc körül van, ennek köszönhetően az inaktív peptid nagyobb diagnosztikai jelentőséggel bír [126]. A BNP és Nt-proBNP peptid mérésével meghatározható, hogy a betegeknél jelentkező dyspnoe respirációs vagy kardiális betegség következménye. Szérum koncentrációjuk vizsgálatával meghatározható a szívelégtelenség súlyossága és az alkalmazott kezelés hatékonysága [126]. A peptidszint mérése jelenleg antitest alapú diagnosztikai rendszerekben történik,

melyek fejlesztése gondos tervezést igényel, ugyanis a peptid érési folyamatainak és a glikozilációs helyeinek figyelembevételével a diagnosztikai rendszerek megbízhatósága jelentősen növelhető [136,137].

Az elmúlt években több BNP [138] és Nt-proBNP [139] specifikus aptameret szelektáltak. A publikált vizsgálatokban a nátriuretikus peptid-specifikus aptamereket részben antitestekkel együtt alkalmazzák szendvics típusú mérésben [140], de tisztán aptamer alapú BNP kimutatásra alkalmas szendvics mérésre is találunk példát a szakirodalomban [116].

1.7.2. Kardiális troponin I fehérje

A troponin I (TnI) fehérje a troponin T (TnT) és troponin C (TnC) alegységgel együtt alkotják a troponin (I-T-C) komplexet, mely fontos szerepet játszik a harántcsíkolt és szívizom kontrakciójának szabályozásában. A TnT alegység az aktin polimer felszínéhez kapcsolódó tropomiozin fehérjéhez köti a troponin (I-T-C) komplexet, a TnI alegység pedig alacsony intracelluláris Ca^{2+} szint mellett gátolja az aktomiozin komplex működését. A Ca^{2+} szint emelkedésének hatására a TnC alegység megváltoztatja a troponin (I-T-C) komplex konformációját, így a TnI fehérje az inhibitor hatását már nem képes kifejteni, ezáltal az izomkontrakció bekövetkezhet [141] (10. ábra).



10. ábra. Troponin komplex izomkontrakciót szabályozó működése [142]. A TnI, TnT és TnC fehérjékből álló troponin komplex a tropomiozinnal együtt alacsony intracelluláris Ca^{2+} szint mellett gátolja az aktomiozin komplex működését. A Ca^{2+} szint emelkedésének hatására a troponin komplex konformációja megváltozik, így inhibitor hatását már nem képes kifejteni.

Míg a troponin komplex TnC alegysége azonos izoformában van jelen a lassú vázizomban és a szívizomban, addig a TnI és TnT alegységek eltérő izoformával rendelkeznek a három eltérő harántcsíkolt izomtípusban. Ezen szövetspecifikusság teszi alkalmassá a TnI és TnT fehérjéket a biomarker szerep betöltésére akut miokardiális infarktus (AMI) diagnosztizálásakor [143]. Szívinfarktus esetén fellépő szívizom károsodás hatására ugyanis a troponin komplex fehérjéi a keringésbe kerülnek, melyek mérése lehetővé teszi a diagnózis felállítását és az AMI súlyosságának meghatározását. A kardiális troponin I (cTnI) fehérje kimutatására alkalmas immoassay létrehozása azonban komoly kihívást jelent, hiszen az alkalmazott antitesteknek nagyfokú specificitással kell rendelkezniük, mivel a vázizom eredetű troponin I (sTnI) fehérje nagymértékű homológiát mutat a szívizom eredetű troponin I-vel. További nehézséget okoz, hogy a fehérje proteolitikus degradációja hamar végbemegy [144], ami a fehérje N és C-terminálisát érinti legnagyobb mértékben. A receptorok fejlesztését tovább nehezíti, hogy a véráramba kerülő troponinok többsége (I-T-C) komplexben marad [145], így a TnC alegység részlegesen elfedi a cTnI fehérjét, valamint a konformációját is megváltoztatja a szabad cTnI fehérjéhez képest, ami az antitestek antigén felismerését akadályozhatja. Receptorok előállításakor ezért különösen fontos az cTnI fehérje építépek gondos megválasztása, ellenőrzésükor szükséges a cTnI és Troponin (I-T-C) komplex kötő képességet egyaránt igazolni.

Az utóbbi években a kardiális troponinok mérésére alkalmas aptamerek szelekciója is megtörtént, melyek antitestekhez hasonló affinitással és specificitással rendelkeznek [146,147]. Nukleáz rezisztens, cTnI specifikus spiegelmerok fejlesztésében munkacsoportunk többéves tapasztalattal rendelkezik. Az első, N-terminálisra specifikus spiegelmer szelektálását, a cTnI fehérje 28-36. pozíciója közötti, 9 aminosav hosszúságú peptid szakaszra végeztük 9 ciklusos SELEX-ben. A szelektált oligonukleotidok affinitásának növelését a célmolekula mennyiségének csökkentésével, az inkubációs idő rövidítésével, valamint a mosási lépések fokozásával értük el, a spiegelmerok szelektivitását két negatív szelekciós lépéssel fokoztuk. A szelekció végén a D-oligonukleotidok előszűrését SPR módszerrel végeztük el [29].

2. Célkitűzések

Munkánk célkitűzése egy olyan DNS egyszálúsítási módszer fejlesztése volt, mely hozzájárulhat az aptamer jelöltek előszűréséhez és a szelekció előrehaladtának ellenőrzéséhez. Emellett célul tűztük ki proBNP specifikus aptamerek szelektálását és egy spiegelmer alapú szendvics típusú mérés kifejlesztését, mellyel szérumban szelektíven kimutatható a kardiális troponin I fehérje szabad és troponin (I-T-C) komplex formában is.

A célkitűzések megvalósításához kapcsolódó feladataim a következőkben összegezhetők:

- Primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) kifejlesztése és összehasonlítása szimmetrikus PCR-rel és hagyományos aszimmetrikus PCR-rel.
- PBA-PCR paramétereinek optimalizálása, majd általános alkalmazhatóságának vizsgálata.
- PBA-PCR alkalmazhatóságának vizsgálata aptamerek előszűrésében és a szelekció előrehaladtának ellenőrzésében.
- ProBNP specifikus aptamerek szelektálása.
- Laboratóriumunkban korábban szelektált cTnI fehérje C-terminális részére specifikus spiegelmer karakterizálása biolayer interferometria módszerrel.
- cTnI specifikus spiegelmer pár ellenőrzése szendvics típusú mérésben cTnI fehérje és troponin (I-T-C) komplex célmolekulákkal. Spiegelmer szelektivitásának vizsgálata és a szérumban történő mérés ellenőrzése.

3. Módszerek

A kísérletek során alkalmazott, laboratóriumunkban készített oldatok, táptalajok és tápoldatok a 3. táblázatban lettek feltüntetve.

3. táblázat. Laboratóriumban készített oldatok, táptalajok és tápoldatok összetétele

Oldat	Összetétel
1000x fém nyomelemek	50 ml 0,1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 ml 1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 ml 1 M $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1 ml 1 M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 ml 0,2 M $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 ml 0,1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1 ml 0,2 M $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2 ml 0,1 M H_3BO_3 , 100 milliliterre desztillált vízzel kiegészítve
10x M puffer	25 mM Na_2HPO_4 , 25 mM KH_2PO_4 , 50 mM NH_4Cl , 5mM Na_2SO_4
10x PBS	1,37 M NaCl , 27 mM KCl , 20 mM KH_2PO_4 , 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,5
2,5% tejpor oldat	2,5% tejpor, 0,025% Tween-20, PBS
5% tejpor oldat	5% tejpor, 0,05% Tween-20, PBS
50x 5052 puffer	glicerol 0,5%, glükóz 0,05%, laktóz 0,2%
50x TAE	2 M Tris, 1 M ecetsav, 0,05 M EDTA
5x Laemmli mintapuffer	0,312 M Tris, 10% SDS, 250 mM DTT, 50% glicerol, 0,01% brómfenolkék, pH 6,8
Anódpuffer I.	0,3 M Tris, 10% metanol, pH 10,4
Anódpuffer II.	25 mM Tris; 10% metanol, pH 10,4
Borát puffer	0,1 M bórsav, 0,05 M NaOH, pH 9,1
Coomassie-kék Destain oldat	10% etanol, 2% orto-foszforsav, desztillált víz
Coomassie-kék festék	0,02% Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% alumínium-szulfat-18-hidrat, 10% etanol, 2% orto-foszforsav, desztillált víz
Dynabeads B&W kapcsoló és mosó puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 4 M NaCl

feltárási puffer	10 mM imidazol, 300 mM NaCl, 0,1% Triton-X 100, PBS, pH 7,9
Katódpuffer	25 mM Tris, 40 mM glicin, 10% metanol, pH 9,4
Laemmlli elválasztógél puffer	1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8
Laemmlli tömörítógél puffer	1 M Tris, 0,8% SDS, pH 6,8
LB-táplódat	1% pankreász emésztett kazein, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, desztillált víz
LB-táptalaj	1% pankreász emésztett kazein, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 2% agar, desztillált víz
MDG	100 ml 10x M puffer, 12,5 ml (40%) glükóz, 10 ml (0,25%) aszpartát, 2 ml MgSO ₄ , 0,2 ml 1000x fém nyomelemek 1 literre desztillált vízzel kiegészítve
PEG PCR Clean Up puffer	26% PEG 8000, 6,5 mM MgCl ₂ , 0,6 M nátrium-acetát, pH 6-7
Pierce Magne GST kapcsoló puffer	125 mM Tris, 150mM NaCl, pH 8,0
SOC-táplódat	0,5% élesztőkivonat, 2% tripton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glükóz, (pH 6,8-7,0)
SiMAG-Bromoacetyl Blocking puffer	50 mM L-Cysteine*HCl, SiMAG-Bromoacetyl Coupling puffer
SiMAG-Bromoacetyl Coupling puffer	50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, pH 8,5
SiMAG-Bromoacetyl Storage puffer	0,05 % nátrium-azid, PBS
SiMag-Cyanuric Blocking puffer	2 % BSA, 0,05 % nátrium-azid, PBS
SiMag-Cyanuric Washing & Coupling puffer	PBS, pH 7,5
TBE	89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8,0

TE	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
ZYM-5052 puffer	1% Tripton, 0,5% élesztőkivonat, 100 ml 10x M puffer, 20 ml 50x 5052 puffer, 2 ml 1 M MgSO ₄ , 0,2 ml 1000x fém nyomelemek 1 literre desztillált vízzel kiegészítve.

A kísérletekhez használt primerek és oligonukleotidok a 4-7. táblázatban lettek feltüntetve.

4. táblázat. Felhasznált random DNS könyvtárak szekvenciája

Oligo	Szekvencia	Gyártó
1. könyvtár	5'-AGC CTC GTC TGT TCT CCC-(N40)-GGG AAG ACA AGC AGA CGT-3'	IDT
2. könyvtár	5'-AGT CTC CGC TGT CCT CCC-(N40)-GGG ATG ACG CCG TGA CTG-3'	IDT
3. könyvtár	5'-TAG GGA AGA GAA GGA CAT ATG AT-(N30)-TTG ACT AGT ACA TGA CCA CTT GA-3'	TriLink
4. könyvtár	5'-ATC CAG AGT GAC GCA GCA-(N40)-TGG ACA CGG TGG CTT AGT-3'	IDT

5. táblázat. Vizsgált aptamerek szekvenciája

Oligo	Könyvtár	Szekvencia	Gyártó
1. aptamer	1. könyvtár	5'-AGC CTC GTC TGT TCT CCC AGC AAG GTT TGG TGT TGG TTG GTT GCT GGT TTT GGT TTG GCG GGA AGA CAA GCA GAC GT-3'	Sigma Aldrich
2. aptamer	2. könyvtár	5'-AGT CTC CGC TGT CCT CCC AAT GTG GGG GTG GGT GGG TGG TGT TGG TGA GGT GTA GAT GGG GAT GAC GCC GTG ACT G-3'	Sigma Aldrich
3. aptamer	3. könyvtár	5'-TAG GGA AGA GAA GGA CAT ATG ATC TCA AAC TGA GCA CAA TGA GCC AGA TGG TCT TGA CTA GTA CAT GAC CAC TTG A-3'	Sigma Aldrich
4. aptamer	4. könyvtár	5'- ATC CAG AGT GAC GCA GCA TCT CGT CGG GCT GCT GAC TTT CGG CTT GCT TCT CCC GAC TTG GAC ACG GTG GCT TAG T-3'	Sigma Aldrich

11-es	4. könyvtár	5'-ATC CAG AGT GAC GCA GCA ACC AAA CAG TCT TAG GTC TTT ATT CAT CCC CGC AGC GAA ATG GAC ACG GTG GCT TAGT-3'	Sigma Aldrich
20-as	4. könyvtár	5'- ATC CAG AGT GAC GCA GCA CCG ACG CAA CTC CCG CTC CCC CAT ACG TTT CGG TAG ATA GTG GAC ACG GTG GCT TAG T-3'	Sigma Aldrich
30-as	4. könyvtár	5'-ATC CAG AGT GAC GCA GCA TAT TTC GAC CTT CTA CCT TTG ATT TTT GTG GTC CTC AGT GTG GAC ACG GTG GCT TAG T-3'	Sigma Aldrich

6. táblázat. Vizsgált spiegelmerek szekvenciája

Oligo	Szekvencia	Gyártó
B10	5'-AGT CTC CGC TGT CCT CCC GAT GCA CTT GAC GTA TGT CTC ACT TTC TTT TCA TTG ACA TGG GAT GAC GCC GTG ACT G-3'	IBA
A6	5'-CAG TGA GTG ATG GTG AGG GCT TAG TTC GCC GCT CAT GCC GAA TCT CCT GTA TAA ATA CCC ACA CTG TCC ATA CAC G-3'	IBA
C6	5'-CAG TGA GTG ATG GTG AGG GTG AAT CGG TGT CGA CTA TTA AAT TAA GTT GTG GTT GTT CCC ACA CTG TCC ATA CAC G-3'	IBA
C6r	5'-TG AAT CGG TGT CGA CTA TTA AAT TAA GTT GTG GTT GTT-3'	IBA

7. táblázat. Felhasznált primerek listája

Primer	Könyvtár	Szekvencia	Módosítás	Gyártó
fw1	1. könyvtár	5'-AGC CTC GTC TGT TCT CCC-3'	5'Biotin	IDT
rev1		5'-ACG TCT GCT TGT CTT CCC-3'	3'Phos	IDT
fw2	2. könyvtár	5'-AGT CTC CGC TGT CCT CCC-3'		IDT
rev2		5'-CAG TCA CGG CGT CAT CCC-3'	3'Phos/ 5'Biotin	IDT
fw3	3. könyvtár	5'-TAG GGA AGA GAA GGA CAT ATG AT-3'		TriLin k
rev3		5'-TCA AGT GGT CAT GTA CTA GTC AA-3'	3'Phos	TriLin k

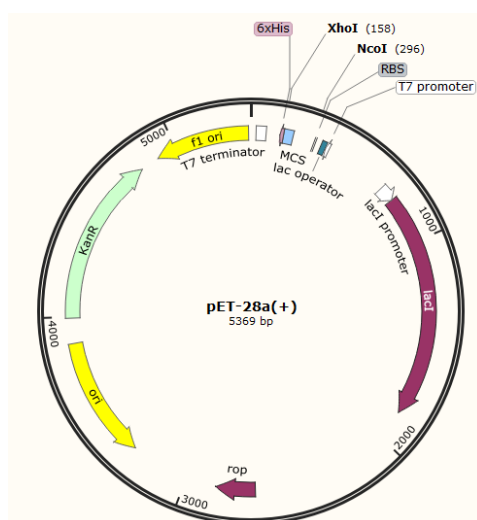
fw4	4. könyvtár	5'-ATC CAG AGT GAC GCA GCA-3'	5'Biotin	IDT
rev4		5'-ACT AAG CCA CCG TGT CCA-3'	3'Phos/ 5'Phos/ 3'Phos+5'Biotin / 5'Biotin	IDT
T7fw		5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'		Sigma Aldrich
T7rev		5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'		Sigma Aldrich
M13fw		5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'		Sigma Aldrich
M13rev		5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'		Sigma Aldrich

3.1. Célfehérjék előállítása

3.1.1. ProBNP fehérje előállításához szükséges vektor konstrukció létrehozása

A proBNP fehérjét kódoló génszakaszt az IDT cégtől rendeltük meg, melynek szekvenciáját *E. coli* rendszerben történő fehérje termelésre kodon optimalizáltuk. A gyártótól az inszert ampicillin rezisztenciával rendelkező pUCIDT plazmidban érkezett. Az inszert tervezésekor a proBNP fehérjét kódoló szekvencia két végére restrikciós endonukleáz hasító helyet illesztettünk, mely segítségével az inszert irányítottan a pET28a (Novagen) vektorba (11. ábra) illeszthető. Ligáláshoz az inszertet és a pET28a vektort restrikciós endonukleáz enzimekkel történő hasítással készítettük elő. 1-1 µg DNS-hez 10x töménységű FastDigest puffert és 1-1 µl NcoI és XhoI restrikciós enzimet mértünk. Az emésztés 15 percen keresztül 37 °C-on, míg az enzimek inaktiválása 80 °C-on 20 percen keresztül történt. Az emésztett pET28a vektort 0,8% agaróz gélen, az inszertet pedig 2%-os agaróz gélen választottuk el. A gélek elkészítéséhez agarózt oldottunk fel TAE pufferben. A megszilárdult gélt TAE pufferrel feltöltött, gélelektroforézis futtató kádba helyeztük. A gélzsebekbe pipettázott, 6x-os mintapufferrel kiegészített, 1-1 µg DNS minta elválasztását 50 Volt egyenfeszültségen végeztük. A mintát tartalmazó agarózgélt DNS-interkalálódó GelGreen (Biotium) festékkel inkubáltuk, majd a festett géleket transzilluminátor (Dark Reader DR-45M) készülékre helyeztük, és a megfelelő méretű DNS fragmentumokat tartalmazó részeket sebészeti szike segítségével kivágtuk. Az emésztett DNS szakaszok tisztítását

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) készlet segítségével végeztük el a gyártó protokollja alapján. A tisztított DNS-ek koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) spektrofotométer készülékkel mértük meg, méretüket pedig egy újabb agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Ligáláshoz előkészített pET28a vektort és a proBNP fehérjét kódoló inszertet 1:5 moláris arányban összekevertük, az így kapott 100 ng DNS mintához 2 μ l 10x T4 DNS ligáz puffert és 0,2 μ l T4 DNS ligáz (1 Weiss U) (Thermo Scientific) enzimet mértünk, a reakcióelegyet desztillált vízzel 20 μ l-re egészítettük ki. A ligálás 10 percen keresztül zajlott 22 °C-on, a reakció leállítása 5 perces 70 °C-os inkubációval történt.



11. ábra. pET28a vektor SnapGene programmal készített plazmidtérképe

Az elkészült plazmidot a Bioline cégtől vásárolt *E. coli* Alpha-Select kémiai kompetens sejtekbe transzformáltuk. A -80 °C-on tárolt kompetens sejteket jégre helyezve 20 perc alatt felolvasztottuk, majd hozzámértünk 5 μ l ligált plazmidot. 20 perces újabb inkubációt követően a kompetens sejteket 1 percre 42 °C-os termosztátba helyeztük. Ezt követően a jégen visszahűtött mintákhoz 500 μ l SOC tápoldatot mértünk sterilfűlkében. A transzformált *E. coli* sejteket 1 órán keresztül növesztettük 37 °C-on 220 rpm rázatás mellett. 50 μ l baktérium szuszpenzió kanamicines LB táplemezre való szélesztése után az *E. coli* sejteket egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37 °C-on.

A kanamicines táplemezen felnőtt transzformált *E. coli* telepek ellenőrzését kolónia PCR-rel végeztük (T100 Thermal Cycler). 20 µl PCR elegy 10 µl 2x PCR BIO Taq Mix-et (PCR Biosystems), 500-500 nM, pET28a vektorhoz kapcsolódó, T7 forward és T7 reverse primert tartalmazott, templátként a kanamicines táptalajon felnőtt baktériumtelepekről vett minta szolgált. Az amplifikációs reakció 1 perces 95 °C-os denaturációs lépéssel kezdődött, a 15 másodperces 95 °C-os denaturációt, 15 másodperces 51 °C-os primer tapadási lépést és az 5 másodperces 72 °C-os lánchosszabítási lépést tartalmazó ciklus 25-ször ismétlődött, a PCR egy 2 perces 72 °C-os lépéssel zárult. A polimeráz-láncreakció eredményességét 2%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. 6x mintapufferrel kiegészített 5 µl PCR terméket az agaróz gélben kialakított mintazsebekbe pipettáztunk. Az elválasztást 100 Volt egyenfeszültségen végeztük 30 percen keresztül. A mintát tartalmazó agarózgélt DNS-interkalálódó GelGreen festékkel inkubáltuk, a jelek detektálása GelDoc (BioRad) készülékkel történt.

A megfelelő méretű plazmidot tartalmazó baktérium telepet 4 ml, 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB tápoldatba inokuláltuk. Az *E. coli* sejteket 20 órán keresztül növesztettük 37 °C-on 220 rpm rázatás mellett. A plazmid izolálását a baktérium szuszpenzióból Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) segítségével végeztük el a gyártó protokollja alapján. A tisztított DNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer készülékkel ellenőriztük, a plazmid bázissorrendjét szekvenáltatással igazoltuk.

3.1.2. ProBNP fehérje termeltetése *E. coli* BL21 autoindukciós rendszerben

A 10 ng plazmidot fehérje expresszióra alkalmas *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs) kémiai kompetens sejtekbe transzformáltuk a korábban leírt protokoll alapján. A kanamicines LB táplemezen felnőtt baktérium telepeket 50 µg/ml kanamicinnel kiegészített MDG tápoldatba oltottunk. A starter kultúrát 5 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on 220 rpm rázatás mellett, majd a szuszpenzióból 50 µl-t pipettáztunk 100 ml 50 µg/ml kanamicint tartalmazó ZYM 5052 autoindukciós tápoldatba. 37 °C-on, intenzív rázatás mellett 17 órán keresztül növesztettük a baktérium sejteket. Az opálösszá vált baktérium szuszpenziót 4000 rpm fordulatszámon 4 °C-on 20 perc alatt lecentrifugáltuk. A keletkezett csapadékról a felülúszót

eltávolítottuk, majd 16 ml feltáró pufferben felfuszpendáltuk és 6x 1 percen keresztül szonikáltuk Sonic 300 Dismembrator (Fisher Scientific) készülékkel 30%-os teljesítményen, a mintákat a szonikálási lépések között 1-1 percig jégen tartottuk. A feltárt sejteket 20 percen keresztül ismét centrifugáltuk 14 000 rpm fordulatszámon 4 °C-on, majd a csapadékról leszívott felülúszót 100 µl HIS-Select Cobalt affinitás gyönggyel (Sigma-Aldrich) inkubáltuk jégen 1 órán keresztül enyhe billegtetés mellett. A mintát 5 percig 1500 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd az affinitás gyöngyökről a felülúszót eltávolítottuk. A gyöngyökhöz aspecifikusan kapcsolódott fehérjéket 3 mosási lépésben távolítottuk el: 1 ml feltáró pufferrel történő mosást követően 2x mostuk a gyöngyöket 1-1 ml 20 mM imidazollal kiegészített feltárópufferrel. A proBNP gyöngyről történő eluálását 2 lépésben végeztük el 500-500 mM imidazolt tartalmazó 100-100 µl PBS puffer segítségével. A további kísérletekben való felhasználás előtt a fehérje oldatból az imidazol eltávolítását a Thermo Scientific cég Protein Desalting puffercserélő oszlopával valósítottuk meg. Az *E. coli* rendszerben előállított fehérje tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) követő Coomassie-kék festéssel és Western blot módszerrel ellenőriztük, koncentrációját NanoOrange protein quantitation kit (Invitrogen) és Quantus fluoriméter (Promega) segítségével határoztuk meg.

3.1.3. cTnI, sTnI és proBNP fehérje előállítása *in vitro* transzlációs rendszerben

cTnI, sTnI és proBNP fehérjék *in vitro* transzlációs rendszerben történő előállításához szükséges vektor konstrukciókat Dr. Szeitner Zsuzsanna kolléganőm készítette. A fehérjéket kódoló inszertek pEU3-GLIC vektorba lettek illesztve, az elkészült fehérjék GST címkét tartalmaztak.

3.1.3.1. mRNS készítése, tisztítása és ellenőrzése

In vitro transzkripció előtt, a reakció nagyobb hatékonysága érdekében, a vektorokat linearizáltuk. 5-5 µg cirkuláris plazmid DNS emésztése FastDigest pufferben történt 1 órán keresztül 37 °C-on 5-5 µl SacI restriktív enzim (Thermo Fisher Scientific) hozzáadásával, a reakció végtérfogata 50 µl volt. A linearizált plazmidok tisztítását PEG PCR Clean Up kicsapással végeztük el. 50 µl emésztett plazmidot 50 µl desztillált vízzel hígítottunk, majd 100 µl PEG PCR Clean Up puffert adtunk hozzá. Az oldatokat vortexelést követően 20 percig szobahőn inkubáltuk, majd 13 000 rpm

fordulatszám 10 percig centrifugáltuk. A felülúszó óvatos eltávolítását követően az Eppendorf-csövekbe 1-1 ml abszolút etanolt pipettáztunk, majd 10 percen keresztül ismét 13 000 rpm fordulatszám 10 percig centrifugáltuk a mintákat. A tisztított plazmid steril fülkében történő szárítása előtt ez utóbbi lépést még egyszer megismételtük. Az Eppendorf cső alján megjelenő, kicsapott DNS-t 10 µl desztillált vízben felszuszpendáltuk. A linearizálás sikerességét 0,8%-os agaróz gélen, gélelektroforézissel ellenőriztük, az oldat DNS tartalmát NanoDrop spektrofotométer készülékkel mértük.

In vitro transzlációhoz szükséges mRNS előállítását TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit használatával végeztük (Thermo scientific). Steril fülkében 1 µg linearizált plazmidhoz 8 µl NTP elegyet (egyenlő mennyiségben összekevert 100 mM-os ATP, CTP, GTP és UTP oldat), 4 µl 5x TranscriptAid reakció puffert és 2 µl TranscriptAid enzimoldatot pipettáztunk, a reakcióelegyet 20 µl-re egészítettük ki DEPC kezelt vízzel. Az mRNS szintézise 2 órán keresztül 37 °C-on történt. A reakció végén az opálösszessé vált transzkripciós oldatból az mRNS tisztítását RNS kicsapással végeztük. A transzkripciós oldatot 330 µl desztillált vízzel egészítettük ki, majd 55 µl 7,5 M ammónium acetátot és 875 µl abszolút etanolt adtunk hozzá. Az elegy összeállítása előtt az oldatokat lehűtöttük. 15 perc jégen történő inkubáció után az oldatot 4 °C-on 15 percig 13 000 rpm fordulatszám 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, az Eppendorf cső alján megjelenő mRNS csapadékot 1 ml abszolút etanollal óvatosan átmostuk. Az alkohol eltávolítása egy, a korábbi beállításokkal megegyező, centrifugálási lépést követően történt. A mosási lépést megismételtük, majd az alkohol eltávolítását követően az Eppendorf cső belső falát és a kicsapott mRNS-t levegőn megszárazítottuk. Az mRNS-eket 21 µl SUB-AMIX-ben vettük fel, amely desztillált vízzel 40x-esre hígított S1, S2, S3 és S4 (ENDEXT Wheat Germ Expression Kit, CFSscience) oldatot tartalmazott. A transzkripciót és az mRNS tisztítást 0,8%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az mRNS minták elektroforézis előtti előkészítése némileg eltért a DNS mintáknál alkalmazottól. 0,1 µl mRNS mintához 5 µl desztillált vizet és 5 µl 2x RNA Loading Dye (Thermo Scientific) oldatot adtunk, a mintákat 10 percig 70 °C-on termosztátban inkubáltuk a gélezetekbe való betöltés előtt. A vizsgált mRNS-ek méretének meghatározásához a minták mellett RiboRuler RNA létrát futtattunk (Thermo Scientific).

3.1.3.2. *In vitro* transzláció

A fehérjék *in vitro* transzlációját ENDEXT Wheat Germ Expression Kit-tel (CFScience) végeztük. Transzlációnként 5 µl mRNS-t, 5 µl SUB-AMIX oldatot és 0,8 µl kreatin-kinázt adtunk 10 µl búzacsíra kivonatot tartalmazó WEPRO elegyhez. A pipettával összekevert transzlációs oldatokat 96 kamrás mikrotiter lemezen 206-206 µl SUB-AMIX oldat alá rétegeztük. A tálcát óvatosan, a két fázis összekeveredése nélkül 20 órára 20 °C-os inkubátorba helyeztük.

3.1.4. Fehérje tisztítás

Mindhárom transzlált rekombináns fehérje GST címkét tartalmazott, búzacsíra kivonatból történő tisztításukat ennek megfelelően azonos módon végeztük Magne GST (Pierce) affinitás gyöngy használatával. Kapcsolás előtt az affinitás gyöngyöket 3x átmostuk 500-500 µl (Pierce Magne GST) kapcsoló pufferrel, a mosási lépések között a gyöngyökről a felülúszót mágneses szeparátor segítségével távolítottuk el. Az ekvilibrált, 1 ml kapcsoló pufferben felvett Magne GST gyöngyökhöz hozzáadtuk a teljes transzlációs elegyet, a fehérjék kapcsolása 1 órán keresztül zajlott 4 °C-on enyhe rázatás mellett. A gyöngyöket 3x megmostuk 500-500 µl kapcsoló pufferrel, majd 100-100 µl 75 mM redukált glutationt tartalmazó kapcsoló pufferrel eluáltuk a fehérjéket a mágneses gyöngyökről két lépésben. A tisztított fehérje oldatából a glutationt egy éjszakán keresztül történő dializálással távolítottuk el Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) csövek használatával. A dializált fehérjék tisztaságát és mennyiségét SDS-PAGE-ét követő Coomassie-kék festéssel és Western blot módszerrel ellenőriztük.

3.1.5. Fehérjék ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel

Az *E. coli* rendszerben előállított hexaHIS címkével rendelkező, kisméretű proBNP molekulaméret alapján történő elválasztását 15%-os SDS-PAGE-én végeztük, míg az *in vitro* transzlációs rendszerben előállított, GST címkét tartalmazó, nagyobb molekulatömegű fehérjéket 12%-os SDS-PAGE-vel ellenőriztük. A készített gélek két részből álltak, egy tömörítő és egy az alatt elhelyezkedő elválasztó részből, az összeállításukhoz használt anyagok mennyiségei a 8. táblázatban kerültek feltüntetésre. A második réteg megszilárdulását követően az üveg és kerámialapok között elhelyezkedő SDS-poliakrilamid géleket elektroforetikus elválasztásra alkalmas kádákba helyeztük. A vizsgálni kívánt fehérje mintákhoz 5x Laemmli mintapuffert

adtunk, majd 95 °C-on 5 percig inkubáltuk. A mintákat a tömörítő gél felső részén található zsebekbe pipettáztuk, az SDS-PAGE során a feszültséget 200 Voltban maximalizáltuk, az áramerősséget 20 mA-re állítottuk. A gélelektroforézist leállítottuk, amint a mintapufferben lévő brómfenolkék jelzőfesték elérte a poliakrilamid gél alsó szélét. A mintát tartalmazó gélt az üveg és kerámia lap közül kivettük és ioncserélt vízbe helyeztük. A gélt 3x 1 percig melegítettük a víz forrásáig mikrohullámú sütőben. A gélben lévő fehérjéket laboratóriumunkban készített Coomassie-kék festékkel tettük láthatóvá. A festékoldatban lévő gélt 30 másodpercre ismét mikrohullámú sütőbe helyeztük, majd a felmelegített Coomassie festékben 20 percig szobahőmérsékleten billegtetve inkubáltuk. A Coomassie-kék festék aspecifikus kapcsolódásából adódó háttérfestődést Coomassie-kék Destain oldattal mostuk le.

8. táblázat. Fehérje elválasztáshoz használt 12% és 15%-os akrilamid gél összetétele

		12%-os gél	15%-os gél
Elválasztó gél	Desztillált víz	2,19 ml	1,8 ml
	Laemmli elválasztógél puffer	1,3 ml	1,3 ml
	40%-os akrilamid	1,56 ml	1,95 ml
	10%-os APS	50 µl	50 µl
	TEMED	2 µl	2 µl
Tömörítő gél	Desztillált víz	1,44 ml	
	Laemmli tömörítógél puffer	280 µl	
	40%-os akrilamid	260 µl	
	10%-os APS	20 µl	
	TEMED	2 µl	

3.1.6. Fehérjék ellenőrzése Western blot módszerrel

Transzferálás előtt a mintában lévő fehérjéket méret szerint elválasztottuk 12%-os és 15%-os, 1,5 mm vastag SDS-PAGE-én. A futtató gél méretével megegyező méretű PVDF membránt metanolba majd desztillált vízbe áztattuk. A transzfer összeállításakor a felszáráz blottoló készülékre az alkotórészek a következő sorrendben kerültek fel: kettő darab anódpuffer I-esbe és egy darab anódpuffer II-esbe áztatott szűrőpapír, PVDF membrán, poliakrilamid gél, 3 db katódpufferbe áztatott szűrőpapír.

A blottolás 20 percen keresztül történt, az áramerősség mA értékét a PVDF membrán területének (cm²) négyszeresére állítottuk. A fészár blot szétszerelését követően a PVDF membrán szabad fehérjekötő felszínét 5%-os tejpor oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül. Az GST affinitás címkét tartalmazó cTnI és sTnI fehérjék specifikus kimutatásához a blokkolt PVDF membránt 2,5%-os tejpor oldatban 2000x-esre hígított, nyúlban termeltetett, poliklonális anti-GST (Upstate Biotechnology: 06-332) elsődleges antitesttel 2 órán keresztül inkubáltuk. A proBNP fehérje kimutatását a Hytest cégtől rendelt, egérben termeltetett, monoklonális 29D12cc és 15C4cc elsődleges antitestek segítségével végeztük, melyeket szintén 2000x hígításban, 2,5%-os tejpor oldatban használtunk. A nem kötődött elsődleges antitesteket 0,2% Tween-20-at tartalmazó PBS oldatban történő, 10 perces inkubációs lépéssel távolítottuk el a PVDF membrán felületéről. A mosási lépést 3x ismételtük a másodlagos antitest hozzáadása előtt. A tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl (Cell Signaling Technology: #7074) és anti-egér (Cell Signaling Technology: #7076) másodlagos ellenanyagokat 5000x-esre hígítottuk 2,5%-os tejpor oldatban. A membránokat 2 órán keresztül inkubáltuk enyhe billegtetés mellett a megfelelő másodlagos antitestet tartalmazó oldatban. Ezt követően újabb 3x 10 perces mosási lépés következett 0,2% Tween-20-at tartalmazó PBS oldattal. SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) 1-1 ml-es előhívó oldatának hozzáadása előtt a PVDF membránt még 1x átöblítettük PBS oldattal. A membránt 5 percen keresztül inkubáltuk az előhívó folyadékban, majd előhívó kazettába helyeztük. A fehérje jelenlétét igazoló kemilumineszcens jelet a membrán fölé helyezett röntgenfilmen rögzítettük.

3.2. Fehérje specifikus aptamerek és spiegelmerok szelekciója

A PBA-PCR módszer teszteléséhez használt proBNP specifikus aptamereket SELEX módszerrel szelektáltuk. A szendvics típusú mérésben tesztelt cTnI specifikus spiegelmereket Dr. Szeitner Zsuzsanna és András Judit kolléganőim szelektálták. A biotin jelöléssel ellátott szintetizált oligonukleotidokat az IBA cégtől rendeltük meg.

3.2.1. proBNP specifikus aptamer szelektálása SELEX módszerrel

3.2.1.1. SELEX célmolekuláinak kapcsolása mágneses gyöngyhöz

ProBNP specifikus aptamerek szelektálásakor a SELEX lépések során felváltva használtunk peptid és fehérje célmolekulát. A proBNP 9 aminosav hosszúságú peptid

szakaszát a JPT cégtől rendeltük meg. A szintetizált peptid egy C-terminálisan elhelyezkedő cisztein aminosavval lett kiegészítve (h-GHRKMVLYTC-oh), melynek tiol csoportján keresztül a célmolekula hordozó felülethez való kovalensen kapcsolása megvalósítható. A kapcsolat hatékonyságát a cisztein oldalláncok előzetes redukálásával javítottuk, ehhez 200 µg peptidet oldottunk 100 µl borát pufferben, majd azonos térfogatnyi 0,1 M NaBH₄ –et tartalmazó borát puffer adtunk az oldathoz. 5 perc jégen történő inkubálás után ismét 100 µl 0,1 M nátrium-borohidridet tartalmazó borát puffert adtunk a peptid oldathoz, újabb 5 perces inkubálást követően a feleslegben lévő nátrium-borohidrid eltávolítását sósav hozzáadásával, a kémhatás pH 2-re való állításával értük el. A kapcsoláshoz ideális, közel semleges kémhatást 0,1 N NaOH adagolásával értük el. A redukált peptidet tartalmazó oldatot azonos mennyiségű SiMAG-Bromoacetyl Coupling pufferrel elegyítettük. 100 µl SiMAG-Bromoacetyl (Chemicell) ágyat kapcsolat előtt 2x 1 ml SiMAG-Bromoacetyl Coupling pufferrel mostunk, melynek során a mágneses részecskéket mágneses állvány használatával választottuk el a mosó puffertől. Az előkészített ágyat 250 µl SiMAG-Bromoacetyl Coupling pufferben felszuszpendáltuk, és a redukált peptidet tartalmazó oldattal összekevertük. 15 perces inkubációt követően az oldatot mágneses tartóra helyeztük, a felülúszót leszívtuk és 2x 1 ml SiMAG-Bromoacetyl Coupling pufferrel mostuk az ágyat. A gyöngy felületén szabadon maradt bromoacetyl csoportokat SiMAG-Bromoacetyl Blocking pufferben történő újabb 15 perces inkubáció során L-ciszteinnel borítottuk. A blokkoló puffer eltávolítása után a peptiddel borított gyöngyöket 100 µl SiMAG-Bromoacetyl Storage pufferben felvettük, és felhasználásáig hűtőben tároltuk 4 °C-on. Negatív szelekciós lépéshez szükséges 20 µl „üres” SiMAG-Bromoacetyl ágy felszínét szintén L-cisztein tartalmú pufferrel blokkoltuk. A bromoacetyl ágy fényérzékeny, ezért az előkészítő munkálatokat és a kapcsolást sötétben végeztük. A kapcsolat előtti és kapcsolat utáni peptid oldat fehérje koncentrációját NanoOrange protein quantitation kit és Quantus fluoriméter használatával ellenőriztük, a kapcsolat hatékonyságát a két érték különbségéből becsültük.

A szelekció másik célmolekuláját, a GST-vel jelölt proBNP-t *in vitro* transzlációs rendszerben állítottuk elő. A proBNP 30 µl Magne GST affinitás ágyhoz kapcsolását és a transzlációs elegyből történő tisztítását a korábban leírtak alapján végeztük el. A második negatív szelekciós lépésben használt 25 µl Magne GST affinitás

ágy felszínére *E. coli*-ban termeltetett GST fehérjét kapcsoltunk. A fehérjével borított mágneses részecskéket 120 µl 0,05% azidot tartalmazó PBS-ben vettük fel, felhasználásig hűtőben tároltuk 4°C-on.

Kontraszelektációs lépésben alkalmazott 25 µl SiMag-Cyanuric (Chemicell) mágneses ágyat 3x 1 ml SiMag-Cyanuric Washing & Coupling pufferrel ekvilibráltuk, majd 400 µg proBNP mentes plazmafehérjével (Hytest) kapcsoltuk 2 órán keresztül. A szabadon maradt cianur-klorid csoportok blokkolását 500 µl SiMag-Cyanuric Blocking pufferrel valósítottuk meg, felhasználás előtt a gyöngyöket 2x 1 ml PBS-sel mostuk.

3.2.1.2. SELEX

A 76 nukleotid hosszúságú ssDNS-eket tartalmazó DNS könyvtár (4. könyvtár) az IDT cégtől rendeltük, a szekvenciák diverzitását a primer kötő részek által határolt 40 nukleotid hosszúságú random régió biztosította. proBNP specifikus aptamerek szelektálásához 1 nmol, körülbelül 10^{14} különböző szekvenciát tartalmazó oligonukleotid könyvtárat használtunk. Az első szelektációs lépés előtt a 95 °C-ra melegített, majd jégen visszahűtött DNS könyvtárát 20 µl blokkolt SiMAG-Bromoacetyl-es gyönggyel inkubáltuk 1 órán keresztül 2 ml PBS-ben. A mágneses állványra helyezett csövekből a felülúszót átpipettáztuk tiszta 2 ml-es Eppendorf csövekbe. A hordozó felülethez aspecifikusan kötődő szekvenciáktól megszabadított, szűkített DNS könyvtárát ismét 95 °C-ra melegítettük, majd jégen visszahűtöttük, ezt követően az oldatot kiegészítettük a szelektációs puffer többi komponensével (1 mg/ml BSA, 0,1 µg/ml dIdC), majd hozzáadtunk 9 nmol, gyöngyhez kapcsolt peptidet. Az első szelektációs lépésben a peptidet és az egyszálú DNS-t 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten enyhe kevertetés mellett. A peptidhez nem, vagy csak gyengén kapcsolódó szekvenciákat 3 lépésben távolítottuk el, 5-5 percen keresztül tartó 100-100 µl PBS-es mosással. A gyöngyöket 32 µl desztillált vízben felszuszpendáltuk, majd a célmolekulák és aptamer jelöltek között kialakult kölcsönhatást 5 perces 95 °C-os inkubációval szüntettük meg. A gyöngyökről leszívott, ssDNS-t tartalmazó felülúszót használtuk templátként a következő szelektációs lépés előtti PCR-ben. Az eluált szűkített DNS könyvtár számos különböző szekvenciát tartalmazott, ezért a szekvenciák amplifikálásánál a PCR melléktermékek keletkezésének lehetőségét Micellula DNA Emulsion & Purification kit (EURx) használatával csökkentettük. 50 µl PCR elegy 10 µl

5x HF puffert, 0,4 U iProof polimeráz enzimet (Bio-Rad), 500 nM forward primert, 500 nM biotinilált reverse primert, 0,4 mM CleanAmp dNTP elegyetet (Trilink) és 10 µg/ml BSA-t tartalmazott. Az olaj víz emulziót a gyártó leírása alapján készítettük el. Az amplifikációs reakció 5 perces 95 °C-os denaturációs lépéssel kezdődött, a 10 másodperces 95 °C-os denaturációt, a 10 másodperces 59 °C-os primer tapadási lépést és a 10 másodperces 72 °C-os lánchosszabítási lépést tartalmazó ciklus 25x ismétlődött, majd a PCR egy 2 perces 72 °C-os lépéssel zárult. A PCR terméket a további felhasználása előtt az olaj víz emulziót tartalmazó oldatból tisztítottuk, a gyártó protokollja alapján. A PCR ellenőrzését 10%-os PAGE-én végeztük, a gél elkészítéséhez szükséges anyagok a 9. táblázatban kerültek feltüntetésre. A polimerizálódott géleket futtató kádba helyeztük, a puffer tartályokat TBE pufferrel töltöttük fel. 10 µl tisztított PCR terméket 2 µl 6x-os mintapufferrel egészítettünk ki. Az elektroforézishez 100V egyenfeszültséget állítottunk be a tápegységen. A minták detektálása az agarózgélnél ismertetett módon történt.

9. táblázat. DNS vizsgálathoz használt 10%-os akrilamid gél összetétele

10%-os gél	
Desztillált víz	3,2 ml
5x TBE puffer	1,2 ml
30%-os akrilamid	1,6 ml
10%-os APS	100 µl
TEMED	5 µl

A következő szelektációs lépés előtt a ssDNS könyvtárat alkalikus denaturációval történő egyszálúsítással regeneráltuk. A kapcsoláshoz használt 10 µl Dynabeads M270 sztreptavidines paramágneses ágyat (Thermo Fischer Scientific) 3x mostuk 1 ml 1x-es Dynabeads B&W kapcsoló és mosó pufferrel. Az ekvilibrált gyöngyökhöz hozzáadott 40 µl PCR terméket egyenlő mennyiségű 2x-es Dynabeads B&W kapcsoló és mosó pufferrel egészítettük ki. 30 perces inkubációt követően a gyöngyöket 3x 200 µl 1x-es Dynabeads B&W kapcsoló és mosó pufferrel mostuk. A biotinilált reverse és a nem biotinilált szálat 20 µl 20 mM NaOH oldattal választottuk el egy 10 perces inkubáció

során. A gyöngyökről leszívott, ssDNS-t tartalmazó felülúszó kémhatását 3 μ l 200 mM NaH₂PO₄ oldattal állítottuk pH7-re.

A szelekciós ciklust 7x ismételtük meg a célmolekulák mennyiségének és az inkubációs idő hosszának fokozatos csökkentésével, emellett a szelekciós puffer dIdC (deoxyinosinic-deoxycytidylic) tartalmát, valamint a mosási lépések intenzitását folyamatosan növeltük, melynek pontos ismertetése a 10. táblázatban szerepel. Az első négy ciklusban és a 6. ciklusban a SiMAG-Bromoacetyl-es gyöngyhöz kapcsolt peptidet használtuk célmolekulaként, míg az ötödik és hetedik SELEX ciklusban a Magne GST ágyhoz kapcsolt proBNP-re történt a szelekció. A mágneses hordozó felületekhez aspecifikusan kapcsolódó oligonukleotidok eltávolítását az első és ötödik szelekciós ciklus előtt alkalmazott negatív szelekciós lépésekkel kívántuk elérni. A proBNP mellett más plazmafehérjékhez is kapcsolódó aptamer jelöltek eltávolítását célozta a hatodik SELEX ciklus előtt alkalmazott kontraszelekciós lépés, melynek során a szűkített DNS könyvtárat 1 órán keresztül inkubáltuk 400 μ g SiMag-Cyanuric mágneses ágyhoz kapcsolt proBNP-mentes plazmával.

10. táblázat. ProBNP szelektív aptamerek szelektálásakor alkalmazott SELEX lépések

SELEX ciklusszáma	Célmolekula mennyisége	Inkubációs idő	Szelektációs puffer összetétele	Mosási lépés
1. Negatív szelekció	20 µl blokkolt SiMAG-Bromoacetyl-es ágy	1 óra	2 ml PBS	-
1.	9 nmol peptid	1 óra	1. negatív szelektációs lépés felülúszója; 1 mg/ml BSA; 0,01 µg/ml dIdC	3x100 µL PBS (5-5 perc)
2.	4,5 nmol peptid	30 perc	2 ml PBS; 1 mg/ml BSA; 0,1 µg/ml dIdC	3x100 µL PBS (10-10 perc)
3.	2,25 nmol peptid	30 perc	2 ml PBS; 1 mg/ml BSA; 0,1 µg/ml dIdC	3x200 µL PBS (10-10 perc)
4.	2,25 nmol peptid	30 perc	2 ml PBS; 1 mg/ml BSA; 0,1 µg/ml dIdC	1x 100 µl 0,33 mM Dextrán-szulfát (2 perc); 2x200 µl PBS (10-10 perc)
2. Negatív szelekció	25 µl Magne GST ágy + 40 pmol GST fehérje	1 óra	2ml PBS	-
5.	100 pmol proBNP	30 perc	2. negatív szelektációs lépés felülúszója; 1 mg/ml BSA; 0,1 µg/ml dIdC	3x100 µl PBS (10-10 perc)
1. Kontraszelekció	25µl SiMAG-Cyanuric ágy.+ 400 ug plazmafehérje	15 perc	2 ml PBS	-
6.	5 nmol peptid	15 perc	1. kontraszelektációs lépés felülúszója; 1 mg/ml BSA; 0,1 µg/ml dIdC; 5 mM EDTA	1x 300 µl PBS (10 perc); 1x 100 µl 0,33 mM Dextrán-szulfát (10 perc); 1x300 µl PBS (10 perc)
7.	20 pmol proBNP		2 ml PBS; 1 mg/ml BSA; 0,1 µg/ml dIdC; 5 mM EDTA	1x 1000 µl PBS (10 perc) 1x 300 µl 0,33mM Dextrán-szulfát (10 perc); 1x 300 µl 0,33 mM Dextrán-szulfát (10 perc); 1x1000 µl PBS (10 perc)

Az utolsó SELEX ciklust követően 4 µl tisztított PCR termékeket Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific) használatával 10 ng PCR-Blunt II-TOPO vektorba ligáltunk, és Alpha-select Gold kompetens sejtekbe transzformáltunk a már korábban ismertetett módon. A ligálás és transzformálás eredményességét kolónia PCR-rel ellenőriztük. 20 µl PCR elegy 10 µl 2x PCRBIO Taq Mix-et (PCR Biosystems), 500 nM M13 forward primert és 500 nM M13 reverse primert tartalmazott, templátként a kanamicines táptalajon felnőtt baktériumtelepekről vett

minta szolgált. A PCR program a korábban ismertetett kolónia PCR beállításaival megegyezett. 130 PCR termék méretét LabChip GXII automatizált kapilláris elektroforézis készülékkel (PerkinElmer) ellenőriztük. A mérést DNA Extended Range LabChip-el és DNA 1K Assay kit-tel (PerkinElmer) végeztük a gyártó protokollja alapján, a mintákat a kapilláris elektroforézis előtt 40x-esre hígítottuk TE pufferrel. A megfelelő méretű PCR termékek közül 96-ot megszekvenáltattunk az M13 reverse primerek segítségével. A szekvenáltatott mintákat BioEdit programmal ellenőriztük.

3.3. Primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR)

3.3.1. PBA-PCR optimalizálása

Optimalizálás előtt a primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) működését a klasszikus szimmetrikus PCR-rel és aszimmetrikus PCR-rel hasonlítottuk össze. 50 µl PCR elegy 25 µl 2x PCRBIO Taq Mix- et (PCR Biosystems), 0,1 ng/µl oligonukleotid templátot (2. aptamer), 500 nM forward primert és a klasszikus PCR esetén 500 nM, a hagyományos aszimmetrikus PCR és a PBA-PCR esetén pedig 25-25 nM reverse primert tartalmazott. Emellett a PBA-PCR elegy 475 nM 3' végen blokkolt reverse primerrel lett kiegészítve. A PCR 1 perces 95 °C-os denaturációs lépéssel kezdődött, a 25x ismétlődő ciklus 15 másodperces 95 °C-os, 15 másodperces 60 °C-os és 5 másodperces 72 °C-os lépést tartalmazott, a PCR egy 2 perces 72 °C-os lépéssel zárult. A PBA-PCR és aszimmetrikus PCR során keletkezett egyszálú termékek pontosabb vizsgálatához a PCR-eket megismételtük 5' biotinilált reverse primerekkel és a korábban használt forward és 3' végen blokkolt reverse primerekkel. Amplifikációt követően a biotinilált dsDNS-t SiMAG-Streptavidin (Chemicell) gyöngyökhöz kapsoltuk a gyártó protokollja alapján. Az egyszálú DNS-t tartalmazó felülűszót a gyöngyökről leszártuk és 10%-os PAGE-én megfuttattuk. Az elektroforézist követően a géleket, GelRed (Biotium) festékkel inkubáltuk 20 percen keresztül, a jelek detektálásához GelDoc készüléket használtunk.

A PBA-PCR-nél alkalmazott optimális primer arány vizsgálatához összemért 50 µl-es PCR elegy 25 µl 2x PCRBIO Taq Mix- et (PCR Biosystems) és 0,1 ng/µl egyedi oligonukleotid (2. aptamer) templátot tartalmazott. A forward primer koncentrációját konstansan 500 nM-on tartottuk. A reverse és 3' végen blokkolt reverse primereket együttesen a forward primerrel ekvimoláris mennyiségben adtuk a reakciós

elegyhez, az arányukat azonban a 11. táblázatban feltüntetett módon változtattuk. Az alkalmazott PCR program beállításai a korábban ismertettekkel megegyeztek.

11. táblázat. PBA-PCR primer arány optimalizálásához használt reverse primer és 3' blokkolt reverse primer koncentrációk

Reverse : 3'blokkolt reverse primer	1:9	1:19	1:49	1:99
Reverse primer (nM)	50	25	10	5
3'P blokkolt reverse primer (nM)	450	475	490	495

A PCR program optimális ciklusszámának meghatározásához a reakciónként 50 µl-es PBA-PCR elegy 25 µl 2x PCRBIO Taq Mix-et (PCR Biosystems), 0,1 ng/µl egyedi oligonukleotid (1. aptamer) vagy 0,1 ng/µl random DNS könyvtár (1. könyvtár) templátot, 500 nM forward, 25 nM reverse valamint 475 nM 3' végen blokkolt reverse primert tartalmazott. A PCR ciklusszám változtatásának hatását aszimmetrikus PCR-nél is megvizsgáltuk, ebben az esetben a PCR elegy a PBA-PCR-ével megegyezett, azonban 3' végen blokkolt reverse primert nem tartalmazott. A vizsgálatban a korábban ismertett PCR programot használtuk változó számú PCR ciklussal (25, 35, 45 és 55), a PCR termékeket 10%-os PAGE-én vizsgáltuk.

A PBA-PCR univerzális használhatóságának ellenőrzéséhez optimalizált beállításokkal (45 PCR ciklus, 500 nM forward primer, 25 nM reverse és 475 nM 3' végen blokkolt reverse primer) mértünk össze 8 PCR-t, melyek templátjaként 4 egyedi (1-4. aptamer) és 4 random DNS könyvtár szekvencia (1-4. könyvtár) szolgált, a PCR termékek ellenőrzését 10%-os PAGE elválasztással végeztünk el.

3.3.2. Az ssDNS hővel történő tisztítása PBA-PCR termékből

A 4. aptamer templátot 5' végen biotinizált reverse primert és 3' végen foszforilált és 5' végen biotinizált blokkolt reverse primert tartalmazó, optimalizált PBA-PCR-rel amplifikáltuk. A PCR terméket Dynabeads M-280-as sztreptavidines paramágneses gyöngyhöz kapcsoltuk a gyártó protokollja alapján. A gyöngyhöz kapcsolt PCR terméket 8 felé osztottuk, az egyes mintákat 5 percen keresztül 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, illetve 90 °C-on inkubáltuk, majd azonnal mágneses tartóra helyeztük, és a felülúszókat leszívtuk, az így kapott minták ssDNS tartalmát 10%-os PAGE-vel ellenőriztük.

3.3.3. PBA-PCR termék új generációs szekvenáltatása

Optimalizált PBA-PCR alkalmazásával amplifikáltuk a 4. random DNS könyvtárat, jelöletlen primerek felhasználásával. A PBA-PCR termékét 2%-os E-Gel SizeSelect (Invitrogen) gélen elválasztottuk, az ssDNS-t az agaróz gél alsó részén található, minta kinyerésére szolgáló zsebekből begyűjtöttük, és új generációs szekvenáltatásra a Xenovea Kft-nek elküldtük.

3.3.4. Aptamerek előállítás PBA-PCR-rel és lambda exonukleáz kezeléssel

A PBA-PCR-rel sokszorosított egyszálú oligonukleotidok alkalmazhatóságát a proBNP-re szelektált aptamerek kapcsán vizsgáltuk meg. A PBA-PCR és lambda exonukleáz kezelés összehasonlításához 3 aptamer jelöltet és egy DNS könyvtárat vizsgáltunk (11-es, 20-as, 30-as aptamer és 4. könyvtár). Az oligonukleotidok PBA-PCR-rel történő előállítását a korábbi fejezetben leírt optimalizált PCR-rel készítettük, biotinilált forward primerek felhasználásával, templátként 10-10 nM szintetizáltatott aptamert használtunk.

A lambda exonukleáz kezeléshez szükséges duplaszálú DNS-t 25 ciklusos PCR-ben állítottuk elő, 500 nM biotinilált forward primer és 500 nM 5' végen foszforilált reverse primer segítségével, a PCR többi beállítása a PBA-PCR-rel megegyezett. 36 µl PCR termék egyszálásításához 1 U lambda exonukleáz enzimet (Thermo Scientific) használtunk, az oldatot 4 µl 10x-es reakció pufferrel egészítettük ki, és 30 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az enzim inaktiválása 10 perces inkubációval történt 80 °C-on. A PBA-PCR termékét és a lambda exonukleáz emésztés hatékonyságát 10%-os PAGE-én ellenőriztük.

48 biotinilált aptamer jelölt előállításához (függelék: 1. táblázat), a korábbi fejezetben leírt, optimalizált PBA-PCR módszert alkalmaztuk, biotinilált forward primerek felhasználásával. A reakciók templátjaként a szekvenáltatáshoz készített kolónia PCR-ek termékei szolgáltak, melyek 40x-es hígításából 1-1 µl-t használtunk. A PBA-PCR termékeket LabChip GXII készülékkel ellenőriztük a korábban ismertetett módon.

3.3.5. Aptamer jelöltek ellenőrzése Alpha módszerrel

A 4 lambda exonukleáz kezeléssel és 4 PBA-PCR-rel előállított oligonukleotid fehérjekötő képességét *in vitro* translációs rendszerben előállított, GST címkével ellátott proBNP-vel ellenőriztük AlphaLisa rendszerben. Az alkalmazott AlphaLisa méréshez az oldatokat 384 kamrás mikrotiterlemezen mértük össze (AlphaPlate-384 SW, Perkin Elmer). A 15 nM végkoncentrációban alkalmazott, biotin jelöléssel ellátott aptamereket 50 nM és 100 nM koncentrációban alkalmazott proBNP-vel inkubáltunk 1 órán keresztül, 20 µl 1 mg/ml BSA-t és 0,1 µg/ml dIdC-t tartalmazó PBS pufferben. A következő lépésben AlphaLisa Streptavidin Acceptor gyöngyöt és AlphaScreen Gluthatione Donor gyöngyöt (Perkin Elmer) adtunk a mintákhoz 20-20 µg/ml koncentrációban, az EnSpire (Perkin Elmer) készülékkel történő mérés előtt újabb 1 órán keresztül inkubáltuk az Alpha elegyet 25°C-on, a lumineszcens jelek detektálása a gyártó által javasolt beállításokkal történt.

A 48 PBA-PCR-rel előállított aptamer AlphaScreen módszerrel történő ellenőrzését hasonló beállításokkal végeztük el, változtatás a használt fehérjékben és az alkalmazott Alpha gyöngyökben történt. Ehhez a méréshez a nagyobb mennyiségű proBNP-t *E. coli* expressziós rendszerben állítottuk elő hexaHIS címkével, a fehérjét 30 és 50 nM végkoncentrációban használtuk mérési pontonként. A biotinizált aptamereket sztreptavidin donor, míg a fehérjét Nickel-Chelate (Ni-NTA) Acceptor gyöngyökhöz kapcsoltuk (Histidine detection kit). A mérésekhez negatív kontrollként a kiindulási random DNS könyvtárból PBA-PCR-rel előállított terméket használtuk, továbbá a proBNP-nek és az előállított aptamereknek az üres AlphaScreen gyöngyhöz való aspecifikus kapcsolódását is megvizsgáltuk. A donor gyöngyök fényérzékenysége miatt a mérések előtti előkészületeket besötétített helyiségben végeztük.

A 6 legígéretesebb aptamer jelölt működését komplex fehérje mintában is megvizsgáltuk, amihez AlphaLisa elegyben 10x-esre híguló proBNP-mentes plazmát használtunk (Hytest). Plazma minták vizsgálatára a Nickel-Chelate (Ni-NTA) AlphaScreen Acceptor gyöngyök nem alkalmasak, ezért ebben az esetben Anti-6xHis AlphaLisa Acceptor gyöngyöt használtunk, a mérés többi paraméterén nem változtattunk.

3.3.6. SELEX előrehaladtának ellenőrzése AlphaScreen módszerrel

12,5 nmol kiindulási DNS könyvtárat és az egyes SELEX ciklusok (1-7) PCR termékeinek 40x-es hígításából származó 1-1 µl mintát optimalizált PBA-PCR-rel amplifikáltuk, biotinizált forward primerek segítségével. A PBA-PCR-rel előállított szűkített DNS könyvtárak célfehérjekötő-képességét (30 nM proBNP) AlphaScreen Histidine detection kit használatával ellenőriztük az előző fejezetben leírtak alapján.

3.4. Spiegelmer alapú szendvics típusú mérés

3.4.1. Spiegelmer ellenőrzése biolayer interferometria módszerrel

A vizsgált spiegelmer szekvenciái az 5. táblázatban kerültek feltüntetésre. A spiegelmer célmolekulakötő-képességét biolayer interferometria módszerrel vizsgáltuk BLItz (FortéBio) készüléken. Használat előtt a sztreptavidinnel borított (SA) bioszenzort hidratáltuk 10 percen keresztül PBS pufferben. A méréshez „Advanced kinetics” modult használtunk a következő beállításokkal: kezdeti alapvonal felvétel 30 másodpercen keresztül PBS-ben, PBS-ben oldott 200 nM-os biotinizált spiegelmer oldat kapcsolása SA bioszenzorhoz 2 percen keresztül, 30 másodperces alapvonal felvétel szelektív pufferben (1 mg/ml BSA-t és 0,1 µg/ml dIdC-t tartalmazó PBS), 2 perc asszociációs lépés szelektív pufferben lévő különböző koncentrációjú Troponin (I-T-C) fehérje komplex oldatokkal (0, 25, 50 nM), 2 perces disszociációs lépés szelektív pufferben. A spiegelmerrel borított bioszenzorokat a mérések között 10 mM, pH 2-glicin oldattal regeneráltuk 10 másodpercen keresztül. Az eredmények kiértékeléséhez a készülékhez tartozó BLItz pro software-t használtuk.

3.4.1. Spiegelmer alapú szendvics mérés ellenőrzése Alpha módszerrel

AlphaLisa mérésekhez a mintákat AlphaPlate-384 SW mikrotiterlemezen állítottuk össze. A különböző vizsgálatokban a szendvics mérések összeállításának menete megegyezett. Első lépésben a cTnI fehérje N-terminális epitópjára specifikus (B10) spiegelmert inkubáltuk 1 órán keresztül a célfehérjével vagy a negatív kontrollként használt fehérjével. Ezt követően AlphaLisa Streptavidin Acceptor gyöngyöket mértünk az oldathoz 20 µg/ml koncentrációban, az alkalmazott 30 perces inkubációs idő alatt a cTnI fehérje C-terminális epitópjára specifikus spiegelmereket (C6/ C6r), külön Eppendorf-csövekben, AlphaScreen Streptavidin Donor gyöngyökkel (20 µg/ml) inkubáltuk. Utolsó lépésként az AlphaLisa akceptor és AlphaScreen donor

gyöngyöket tartalmazó oldatokat összekevertük, és újabb két órán keresztül inkubáltuk az elkészült Alpha elegyeket az EnSpire készülékkel történő lumineszcensjel-detektálás előtt. A biotinizált spiegelmereket minden esetben 10-10 nM-os végkoncentrációban használtuk.

A méréseket 1 mg/ml BSA-t és 0,1 µg/ml dIdC-t tartalmazó PBS pufferben és 10x-esre hígított, troponinI-mentes szérumot (Hytest), 1 mg/ml BSA-t és 0,1 µg/ml dIdC-t tartalmazó PBS pufferben végeztük el. A pufferek összetétele és a mérés összeállítása ettől csak az optimalizálási lépéseknél tért el, melynek során megvizsgáltuk a mintapufferhez adott dIdC (0,01-1µg/ml), lazac sperma (0,1-1 µg/ml), Tween-20 (0,05%) és Triton X-100 (0,05%) hatását, valamint a spiegelmerekek és Alpha gyöngyök hozzáadási sorrendjét.

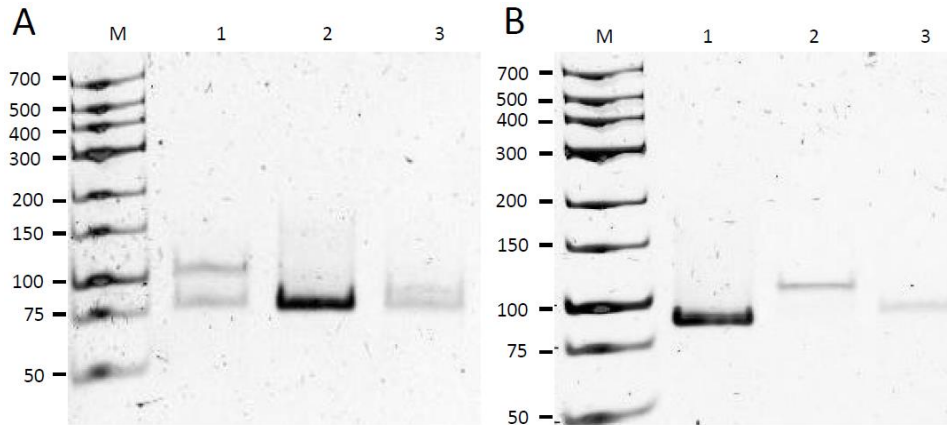
Spiegelmerekek szendvics típusú mérésben való alkalmazhatóságát 5 nM *in vitro* transzlációval előállított cTnI fehérjével és 5 nM troponin (I-T-C) komplex-szel (Hytest) vizsgáltuk, a méréshez negatív kontrollként 5 nM *in vitro* transzlációval előállított sTnI fehérjét alkalmaztunk. A spiegelmer alapú szendvics mérés koncentráció meghatározásra való alkalmazhatóságát 1,25 nM, 2,5 nM, 5nM és 10 nM *in vitro* transzlációval előállított cTnI fehérjével vizsgáltuk, negatív kontrollként 10 nM sTnI fehérjét (Hytest) használtunk.

4. Eredmények

4.1. Primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR)

Az aszimmetrikus PCR-ben számos nem specifikus termék keletkezése tapasztalható még a legegyszerűbb elrendezésben is, mikor csak egyféle DNS templátot tartalmaz a reakció elegy. A 3' végen foszforilált, limitáló primerekkel kiegészített primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) melléktermék-képződést gátló hatását klasszikus PCR-rel és hagyományos aszimmetrikus PCR-rel összehasonlítva vizsgáltuk. A forward és reverse primer aránya a klasszikus PCR-nél 1:1, az aszimmetrikus PCR-nél 20:1 volt. A PBA-PCR-nél a forward és reverse primer arány a hagyományos aszimmetrikus PCR-rel megegyezett, a reakció oldatot további 3' végen blokkolt reverse primerrel egészítettük ki olyan mértékben, hogy a két reverse primer együtt a forward primerrel egyenlő mennyiségben legyen jelen. A három PCR termék eltérő mintázatot mutatott a nem denaturáló poliakrilamid gélen történt elválasztáskor. A klasszikus PCR egyetlen, várt méretű terméket eredményezett, míg a két aszimmetrikus PCR-nél megjelent 1-1 újabb, a gélben lassabban haladó termék is. A PBA-PCR-nél nem volt tapasztalható az aszimmetrikus PCR-nél látható, melléktermék keletkezésére utaló elmosódás a két termék között (12. ábra).

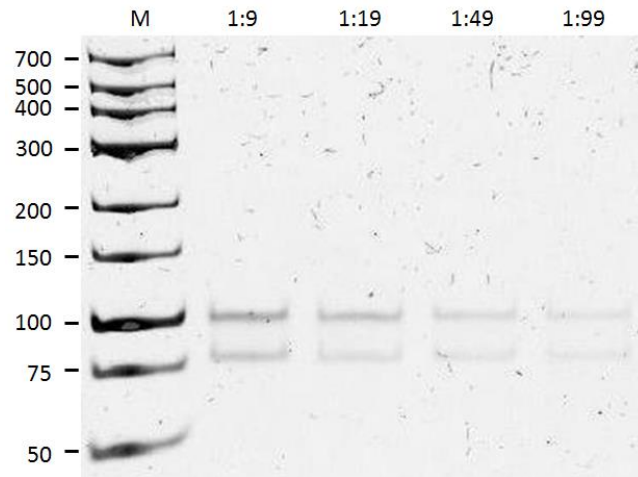
Az ssDNS termékek meghatározásához a PCR-eket megismételtük biotinizált reverse primerekkel és a korábban használt forward és 3' végen blokkolt reverse primerekkel. A PBA-PCR és aszimmetrikus PCR termékekből a kétszálú terméket sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyök segítségével eltávolítottuk. A felülúszók PAGE analízise alapján a gélben lassabban haladó PCR termékek felelnek meg az ssDNS-nek. A PBA-PCR-nél az egyszálú termék lassabban haladt a hagyományos aszimmetrikus PCR ssDNS mintájához képest, ami valószínűleg a kapcsolódó 3' blokkolt primerek miatt kialakuló részlegesen kétszálú terméknek köszönhető (12. ábra).



12. ábra. (A) ssDNS előállítás hagyományos (A-PCR) és primer blokkolt aszimmetrikus PCR-rel (PBA-PCR). (1) PBA-PCR, (3) A-PCR és (2) klasszikus PCR termék elválasztása PAGE módszerrel. (B) (2) PBA-PCR és (3) A-PCR egyszálú termékének PAGE vizsgálata, a biotinilált dsDNS termék, sztreptavidines gyöggel történő eltávolítását követően. (1) Klasszikus PCR terméke jelezte a dsDNS haladási sebességét PAGE-en. (M) Molekulatömeg-marker bázispárban megadva.

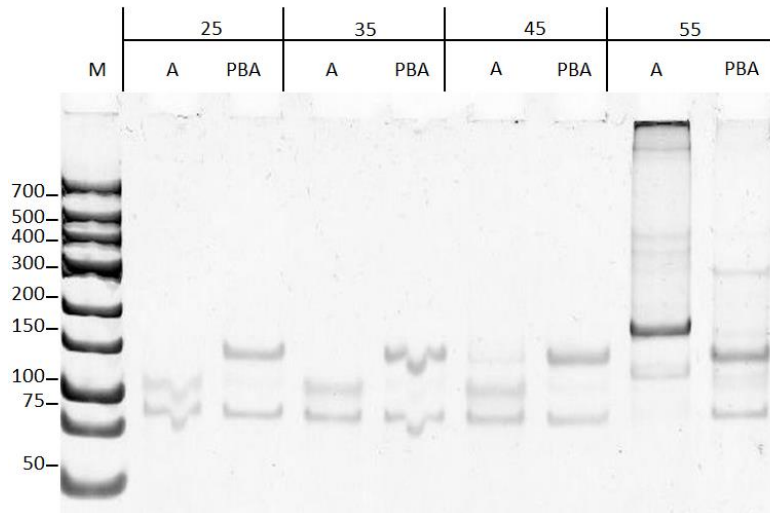
4.2. PBA-PCR optimalizálása

A PBA-PCR-rel végzett előkísérletek arra utaltak, hogy a reakció elegyhez adott 3' blokkolt primer kedvező hatással van a keletkezett egyszálú termék mennyiségére és minőségére. A nagyobb mennyiségű ssDNS és a magasabb ssDNS : dsDNS arány elérésének érdekében a PBA-PCR-t optimalizáltuk. Az ideális primer arányok meghatározásához a forward (feleslegben adott) primer mennyiségén nem változtattunk, míg a reverse és 3' blokkolt reverse primer arányát 1:9 és 1:99 között változtattuk. 1:49-es és 1:99-es reverse : 3' blokkolt reverse primer arány mellett minimális mennyiségű dsDNS keletkezését tapasztaltuk, azonban ezekben a PCR-ekben az ssDNS-ből is kevés szintetizálódott. Az 1:9 és 1:19 arányban alkalmazott reverse primerek megfelelő mennyiségű egyszálú terméket eredményeztek PBA-PCR során. A keletkezett ssDNS : dsDNS arány a reverse primerhez képest 19-szeres feleslegben alkalmazott 3' blokkolt primer esetén enyhén magasabbnak mutatkozott, ezért a későbbi vizsgálatoknál ezt a primer arányt alkalmaztuk (13. ábra).



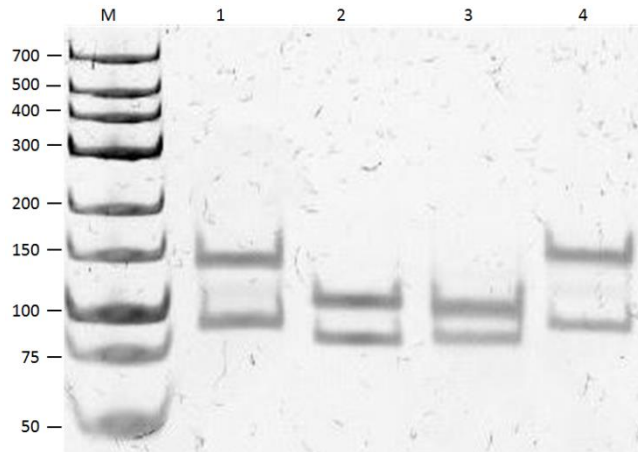
13. ábra. Primer blokkolt aszimmetrikus PCR optimalizálása változó koncentrációjú standard és 3' blokkolt reverse primer arányokkal. A PCR elegyek 1:9, 1:19, 1:49 és 1:99 arányban tartalmazták a standard és 3' blokkolt reverse primereket. A PCR termékeket PAGE-én futattuk meg (M) bázispárban megadott molekulatömeg-marker mellett.

Az optimalizálás következő lépésében a ssDNS mennyiségét a PBA-PCR megnövelt ciklusszámával kívántuk fokozni. A PBA-PCR termékek keletkezését 25, 35, 45, és 55 ciklusból álló PCR-ben vizsgáltuk. Az egyedi szekvenciát tartalmazó templátról készült termékek mennyiségét és minőségét azonos ciklusszámmal készült hagyományos aszimmetrikus PCR-ek termékeivel hasonlítottuk össze. A gélelektroforézis eredmények alapján látható, hogy az aszimmetrikus PCR terméke, az összes vizsgált ciklusszám esetén kisebb mennyiségben tartalmazza a megfelelő méretű ssDNS-t. Továbbá a hagyományos aszimmetrikus PCR-nél a melléktermék képződés már a 45. PCR ciklusnál megfigyelhető, 55 ciklust követően pedig az eredeti templát 76 bázispár hosszúságú kétszálú és egyszálú DNS terméke nem látható a gélen, helyette nagyobb méretű, melléktermékekre utaló elmosódott sávok jelentek meg a PAGE felsőbb részén (14. ábra). Ezzel szemben a 45 ciklust tartalmazó PBA-PCR, melléktermékektől mentes, megfelelő tisztaságú ssDNS-t eredményez. Az aspecifikus termékek keletkezése csak az 55. ciklust követően figyelhető meg, azonban még ekkor is a várt hosszúságú egyszálú termék van jelen legnagyobb mennyiségben a PBA-PCR termékben (14. ábra).



14. ábra. PCR ciklusszám változtatásnak hatása (A) hagyományos aszimmetrikus és (PBA) primer blokkolt aszimmetrikus PCR esetén. Egyedi templátról, 25, 35, 45 és 55 amplifikációs lépésben készített PCR termékek PAGE vizsgálatát, a méret meghatározást a bázispárban megadott (M) molekulatömeg-marker segítette.

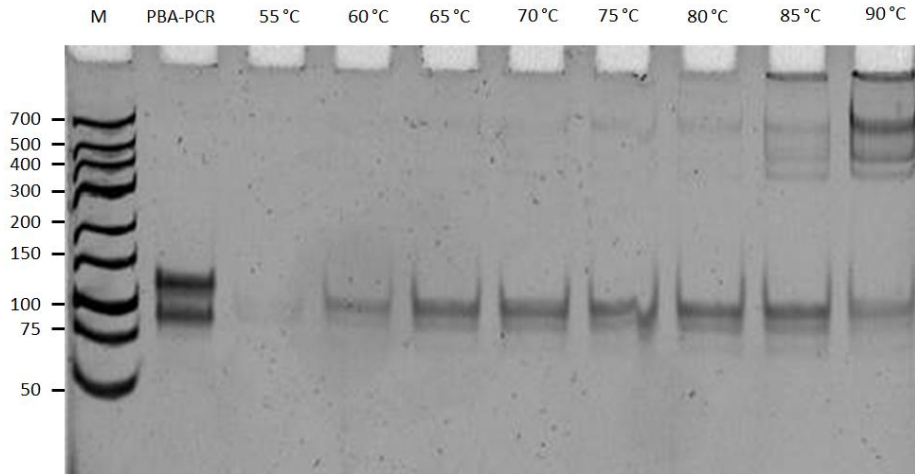
Az optimalizált PBA-PCR beállítások általános alkalmazhatóságát 4 eltérő primer régióval rendelkező, egyedi szekvencia vizsgálatával ellenőriztük. A termékek PAGE elemzése alapján a primerek eltérő szekvenciája nem befolyásolja a keletkezett ssDNS mennyiségét, továbbá egyik esetben sem tapasztaltuk a melléktermékek képződését az optimálisnak ítélt 45 ciklusnál. Az egyszálú termékek gélelektroforézisben tapasztalható eltérő haladási sebessége feltételezhetően a vizsgált ssDNS-ek változatos másodlagos szerkezetének köszönhető (15. ábra).



15. ábra. A PBA-PCR univerzális használhatóságának ellenőrzése egyedi szekvencia templát esetén. 4 egyedi oligonukleotid templát (1-4) PBA-PCR-rel amplifikált termékét PAGE segítségével ellenőriztük, a fragmentumok méret meghatározását (M) bázispárban megadott molekulatömeg-marker segítette.

A PBA-PCR – a kiindulási forward : reverse primer arányok alapján – mintegy 5% dsDNS tartalmaz, valamint a nagyobb mennyiségben termelődött ssDNS a hozzá hibridizálódó blokkoló primerek miatt részlegesen szintén kétszálú. Megjegyzendő, a részleges kétszálúság az esetek többségében nem befolyásolja a termék alkalmazhatóságát. Bizonyos módszereknél azonban szükség lehet a tisztán ssDNS tartalmú minta előállítására is. A teljes mértékben egyszálú DNS előállításához az optimalizált PBA-PCR-t 5' végén biotinilált és 3' blokkolt reverse primerekkel és 5' végén biotinilált reverse primerekkel állítottuk össze, majd a PCR terméket sztreptavidines paramágneses gyöngyhez kapcsoltuk. A gyöngyhez kapcsolódó blokkoló reverse primerről az ssDNS-t hővel eluáltuk, a felülúszóban megjelenő, tisztán egyszálú DNS-t a gyöngyhez kapcsolódó blokkoló reverse primerektől és a dsDNS termékektől eltávolítottuk. Melegítés hatására a sztreptavidin és a hozzá kapcsolódó biotinilált DNS a paramágneses gyöngy felületéről leválhat, ezért az eluáláshoz optimális hőmérsékletet 55 és 90 °C közötti tartományban vizsgáltuk. A PAGE analízis alapján az ssDNS már a legalacsonyabb alkalmazott hőmérséklet hatására megjelent a felülúszóban, és az eluált ssDNS mennyisége a hőmérséklet emelésével jelentősen megnőtt (16. ábra). 75 °C-nál magasabb hőmérsékleten azonban az eluált mintában a gyöngyről leváló sztreptavidinre utaló jeleket is tapasztaltuk. Ezek alapján 65 °C-on történő denaturálás a legoptimálisabb, ugyanis ennél a hőmérsékletnél nagy

mennyiségű, tiszta egyszálú DNS-t eluáltunk. A hődenaturálással tisztított ssDNS PAGE-én a PBA-PCR termékétől eltérő magasságban jelenik meg, ezt a méretkülönbséget az eltávolított blokkoló primer magyarázhatja.

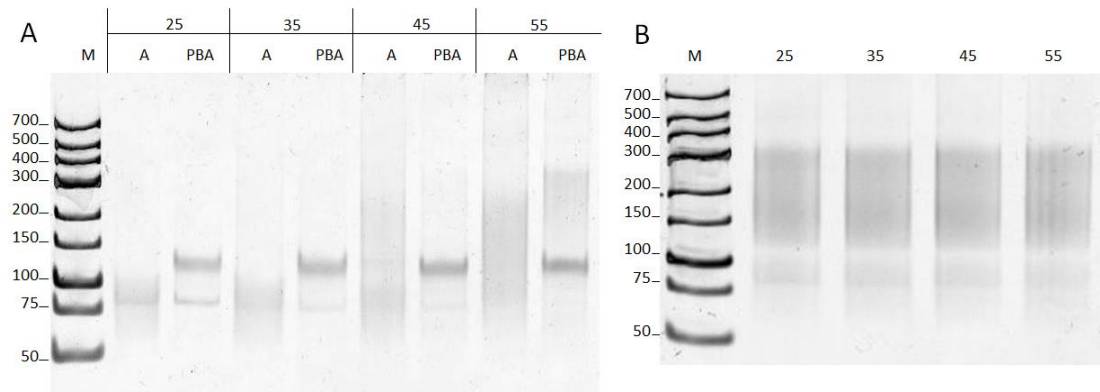


16. ábra. PBA-PCR termék tisztítása hődenaturációval. A biotinilált PCR terméket sztreptavidines gyöngyöz kapcsoljuk, 5 perces inkubációt követően az ssDNS-t eltérő hőmérsékleteken eluáltuk. A gyöngyről 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C és 90 °C-on eltávolított felülúszókat PAGE alkalmazásával ellenőriztük, az eluált minták méretét PBA-PCR termékével hasonlítottuk össze, a fragmentumok méret meghatározását (M) bázispárban megadott molekulatömeg-marker segítette.

4.3. Random oligonukleotid könyvtárak amplifikálása PBA-PCR-rel

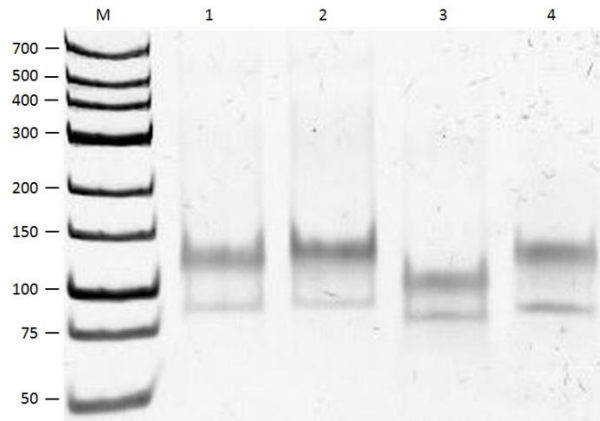
A nagy szekvencia variabilitással rendelkező random oligonukleotid könyvtárak amplifikálása különösen nagy kihívást jelent, a már a PCR korai szakaszában megjelenő aspecifikus termékek miatt. Komplex templátok amplifikálhatóságát összehasonlítottuk klasszikus PCR, hagyományos aszimmetrikus PCR és PBA-PCR alkalmazásával. A ssDNS mennyiségét és a melléktermék képződés mértékét 25, 35, 45 és 55 PCR ciklusnál vizsgáltuk. A klasszikus PCR ciklusszámtól függetlenül, többségében aspecifikus termékeket tartalmazott, az eredeti hosszúságú dsDNS PAGE-én alig volt látható. A legalacsonyabb vizsgált ciklusszám nagymennyiségű melléktermék képződését eredményezte a hagyományos aszimmetrikus PCR-nél is, a ciklusszám növelésével az eredeti hosszúságú termék fokozatos eltűnése és az aspecifikus termékek

felhalmozódása volt megfigyelhető. Ezzel szemben a PBA-PCR-ben alkalmazott blokkoló primerek, kevert szekvenciákat tartalmazó templát esetén is képesek voltak megakadályozni a melléktermék-képződést. A 45. PCR ciklusig a termékben szinte kizárólag a megfelelő méretű egyszálú termék keletkezése figyelhető meg. Az 55. PCR ciklusban már tapasztalható a melléktermékek keletkezése, azonban az eredeti méretű termék még ebben az esetben is túlsúlyban van (17. ábra).



17. ábra. Random DNS könyvtárak amplifikálása (A) (A) hagyományos aszimmetrikus és (PBA) primer blokkolt aszimmetrikus PCR-rel és (B) klasszikus PCR-rel. A kevert oligonukleotidokat tartalmazó templátot 25, 35, 45 és 55 PCR ciklussal amplifikáltuk. A PCR termékek vizsgálatát PAGE alkalmazásával végeztük el, a fragmentumok méret meghatározását (M) bázispárban megadott molekulatömeg-marker segítette.

A PBA-PCR univerzális használhatóságának vizsgálatát különböző primer régiókkal rendelkező random DNS könyvtárakkal is elvégeztük, és az eltérő oligonukleotid könyvtárak amplifikálhatóságában nem találtunk különbséget. 45 PBA-PCR ciklus, mind a négy vizsgált DNS könyvtár esetén megfelelő mennyiségű ssDNS-t eredményezett, melléktermék képződés pedig csak kismértékben volt megfigyelhető (18. ábra).



18. ábra. PBA-PCR univerzális használhatóságának ellenőrzése kevert szekvencia templát esetén. 4 oligonukleotid könyvtár templát PBA-PCR-rel amplifikált termékét (1-4) PAGE segítségével ellenőriztük, a fragmentumok méret meghatározását (M) bázispárban megadott molekulatömeg-marker segítette.

PAGE analízis alapján látható, hogy a PBA-PCR-rel megfelelő méretű ssDNS-ek kevert DNS templátból is sokszorosíthatóak, azonban a PCR termék összetételéről ezen vizsgálatok nem szolgáltatott információt. A random oligonukleotid könyvtárak amplifikálásakor egyik legfontosabb szempont a diverzitás megőrzése. Ezért a PBA-PCR termék szekvencia összetételét új generációs szekvenálással (NGS) is megvizsgáltuk, melyhez a szekvenálást a Xenovea Kft végezte el Illumina NextSeq 550 készüléken. A NGS szekvencia elemzés alapján a PBA-PCR nincs negatív hatással az amplifikált random DNS könyvtár diverzitására, a szekvenciák 99,8%-a csak egyszer fordult elő a szekvenáláskor leolvasott 203 795 DNS szakaszban.

4.4. PBA-PCR alkalmazása aptamerek szűrésére és a szelekció ellenőrzésére

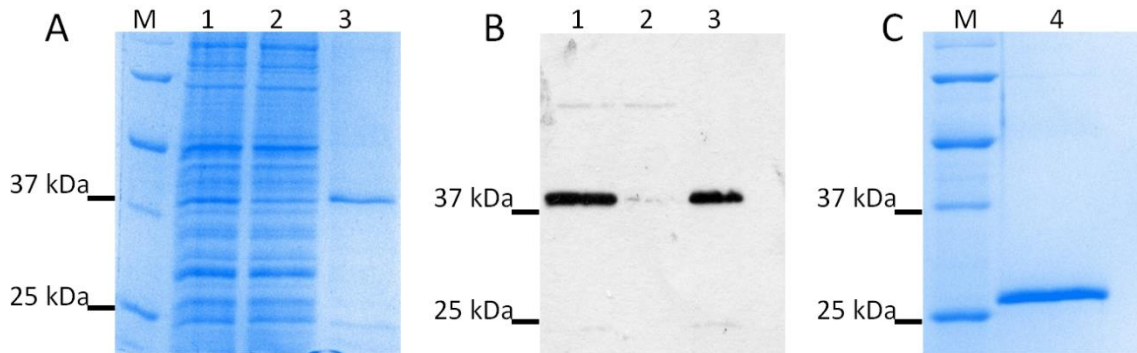
A PBA-PCR-rel előállított ssDNS-ek alkalmazhatóságát, aptamerek szűrésének és a SELEX előrehaladtának vizsgálata kapcsán ellenőriztük. A PBA-PCR vizsgálatához használt aptamer szelekciót a proBNP-re kiviteleztek az alábbiak alapján.

4.4.1. SELEX-ben használt célmolekulák előkészítése és ellenőrzése

ProBNP specifikus aptamerek szelektálását peptid és fehérje célmolekulák felváltott alkalmazásával valósítottuk meg, a könnyebb és hatékonyabb kivitelezés érdekében a célmolekulákat mágneses gyöngyök felszínéhez rögzítettük.

A 9 aminosav hosszúságú peptidszakasz SiMAG-Bromoacetyl-es ágyhoz történő rögzítését, a kapcsolás előtti és kapcsolás utáni felülúszó fehérje koncentrációjának vizsgálatával ellenőriztük. Quantus fluoriméterrel történt mérések alapján a peptid kapcsolás sikeres volt a célmolekulák 55% kapcsolódott a mágneses ágyhoz.

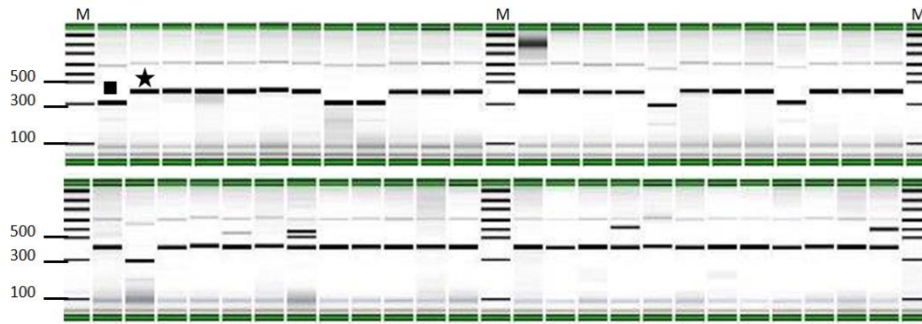
A SELEX másik célmolekulájának, proBNP-enek *in vitro* transzlációs rendszerben történő előállítását SDS-PAGE alkalmazásával ellenőriztük. A vártnak megfelelően, a GST jelöléssel rendelkező proBNP-ét 38 kDa körüli magasságban detektáltuk Coomassie festéssel és Western blot módszerrel. A SELEX során a proBNP-ét Magne GST ágyhoz kapcsolt formában használtuk. Az SDS-PAGE vizsgálat alapján, a proBNP kapcsolása sikeres volt, a célfehérje megfelelő tisztaságban volt jelen a gyöngy felszínén, aspecifikusan kapcsolódó fehérjék csak kis mennyiségben voltak láthatóak a gélképen. Western blot alapján a transzlált fehérje nagyrészt kapcsolódott az affinitás gyöngyöz, a kapcsolás utáni felülúszóban a proBNP csak kis mértékben volt kimutatható. A negatív szelekcióhoz használt, *E. coli*-ban termeltetett GST fehérje Magne GST ágyhoz történő kapcsolása az SDS-PAGE vizsgálat alapján szintén sikeres volt, a fehérje 26 kDa körüli magasságban volt megfigyelhető (19. ábra).



19. ábra. SELEX-hez előállított fehérjék ellenőrzése. *In vitro* transzlációval előállított, GST címkével jelölt proBNP-t 12%-os PAGE-ével ellenőriztük (A) Coomassie-kék festéssel és (B) Western blot módszerrel. (C) Az *E. coli*-ban termeltetett GST fehérje Magne GST ágyhoz történő kapcsolását 12%-os PAGE-ével ellenőriztük Coomassie-kék festéssel. (1) A totál transzlátumot, a (2) Magne GST ágyhoz történt kapcsolás utáni felüliszót és a (3) Magne GST ágyhoz kapcsolódott GST címkével jelölt proBNP-t és (4) GST fehérjét (M) molekulatömeg-marker mellett vizsgáltuk.

4.4.2. ProBNP specifikus aptamerek szelektálása SELEX módszerrel

Aptamerek szelektálását 7 SELEX ciklusban valósítottuk meg, a ciklusok végéről származó szűkített DNS könyvtárak amplifikálásához emulziós PCR-t használtunk, melyeket PAGE segítségével ellenőriztünk. Eredmények alapján mind a 7 PCR-ben a várt 76 nukleotid hosszúságú termék keletkezett. Az alkalmazott alacsony ciklusszámnak, az emulziós PCR-nek és a reakcióban használt, nagy másolási hűséggel rendelkező Iproof polimeráz enzimnek köszönhetően, a komplex DNS templát ellenére melléktermék-képződést egyik PCR során sem tapasztaltunk. A templátmentes, negatív kontroll PCR-ek termékében DNS szennyeződésre utaló jelet nem tapasztaltunk. Az utolsó SELEX cikusból származó PCR terméket TOPO vektorba ligáltuk, és kompetens sejtekbe transzformáltuk. A kolónia PCR-ek kapilláris elektroforétikus vizsgálata alapján a 130 vizsgált baktérium telep közül 120 tartalmazta az inszertet. Nagyobb mennyiségű DNS szennyeződést csupán a kolónia PCR-ek 10%-ában tapasztaltunk (20. ábra).



20. ábra. Kolónia PCR-ek ellenőrzése kapilláris elektroforézissel. Az inszertet tartalmazó kolónia PCR termékek 371 nukleotid hosszúságúak (csillaggal jelölve), míg az inszertet nem tartalmazó fragmentumok 295 nukleotid méretűek (négyzettel jelölve), a méret meghatározást bázispárban megadott (M) molekulatömeg-marker segítette.

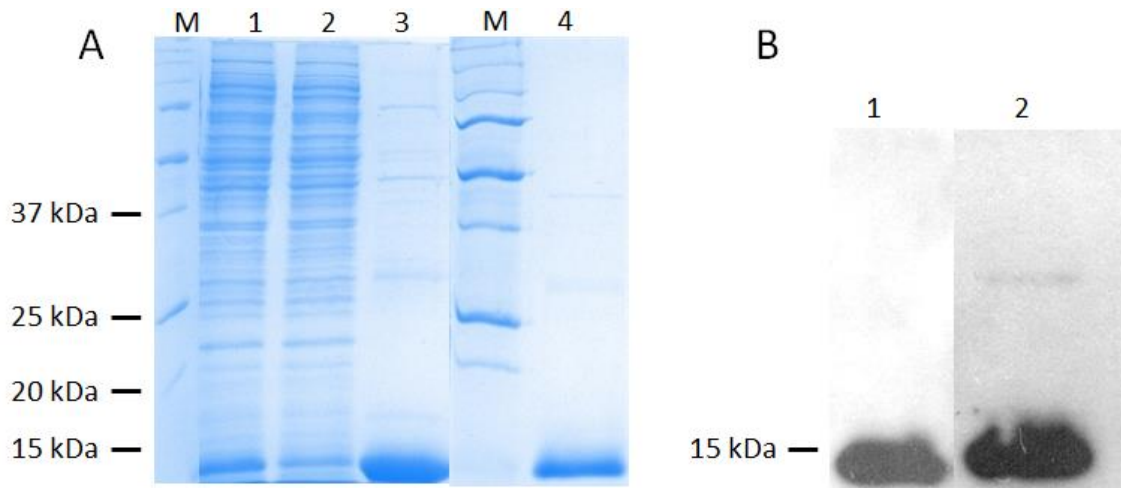
A megfelelő méretű és jelentős mennyiségű mellékterméket nem tartalmazó kolónia PCR-ek közül 96-ot megszekvenáltattunk. A szekvenálási adatokat BioEdit programmal elemeztük, az eredmények alapján 80 minta szekvencia meghatározása volt sikeres, mely közül 4 duplikátumként fordult elő.

4.4.3. AlphaScreen mérésben használt proBNP előállítás *E. coli* expressziós rendszerben

A PBA-PCR-rel előállított 48 aptamer jelölt ellenőrzéséhez szükséges nagyobb mennyiségű proBNP-t *E. coli* expressziós rendszerben állítottuk elő. A vektor konstrukció létrehozásához a kémiai szintézissel előállított inszertet és a pET28a vektort NcoI és XhoI enzimmel hasítottuk. Az agaróz gélből kivágott 334 bázispár hosszúságú inszertet és az 5231 bázispár hosszúságú emésztett pET28a vektort ligáltuk, és Alpha-Select kompetens sejtek transzformálására használtuk. A felnőtt baktérium telepeket kolónia PCR-rel ellenőriztük. Az inszertet tartalmazó templátok 513 bázispár hosszúságú PCR terméket eredményeztek, míg az „üres” vektorokról készült PCR termék 180 bázispár méretű volt. A kiválasztott kolóniákkal plazmidot termeltettünk, melynek helyes szekvencia sorrendjét a szekvenálási eredmények igazolták.

Az ellenőrzött vektor konstrukciókkal *E. coli* sejteket transzformáltunk. A felnőtt baktérium telepekből starter kultúrát készítettünk, majd autoindukciós tápoldathoz adtuk a baktérium sejteket. A fehérje termeltetése 17 órán keresztül zajlott.

Az autoindukció sikerességét és a tisztított proBNP minőségét SDS-PAGE módszert követő Coomassie-kék festéssel ellenőriztük, melynek alapján a 13 kDa méretű proBNP-t az AlphaScreen méréseinkhez megfelelő mennyiségben sikerült előállítani. A Western blot során a fehérje jelenlétét proBNP specifikus 29D12cc és 15C4cc antitestekkel igazoltuk (21. ábra).

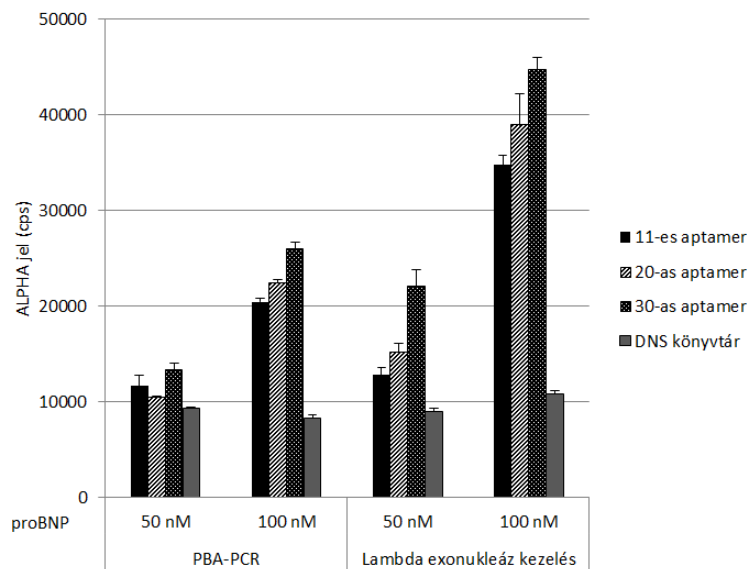


21. ábra. Az *E. coli* expressziós rendszerben előállított proBNP ellenőrzése. HexaHIS címkével jelölt proBNP 15% PAGE analízise (A) Coomassie-kék festéssel. A feltárt bakteriális totál fehérjekivonat centrifugálás utáni felülúszóját (1) affinitás gyöngyhöz kapcsolás előtt és (2) gyöngyhöz kapcsolás után ellenőriztük. (3) Affinitás ágyhoz kapcsolt proBNP és (4) ágyról eluált proBNP méret meghatározását (M) molekulatömeg-marker segítette. (B) Eluált fehérjét Western blottal módszerrel is ellenőriztük, proBNP specifikus (1) 15C4cc és (2) 29D12cc antitestek használatával.

4.4.4. PBA-PCR-rel előállított aptamer jelöltek tesztelése AlphaScreen módszerrel

A PBA-PCR-rel előállított aptamerek alkalmazhatóságát lambda exonukleáz kezeléssel készített aptamerekkel hasonlítottuk össze az AlphaScreen mérésben. A módszerekhez használt PCR-ekben a proBNP specifikus 11-es, 20-as és 30-as aptamer templátot és az ezek szelektálásához használt 4. könyvtár templátot használtuk. Annak érdekében, hogy ismeretlen tényezők (pl.: bakteriális DNS szennyeződés) ne befolyásolják az előállított aptamerek minőségét, a PCR-ekben szintetizált oligonukleotid templátokat alkalmaztunk. A lambda exonukleáz emésztéssel előállított aptamerek magasabb lumineszcens jelet produkáltak a célmolekula jelenlétében,

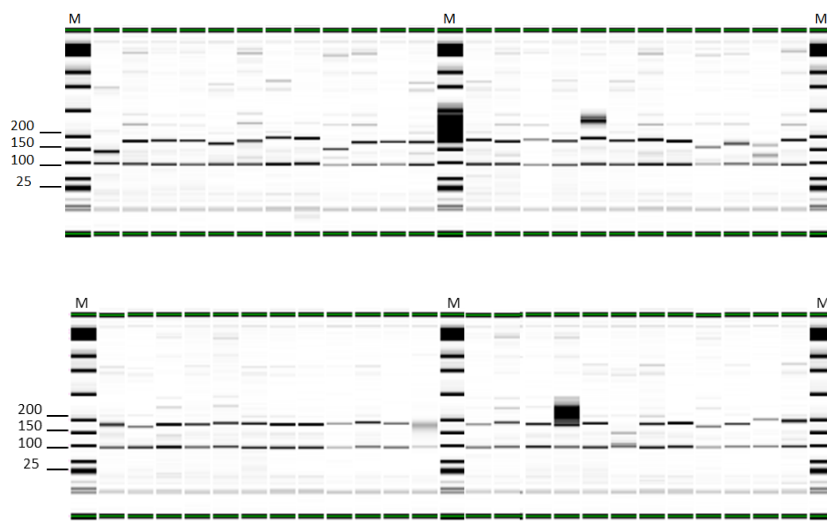
azonban magasabb fehérjekoncentrációnál a PBA-PCR-rel készített aptamerekkel is 2x-3x magasabb jelet detektáltunk a negatív kontrollként használt oligonukleotidhoz képest. A különböző módszerekkel előállított aptamerek egymáshoz viszonyítva hasonlóképpen működtek, mindkét esetben a 30-as aptamer bizonyult a legjobbnak és a 11-es jelölt kötődött legkevésbé a célmolekulához (22. ábra).



22. ábra. PBA-PCR-rel és lambda exonukleáz kezeléssel előállított aptamerek célmolekula kötő képességének vizsgálata. A kétféle módszer összehasonlításához a 11-es, 20-as, 30-as aptamereket és a negatív kontroll szekvenciát (DNS könyvtár) szintetizált DNS templárról amplifikáltuk. Az eltérő módon előállított egyszálú oligonukleotidok proBNP kötő képességét 50 nM és 100 nM fehérje koncentráció mellett vizsgáltuk AlphaLisa Streptavidin Acceptor gyöngy és AlphaScreen Gluthatione Donor gyöngy felhasználásával.

A PBA-PCR előnye az alacsony költségek mellett az egyszerűen megvalósítható aptamer előállítás, ezért megvizsgáltuk a módszer nagy áteresztőképességű aptamer ellenőrzésben való alkalmazhatóságát. Ehhez az aptamer jelöltek szekvenálásához készített kolónia PCR termékekből PBA-PCR-rel előállítottunk 48 biotinilált aptamer jelöltet. A PCR termékeket kapilláris elektroforézissel ellenőriztük, az eredmények alapján a kolónia PCR-ekről készült PBA-PCR sikeres volt. A PCR 76 bázispár hosszúságú dsDNS terméke fölött elhelyezkedő azonos hosszúságú ssDNS termékek a

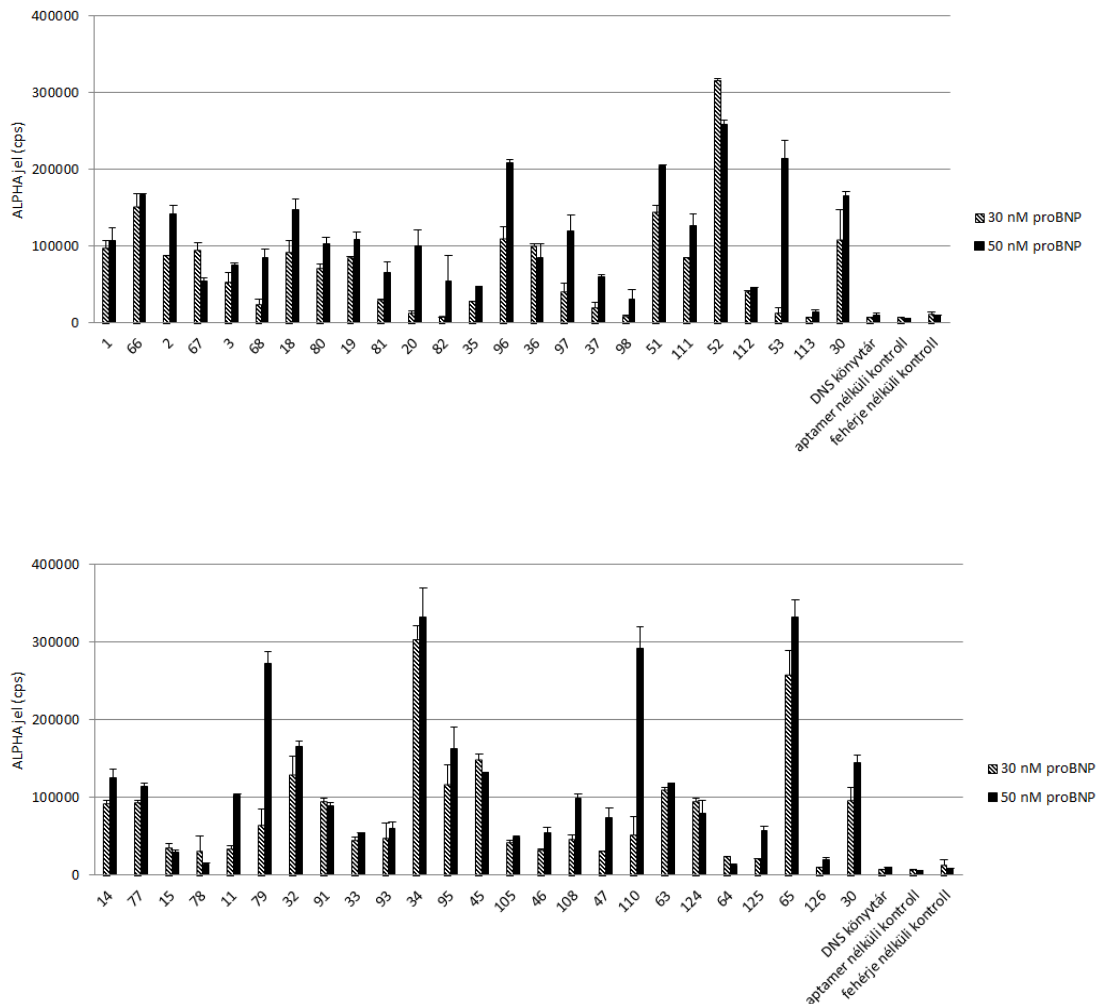
molekulatömeg-marker 100 és 200 bázispár hosszúságú fragmentje között voltak detektálhatóak. Az egyes aptamer jelöltek gélben történő eltérő haladási sebessége az aptamer jelöltek változatos másodlagos szerkezetével magyarázható. Nagyobb mennyiségű melléktermék csak kevés esetben keletkezett. A készülék érzékenységének köszönhetően sok eltérő méretű DNS fragmentum is látható halványan a PCR termékekben, ami részben a bakteriális genom aspecifikus amplifikálásából származhat (23. ábra).



23. ábra. 48 PBA-PCR-rel készített aptamer jelölt ellenőrzése kapilláris elektroforézissel. Az amplifikációs reakciókban a szelekció végéről származó kolónia PCR-ek termékei szolgáltattak templátként. A méretmeghatározást (M) bázispárban megadott molekulatömeg-marker segítette

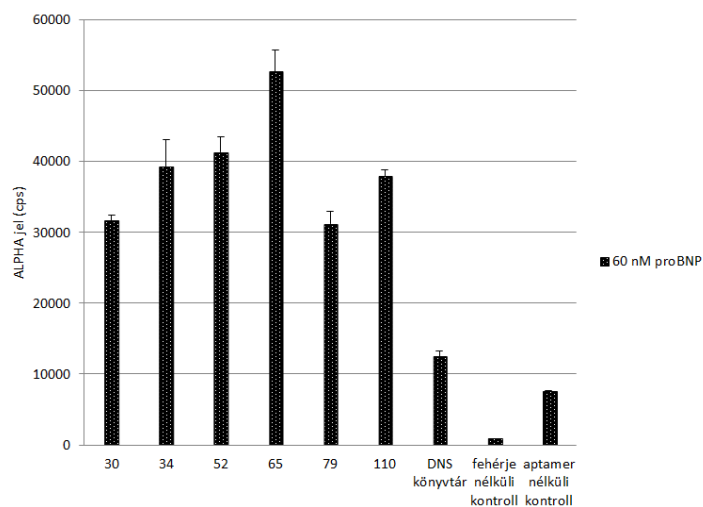
A 48 PBA-PCR-rel előállított aptamer ellenőrzését AlphaScreen mérésrel végeztük, melyhez a nagyobb mennyiségű hexaHis címkével ellátott proBNP-t *E. coli* expressziós rendszerben a korábbiakban leírtak szerint állítottuk elő. A biotinnal jelölt aptamereket sztreptavidinnel borított AlphaScreen donor gyöngyökhöz, a proBNP-t pedig nikkel-kelát akceptor gyöngyökhöz kapcsoltuk. Pozitív kontrollként a 30-as aptamer, negatív kontrollként pedig a kiindulási könyvtár proBNP kötő affinitását ellenőriztük. Az eredmények alapján a szelekció során több nagy affinitással rendelkező aptamer fordult az utolsó SELEX lépésből származó szűkített DNS könyvtárban. Azonban az is látható, hogy szükség van a nagymennyiségű aptamer egyéni

ellenőrzésére is, hiszen sok oligonukleotid nem, vagy csak kis mértékben képes kötni a célmolekuláját. Az egyes aptamerek között gyakran 20x-os - 40x-es lumineszcens jelkülönbséget detektáltunk (24. ábra). Az eredmények összhangban vannak a fejezet elején bemutatott mérésekkel (22. ábra): a 30-as aptamer itt is jobbnak bizonyult a 11-es és 20-as jelöltnél, illetve mindkét mérésnél a három vizsgált aptamer a negatív kontrollnál nagyobb jelet produkált. A két mérés lumineszcens jel értékei között tapasztalható, körülbelül egy nagyságrendnyi különbség az eltérő AlphaScreen és AlphaLisa gyöngyökkel magyarázható, melyeket az eltérő címkével rendelkező fehérjék miatt alkalmaztunk.



24. ábra. Aptamer jelöltek ellenőrzése AlphaScreen méréssel. Szekvenáltatáshoz készített kolónia PCR templátok felhasználásával 48 biotinilált oligonukleotidot állítottunk elő PBA-PCR segítségével, proBNP kötő képességüket 30 nM és 50 nM fehérje koncentráció mellett vizsgáltuk AlphaScreen Histidin detection kit használatával.

A PBA-PCR-rel előállított aptamerek célmolekula-kötő képességét komplex fehérje mintában is megvizsgáltuk. Az AlphaLisa mérési eredmények alapján a szelekciós pufferben legjobbnak bizonyult aptamerek hígított plazmában is képesek a proBNP szelektív kötésére, habár az aptamer : negatív kontroll jel arány alacsonyabb lett, a 65. jelölnél így is több mint négyszer, a többi aptamer jelölnél pedig körülbelül háromszor magasabb lumineszcens jelet detektáltunk a random DNS könyvtárhoz képest (25. ábra).



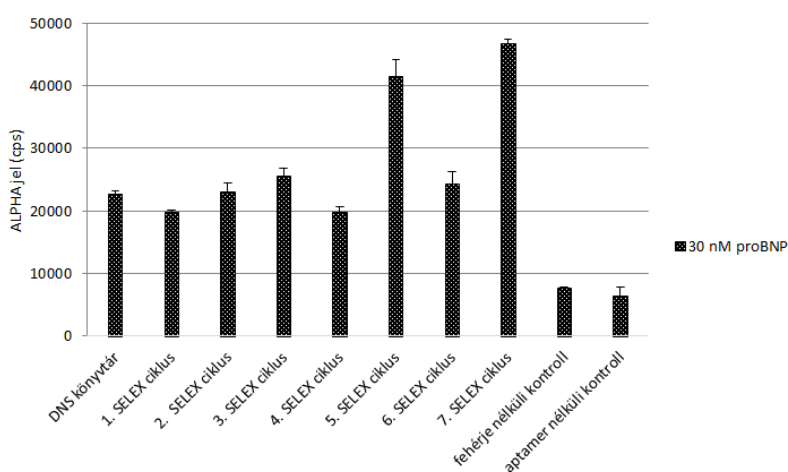
25. ábra. Aptamer jelöltek ellenőrzése hígított plazmát tartalmazó mintában AlphaLisa méréssel.

Szekvenáltatáshoz készített kolónia PCR templátok felhasználásával 6 biotinizált oligonukleotidot állítottunk elő PBA-PCR segítségével, proBNP kötő képességüket 60 nM fehérjével kiegészített, hígított plazma mintában vizsgáltuk Anti-6xHis AlphaLisa Acceptor gyöngy és AlphaScreen Streptavidin Donor gyöngy felhasználásával.

4.4.5. SELEX előrehaladtának ellenőrzése AlphaScreen módszerrel

A PBA-PCR alkalmazhatóságát az aptamer szelekció előrehaladtának ellenőrzésében is megvizsgáltuk. A SELEX ciklusok között a szűkített random DNS könyvtárakat amplifikáltuk, az egyes PCR termékekből a regenerációs lépések előtt 5-5 µl-t félretettünk, melyeket a SELEX előrehaladtának ellenőrzéséhez használtunk fel. A szűkített DNS könyvtár minták célmolekula-kötő képességének vizsgálatához szükséges amplifikálást és egyszálúsítást PBA-PCR-rel valósítottuk meg, a kölcsönhatás vizsgálatokat AlphaScreen méréssel végeztük el. Az 1-7 SELEX cikusból származó egyszálú oligonukleotid könyvtárak eltérő hatékonysággal kötik a proBNP-t, a detektált

jelek növekedése a nagy affinitással rendelkező aptamerek dúsulását jelzi. A 4. és 6. ciklusban a DNS könyvtárak affinitása csökken, ami a 4. ciklus végén alkalmazott intenzív dextrán-szulfátos mosással és a 6. ciklust megelőzően végrehajtott kontraszelekción lépéssel magyarázható. Az 5. és 7. cikusból származó oligonukleotidok kimagaslóan nagy jelet produkáltak, ami részben azzal magyarázható, hogy ezekben a SELEX lépésekben a proBNP szolgált célmolekulaként, míg az 1-4. és 6. SELEX lépésben a szelekció a proBNP peptid epitópjára történt (26. ábra). Legmagasabb kötődést a 7. ciklus oligonukleotidjai mutatták, ami alapján a nagy affinitású aptamerek dúsulása még nem biztos, hogy befejeződött az utolsó SELEX lépéssel. Abban az esetben ugyanis az utolsó SELEX lépések oligonukleotid könyvtárainak közel azonos mértékben kellene kapcsolódniuk a célfehérjéhez. Újabb szelekción lépések elvégzésétől azonban az előbbieken ismertetett eredmények alapján eltekintettünk, a hét cikusból álló SELEX megfelelő kötőképességgel rendelkező aptamereket eredményezett.



26. ábra. SELEX előrehaladtának ellenőrzése AlphaScreen méréssel. A SELEX ciklusok végéről származó DNS könyvtárakat PBA-PCR-rel amplifikáltuk, a biotinilált PBA-PCR termékek proBNP kötő képességét 30 nM fehérje koncentráció mellett vizsgáltuk AlphaScreen Histidin detection kit használatával.

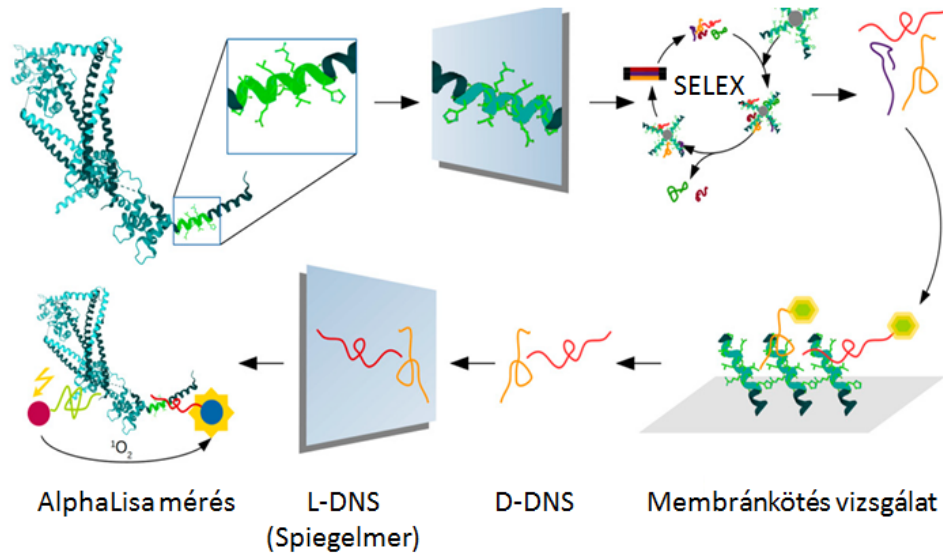
4.5. Spiegelmerek szelektálása és előszűrése

Kutatócsoportunkban korábban két spiegelmer szelekció történt a cTnI fehérjére, melyekkel egy spiegelmer alapú szendvics típusú mérési rendszert kívántunk létrehozni. Az első szelekcióból származó spiegelmerek a fehérje N-terminális peptid motívumára specifikusak, melyek közül legjobbnak a B10-es spiegelmer jelölt bizonyult. A spiegelmer jelöltek előszűrésére fejlesztett SPRi alapú módszerről, valamint az oligonukleotidok részben spiegelmer alapú szendvics típusú mérésben történő alkalmazhatóságáról két publikáció jelen meg [29,114], valamint ezen eredmények képezték Dr. Szeitner Zsuzsanna kolléganőm doktori dolgozatának alapját is.

A második spiegelmer szelekció célmolekulájaként a cTnI fehérje C-terminálisán elhelyezkedő peptidszakaszt választottuk. A spiegelmerek szelektálását és az oligonukleotidok előszűrését döntő részt András Judit kolléganőm végezte, a kísérletek szorosan kapcsolódnak a dolgozatom második részének méréseihez, az eredményeket egy közös publikációban jelentettük meg, ezért indokolt a második spiegelmer szelekció és előszűrés rövid összefoglalása ezen dolgozat keretein belül is.

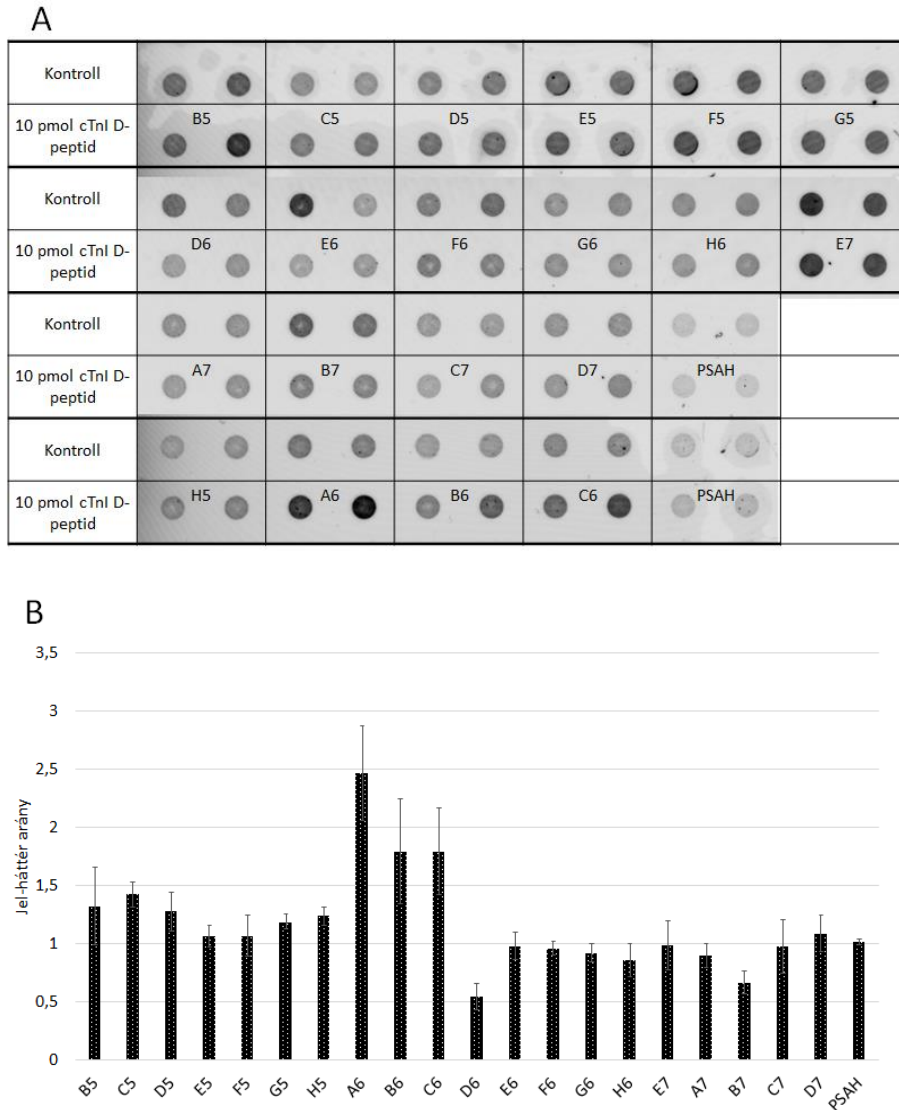
A szelekció célmolekulájaként a cTnI fehérje C-terminálisán elhelyezkedő, 161-es és 169-es aminosav közötti peptid szakaszt választottuk. A szív és vázizom eredetű troponin I izoformák a fehérjék ezen szakaszán eltérő aminosav-szekvenciával rendelkeznek, így az erre a részre specifikus receptor molekulák a cTnI fehérje szelektív detektálását teszik lehetővé. Továbbá a két szelekció célmolekuláiként választott epitópok megfelelő távolságra vannak egymástól a cTnI fehérjén, így a spiegelmer pár közötti szterikus gátlás lehetősége a szendvics típusú mérésben kevésbé áll fenn. A két spiegelmerszelekció hasonló módon, a dolgozat irodalmi áttekintés részében ismertettet módon történt. A nagyobb számú spiegelmer jelölt ellenőrzése a magas szintetizálási költségek miatt nem volt megoldható, ezért az ígéretes spiegelmer kiválasztását előszűréssel valósítottuk meg, melynek során a szelektált D-oligonukleotidok és a D-cTnI peptidek kölcsönhatását egy új megközelítéssel vizsgáltuk (27. ábra). A méréshez szükséges fluoreszcensen jelölt, egyszálú oligonukleotidokat egy PCR-t követő alkalikus denaturálási lépéssel állítottuk elő, a D-cTnI peptidet pedig paramágneses gyöngyöz kapcsoltuk. A Cy5-val jelölt oligonukleotidokat a peptiddel inkubáltuk, majd egy mosási lépést követően a gyöngyöket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A peptidhez kapcsolódott oligonukleotidok jelenlétét a fluoreszcens jel mérésével

vizsgáltuk. A szelektivitást az oligonukleotidok üres gyöngyhöz való kötődésével ellenőriztük.



27. ábra. Spiegelmer SELEX fehérje epitópra és a szelektált oligonukleotidok előszűrése membránkötés vizsgálattal [148]. Spiegelmer szelekciója a troponin I fehérje C-terminális epitópjának tükörképi párjára történt. A szelektált oligonukleotidok és a D-peptid célmolekula kölcsönhatását membránkötés vizsgálattal ellenőriztük. A legígéretesebb oligonukleotid jelölteket L-nukleotidokból felépülő Spiegelmer formában megrendeltük, célmolekula-kötőképességüket AlphaLisa mérésben ellenőriztük.

A szelektált oligonukleotidok többségénél magasabb fluoreszcens jelet detektáltunk a nem specifikus, negatív kontrollként használt aptamerhez képest. Azonban több oligonukleotid esetén hasonló jelintenzitást tapasztaltunk a cTnI peptiddel borított és a negatív kontrollként használt „üres” mágneses ág esetén. A jelek kvantitatív meghatározását denzitometriás méréssel végeztük, mely alapján az A6-os jelölt bizonyult a legjobbnak, itt mértük a legmagasabb jel-háttér arányt. A B6 és C6 oligonukleotidok hasonlóan jól működtek, szelektivitásukkal szintén kiemelkedtek a többi jelölt közül (28. ábra). További karakterizáláshoz, valamint a szendvics típusú mérés létrehozásához az A6-os és C6-os jelölteket szintetizáltattuk meg L-nukleotidokból felépülő Spiegelmer formában.



28. ábra. Oligonukleotidok előszűrése membránkötés módszerrel. (A) A nem módosított és cTnI D-peptiddel borított mágneses gyöngyöket Cy5 jelölt oligonukleotidokkal inkubáltuk. A mosási lépést követően a gyöngyöket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, a jeleket fluoreszcens szkennelrel detektáltuk. Negatív kontrollként a PSAH aptamer szolgált. (B) Relatív fluoreszcencia intenzitások mértékét a fluoreszcens jelek denzitometriás kiértékelésével kaptuk meg.

4.5.1. Spiegelmerек ellenőrzése biolayer interferometria módszerrel

A szintetizált, L-nukleotidokból felépülő C6-os és A6-os spiegelmerек célmolekulakötő-képességét biolayer interferometria technológián alapuló BLItz készülékkel vizsgáltuk. A kinetikai mérések során a spiegelmerек és a többféle koncentrációban alkalmazott, humán szívizomból származó troponin (I-T-C) komplex kölcsönhatását vizsgáltuk. Eredményeink alapján a második szelekcióból származó C6 és A6 spiegelmerек a cTnI fehérje N-terminális részére szelektív B10-es spiegelmerhez

hasonló disszociációs konstanssal rendelkeznek. A C6 spiegelmer $2,4\pm 0,5$ nM, az A6-os spiegelmer $5,0\pm 1,3$ nM, a B10 oligonukleotid pedig $5,7\pm 0,8$ nM disszociációs állandóval rendelkezik. C6 és A6 spiegelmek további, SPRi módszerrel történő karakterizálását a Budapesti Műszaki Egyetemen Gyurcsányi E. Róbert kutatócsoportjában végezték el. A K_d értékek ebben az esetben egy nagyságrenddel alacsonyabbnak bizonyultak (C6 $K_d = 305$ pM; A6 $K_d = 540$ pM), amely különbségek feltehetően az irodalmi bevezetésben is részletezett, mérési rendszereknél tapasztalható különbségekből adódtak.

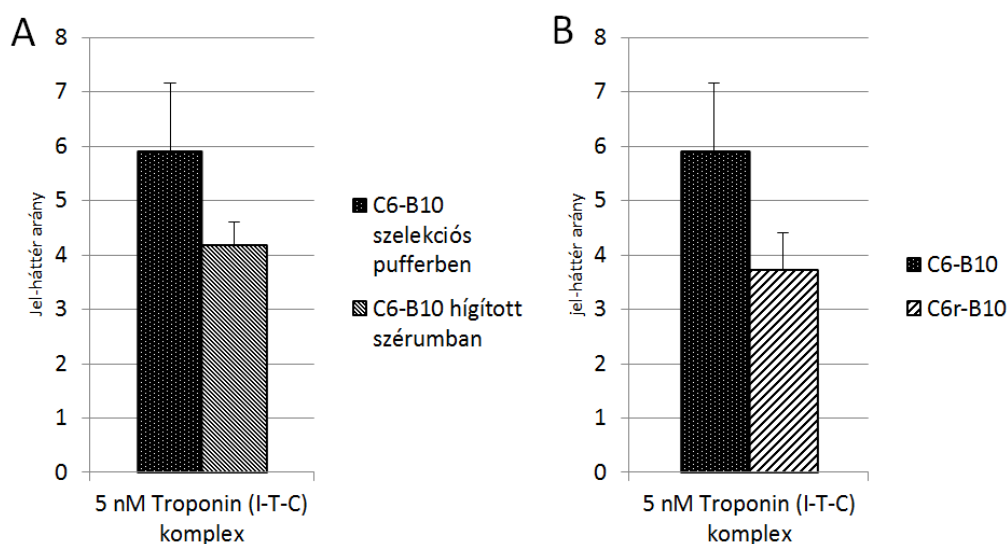
A célmolekula kötésében általában a spiegelmek primer régiói nem vesznek részt, ezért elterjedt post-SELEX módosításnak számít ezen DNS szakaszok utólagos eltávolítása. Ennek figyelembevételével a legjobbnak bizonyult C6 jelölt primer régió nélküli rövid változatának troponin (I-T-C) komplex-kötő képességét is megvizsgáltuk BLItz készülékkel. A post-SELEX módosítás hatására a C6- spiegelmer rövid változata megőrizte cTnI-kötő képességét, azonban affinitása csökkent ($K_d = 14,2\pm 9,9$ nM) az eredeti hosszúságú C6 spiegelmerhez képest.

4.5.2. Spiegelmek alkalmazása szendvics típusú mérési rendszerben

A cTnI fehérje C-terminális részére specifikus C6 és a cTnI fehérje N-terminális részére specifikus B10 spiegelmer pár szendvics típusú mérésben való alkalmazhatóságát AlphaLisa módszerrel ellenőriztük, melynek során a biotinnal jelölt spiegelmeket sztreptavidinnel borított donor és akceptor gyöngyökhöz rögzítettük. Célmolekulaként humán szívizomból származó troponin (I-T-C) komplexet használtunk 5 nM-os végkoncentrációban, a negatív kontroll mintához nem adtunk troponin (I-T-C) komplex-et. A szendvics párok alkalmazhatóságát szelekciós pufferben és hígított, cTnI-mentes szérumot tartalmazó mintában is teszteltük.

Eredményeink alapján a C6 és B10 spiegelmer pár alkalmas a troponin (I-T-C) komplex kimutatására AlphaLisa mérésben. A mérés szérumot tartalmazó mintában sem gátolt, habár a jel-háttér arány közel 30%-kal csökkent a szelekciós pufferben történt méréshez képest, azonban ebben a komplex fehérje mintában is 4x magasabb jelet detektáltunk a fehérjét nem tartalmazó mintánál mért háttér értékhez képest (29. ábra).

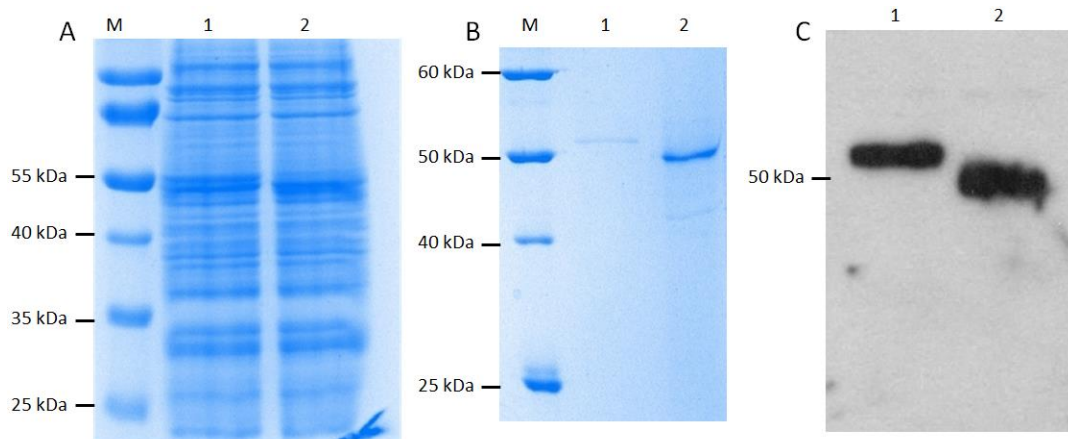
Az előző fejezetben ismertetett kinetikai vizsgálatok alapján a C6 spiegelmer rövid változata az (I-T-C) komplexhez kisebb affinitással kapcsolódott. A szendvics típusú mérésnél azonban a receptor molekula kisebb mérete előnyös lehet, mivel csökkentheti a sztérikus gátlás mértékét, ezért összehasonlítottuk C6 spiegelmer rövid és eredeti hosszúságú változatának működését AlphaLisa alapú szendvics típusú mérésben is. A vizsgálat a BLItz méréshez hasonló eredményt adott, a B10 spiegelmerrel párban a rövid C6 jelölt alkalmasnak bizonyult a troponin (I-T-C) komplex kimutatására, azonban a módosítatlan C6 spiegelmer a szendvics típusú mérésben némiképpen jobbnak bizonyult (29. ábra).



29. ábra. (A) B10 és C6 spiegelmer pár ellenőrzése 5 nM troponin (I-T-C) komplex-szel kiegészített szelektációs pufferben és cTnI mentes szérumban AlphaLisa méréssel. A háttérméréshez használt negatív kontroll minta célfehérjét nem tartalmazott. (B) C6 és rövid, primer régió nélküli C6 spiegelmer (C6r) vizsgálata szendvics típusú mérésben B10 spiegelmerrel párban. A mérést szelektációs pufferben végeztük az A panelben ismertetett módon.

Akut miokardiális infarktus diagnosztizálásában használt receptoroknak a troponin (I-T-C) komplex mellett a cTnI fehérje szabad formájához is nagy affinitással kell kötődnie, továbbá a szív és vázizom eredetű troponinI fehérjék elkülönítésére is alkalmasnak kell lennie. Ezen követelmények ellenőrzéséhez szükséges cTnI és sTnI fehérjét *in vitro* transzlációval állítottunk elő. A transzláció sikerességét és a tisztított fehérjék minőségét SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. A vártan megfelelően, a GST jelöléssel rendelkező cTnI fehérjét 52 kDa körüli magasságban detektáltuk

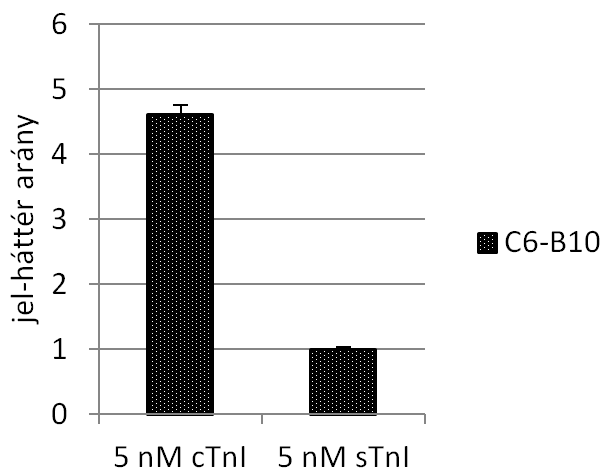
Coomassie-kék festéssel, míg a némileg kisebb méretű, szintén GST affinitás címkével rendelkező sTnI fehérje 48 kDa-os magasságban volt látható az SDS-poliakrilamid gélen. Ezeket az eredményeket a GST ellenanyag alkalmazásával kivitelezett Western blot is megerősítette. A Magne GST gyönggyel tisztított fehérjék a gélképek alapján kevés szennyeződést tartalmaztak (30. ábra).



30. ábra. *In vitro* transzlációs rendszerben előállított GST címkével rendelkező cTnI (1) és sTnI (2) fehérje ellenőrzése. SDS-PAGE módszerrel elválasztott (A) totál transzlációs elegy és (B) mágneses gyönggyel tisztított troponin I fehérje minták ellenőrzése Coomassie festéssel. (C) Totál transzlációs elegyek ellenőrzése Western blot módszerrel.

A cTnI fehérje szendvics típusú mérésben történő szelektív kimutathatóságát AlphaLisa méréssel ellenőriztük C6 és B10 spiegelmer párral. A biotinnal jelölt spiegelmereket sztreptavidinnel borított akceptor és donor gyöngyhöz kapcsoltuk, a mérést cTnI mentes szérummal kiegészített mintában végeztük, mely 5 nM cTnI vagy 5 nM sTnI fehérjét tartalmazott. A negatív kontroll mintához nem adtunk troponin I fehérjét.

Eredményeink alapján a B10 és C6 spiegelmer pár alkalmas a szívizom eredetű troponin I fehérje kimutatására. A cTnI fehérjét tartalmazó mintánál körülbelül 5x magasabb jelet detektáltunk a célfehérjét nem tartalmazó háttérméréshez képest. A mérési rendszerben a cTnI fehérjével nagyfokú homológiát mutató vázizom eredetű troponin I fehérje aspecifikus jelet nem eredményez, csupán a háttérrel megegyező jelnövekedést tapasztaltunk a vizsgált spiegelmer pár esetén (31. ábra).



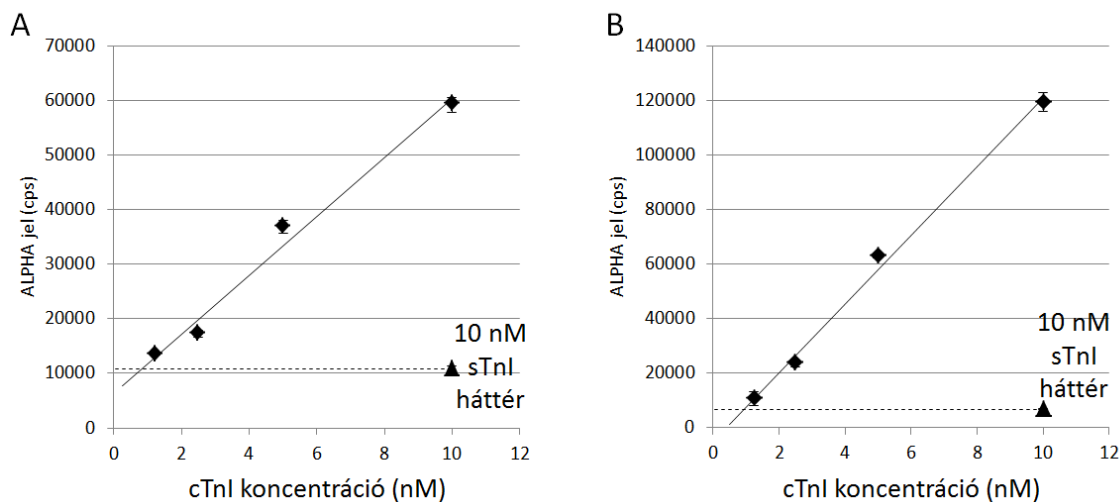
31. ábra. cTnI fehérje szelektív kimutatása spiegelmer alapú szendvics mérésben. 5 nM rekombináns cTnI és sTnI fehérjével egészítettük ki a hígított cTnI-mentes szérum mintákat, a mérést AlphaLisa rendszerben végeztük N-terminálisra szelektív B10 és C-terminális epitópra szelektív és C6 spiegelmerekekkel. A háttérmérésnél vizsgált minta cTnI és sTnI fehérjét nem tartalmazott.

4.5.3. cTnI koncentráció meghatározása spiegelmer alapú szendvics mérésben

Az alacsonyabb célmolekula koncentráció kimutatás érdekében a korábbiakban ismertetett cTnI fehérje detektálásra alkalmas, spiegelmer alapú szendvics típusú mérést AlphaLisa rendszerben optimalizáltuk. Az optimalizálásra irányuló kísérleteink mérési eredményei nem kerülnek bemutatásra, csak a megfigyeléseinket ismertetem. Az AlphaLisa mérésben az akceptor és donor gyöngyök spiegelmer borítottsága befolyásolhatja a célmolekula kimutathatóságát, eredményeink alapján a spiegelmerekek koncentrációjának 10 és 15 nM közötti változtatása nem befolyásolta a detektált jelek intenzitását, így a további méréseink során 10 nM koncentrációban alkalmaztuk őket. Az sTnI fehérje aspecifikus kötődését különböző koncentrációban adott dIdC-vel és lazac spermával próbáltuk minimalizálni. Legmagasabb specifikus : aspecifikus jel arányt 0,1 µg/ml dIdC hozzáadása eredményezett. A jel-háttér arány további növelését 0,05% Tween-20 és 0,05% Triton X-100 hozzáadásával kívántuk elérni, melyek hatására a lumineszcens jel jelentősen megnőtt, azonban ezzel együtt a háttérjelek emelkedését is tapasztaltuk, így a detergens hozzáadásával az aspecifikus jelet és a célfehérje kimutatási határát nem sikerült csökkentenünk. Az Alpha gyöngyök mennyiségének növelése emeli a detektált lumineszcens jelek értékét, így csökkentheti a fehérje kimutathatóságának alsó határát. A vizsgált kétszeres mennyiségben alkalmazott donor gyöngynél azonban a pozitív jelnek és a háttérnek azonos mértékű növekedését

tapasztaltuk, így nem járult hozzá a kimutathatósági határ csökkentéséhez. Szakirodalmi adatok és korábbi eredményeink alapján az akceptor és donor gyöngy, valamint a receptor pár hozzáadásának sorrendje jelentősen befolyásolhatja a célmolekula kimutathatóságát [115]. Eredményeink alapján a legmagasabb jel-háttér arányt akkor kaptuk, mikor az összemérést a B10 spiegelmerék célmolekulával történő inkubálásával kezdtük, amit az akceptor gyöngyök hozzámérése követett, a donor gyöngyöz kapcsolt C6-os spiegelmerék utolsó lépésként kerültek a reakció elegyhez.

A cTnI fehérje spiegelmer alapú szendvics rendszerben történő kimutatási határát troponin I fehérjével kiegészített oldatokban vizsgáltuk, melyhez a méréseket a fenti megfigyelések alapján optimalizált AlphaLisa rendszerben végeztük. A detektált lumineszcens jelek értéke jó korrelációt mutatott a reakció elegyhez adott cTnI fehérje koncentrációjával. A vizsgált 1 nM és 10 nM közötti cTnI fehérje koncentráció tartományban a jelintenzitás megfelelő linearitást mutatott mind az optimalizált szelektív pufferben, mind a hígított szérumot tartalmazó pufferben. Regressziós egyenes illesztést követően 0,9945-ös és 0,9843-ös R-négyzet értéket kaptunk. A mérésekhez használt, 10 nM sTnI fehérjével kiegészített negatív kontroll mintánál mindkét esetben kisebb jelet mértünk az 1,25 nM cTnI fehérjét tartalmazó mintához viszonyítva (32. ábra).



32. ábra. AlphaLisa jelek változása szendvics típusú mérésben a cTnI fehérje koncentrációjának függvényében (A) optimalizált szelektív pufferben és (B) hígított szérumot tartalmazó mintában.

Az Alpha elegyek 1,25 nM, 2,5 nM, 5nM vagy 10 nM cTnI és 10nM sTnI fehérjét tartalmaztak.

5. Megbeszélés

5.1. Primer blokkolt aszimmetrikus PCR

Az egyszálú oligonukleotidok kémiai szintézisének költsége az elmúlt évtizedekben jelentősen csökkent, azonban laboratóriumi felhasználásra továbbra is sok esetben az enzimátikus ssDNS előállítás a racionális választás. A leggyakrabban használt egyszálúsítási technikák a duplaszálú DNS denaturációján és a komplementer szálak elválasztásán alapulnak. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel elválaszthatók egymástól a PCR-ben módosított reverse primerekkel előállított, eltérő hosszúságú komplementer ssDNS szálak, azonban az eljárás időigényes és jelentős nukleinsav-vesztéssel jár, ezért használata nem terjedt el széleskörűen. A leggyakrabban használt egyszálúsítási módszernél a biotinilált primerrel amplifikált PCR terméket sztreptavidines mágneses ágyhoz kapcsolják, majd a DNS szálakat alkalikus denaturálással választják el egymástól. Az eljárás során a felülúszóban az ssDNS mellett a gyöngyről leváló sztreptavidin (és a hozzákapcsolódó dsDNS) is megjelenik kis mennyiségben, továbbá biotin jelöléssel rendelkező egyszálú oligonukleotidok előállítására ez a módszer nem alkalmas, mely tényezők jelentősen korlátozzák alkalmazhatóságát. Ezen hiányosságok orvoslására fejlesztették ki a lambda exonukleáz emésztéssel történő egyszálúsítási módszert, azonban az eljárásnál - az enzim nagyfokú szelektivitásának ellenére - az ssDNS részleges enzimátikus lebontásával is számolni kell.

Az egyszálúsítási eljárások közül teoretikusan az aszimmetrikus PCR a legegyszerűbben és legköltséghatékonyabban kivitelezhető módszer. Az eltérő koncentrációban alkalmazott primereknek köszönhetően az aszimmetrikus PCR-ben a limitáló primerek elhasználódását követően, a feleslegben adott primerekről ssDNS termék keletkezik. Az egyenlőtlen primer arányok következtében a PCR hatásfoka viszont jelentősen csökken, továbbá a melléktermék-képződés már a reakció korai szakaszában megfigyelhető.

Az aszimmetrikus PCR alacsonyabb hatásfoka részben a „*nearest neighbour*” modellel magyarázható, mely szerint a primer olvadáspontjának (T_m) számításánál annak koncentrációját is figyelembe kell venni. Ezek alapján a csökkenő primer

koncentrációval párhuzamosan a primer olvadáspontja a nukleinsav-szekvencia alapján számítottnál alacsonyabb lesz, így a limitáló primerek az aszimmetrikus PCR során kisebb hatékonysággal képesek a templáthoz kapcsolódni, ami végső soron kevesebb várt és több fals terméket eredményez. Sanchez és munkatársai a hagyományos aszimmetrikus PCR esetén azt tapasztalták, hogy a szekvenciájuk alapján azonos olvadásponttal rendelkező primerek esetén 1:40 primer aránynál 5 °C olvadáspont különbség adódik a *nearest neighbour* modellel számolva [92]. A primerek olvadáspontjának aszimmetrikus PCR-hez történő optimalizálásával a kezdeti olvadáspont különbség kiküszöbölhető, ebben az esetben azonban minden PCR esetén külön primereket kell használni a hagyományos és aszimmetrikus PCR-nél. Mindemellett az aszimmetrikus PCR optimalizálása szintén nehézségbe ütközhet, ugyanis a limitáló primer *nearest neighbour* modell figyelembevételével számított olvadáspontja csak egy adott koncentrációra igaz, így a primer arányok változtatásával a valós olvadáspont érték is változik.

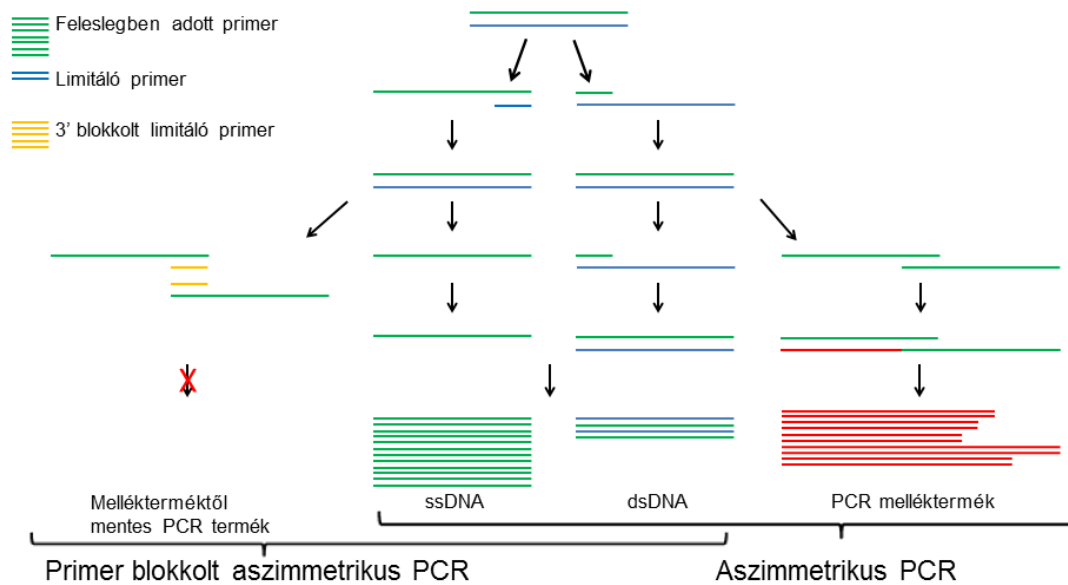
Az aszimmetrikus PCR hatékonyságát a reakció előrehaladtával megjelenő ssDNS termék jelenléte tovább hátráltatja. A feleslegben lévő primerek és a róluk keletkezett ssDNS-ek között kompetíció lép fel a reverz komplementer szálhoz való kapcsolódásban. A mintaszállal azonos hosszúságú ssDNS termékek a feleslegben adott primereknél jóval magasabb olvadásponttal rendelkeznek, amit a primerek kezdeti, koncentráció különbségből adódó előnye valamelyest kompenzál. A primerek mennyisége azonban PCR ciklusonként csökken, míg a keletkezett ssDNS termék mennyisége folyamatosan nő, ami végső soron azt eredményezi, hogy bár a primerek jelen vannak az oldatban, a templáthoz egyre kisebb mértékben kapcsolódnak, így az ssDNS szintézisének hatékonysága az aszimmetrikus PCR során folyamatosan csökken.

Módszerfejlesztésünk célja az aszimmetrikus PCR ezen problémáinak kiküszöbölése volt. Egyrészt az általunk alkalmazott 3' blokkolt primernek köszönhetően a kiindulási forward és reverse primer mennyiségek megegyeznek, így a koncentráció különbségből fakadó olvadáspont változás negatív hatásával nem kell számolnunk. Másrészt a 3' blokkolt primerek a templát és az ssDNS PCR termék hibridizációjából adódó gátló hatást is kedvezően befolyásolhatják, mivel a módosított primerek kötődésének köszönhetően, az ssDNS termék kisebb szakaszon képes a

komplementer szálhoz kapcsolódni. Hipotézisünket a mérési eredményeink alátámasztották: az aszimmetrikus PCR-rel összehasonlítva a PBA-PCR nagyobb mennyiségű elvárt méretű és szekvenciájú ssDNS terméket eredményezett. Módszerfejlesztésünk fontosságát jelzi, hogy a PBA-PCR publikálását követően, 2020-ban megjelent Nehdi és munkatársainak vizsgálata, melyben a blokkoló limitáló primerek hatását vizsgálják aszimmetrikus PCR-ben [149]. Méréseikben a 3' blokkolt primerek, templát és ssDNS termék hibridizációt gátló hatását azzal támasztották alá, hogy hosszabb blokkoló primerek alkalmazásával nagyobb mennyiségű ssDNS termék keletkezett az aszimmetrikus PCR során.

Az amplifikáció során megjelenő melléktermék-képződés tovább korlátozza a hagyományos aszimmetrikus PCR felhasználhatóságát. A jelenség azzal magyarázható, hogy a keletkezett egyszálú oligonukleotid termékek egymással is képesek hibridizálni. Amennyiben az egyik ssDNS termék 3' vége megfelelő bázispárosodással képes kapcsolódni egy másik ssDNS termékhez, akkor primerként funkcionálhat és magát meghosszabbítva, az eredeti templáttól eltérő méretű mellékterméket hozhat létre. Ennek igen magas a valószínűsége az aptamerek szelektálásához használt random DNS könyvtárak amplifikálásakor, mely a klasszikus PCR alkalmazásakor is sokszor problémát jelent [54–56]. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a 10^{15} különböző szekvenciát tartalmazó DNS könyvtárban több olyan oligonukleotid is előfordulhat, melyek tartalmazzák az ssDNS termék 3' végével reverz komplementer szekvenciát. A PBA-PCR-ben használt 3' végen blokkolt limitáló primer az ssDNS termék 3' végén elhelyezkedő szekvenciához kötődik, ezáltal gátolja az ssDNS termékek 3' végeken keresztül történő egymáshoz kapcsolódását, ami a melléktermék-képződés gátlásában nyilvánul meg (33. ábra). Kísérleteink alapján az aszimmetrikus PCR-hez képest a PBA-PCR-ben a melléktermék-képződés már egyedi szekvencia templát használatakor is jelentősen gátolt. Ezek alapján nem meglepő, hogy a blokkoló primerek jótékony hatása random DNS könyvtár esetén még szembetűnőbb, 45 ciklust követően a PBA-PCR melléktermékektől szinte teljesen mentes nagy mennyiségű ssDNS-t eredményezett, míg az aszimmetrikus PCR azonos ciklusszámmal készült PCR termékében a melléktermékek mellett a megfelelő hosszúságú DNS fragmentum alig volt észrevehető.

Primer blokkolt és hagyományos aszimmetrikus PCR összehasonlítása



33. ábra. A PBA-PCR és az aszimmetrikus PCR működésének összehasonlítása. A 3' blokkolt limitáló primerről a komplementer szál szintézise gátolt, továbbá az ssDNS-hez kapcsolódó 3' blokkoló primerek a melléktermék képződést visszaszorítják [150].

Az előbbieken részletezett nehézségek miatt az aszimmetrikus PCR optimalizálásával és módosításával több kutatócsoport foglalkozott, az eredmények alapján pedig azt javasolják, hogy az ideális PCR beállítások vizsgálatát eltérő templátok esetén újra és újra el kell végezni [56,89]. Kísérleteink alapján a PBA-PCR-nél erre nincs szükség, az optimális ciklusszám és primer arány meghatározását követően az ideális beállításokkal összemért reakció négy eltérő primer pár esetén is mellékterméktől mentes, nagymennyiségű ssDNS-t eredményezett egyedi és random DNS könyvtár templát amplifikálásakor egyaránt.

Az amplifikációs módszerek megfelelő működésének nem elégséges feltétele a mellékterméktől mentes, kiindulási templáttal megegyező méretű termék képzése, ugyanis a random DNS könyvtárak sokszorosításakor az egyes DNS szekvenciák eltérő mértékben szaporodhatnak fel a PCR torzító hatása miatt [57]. A PBA-PCR termékét új generációs szekvenáltatással megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az amplifikáció során

hatékonyabban replikálódó DNS szekvenciák nem jelentek meg nagyobb számban, nem torzult a könyvtár nukleinsav-szekvencia összetétele, ennek köszönhetően a szekvencia diverzitás a PBA-PCR-t követően is megmaradt.

A PBA-PCR terméke részben kétszálú, ugyanis az ssDNS-hez kapcsolódik a 3' blokkolt primer, ami általában nem befolyásolja a termék további felhasználhatóságát, azonban bizonyos esetekben szükség lehet tisztán egyszálú DNS termékre. A PBA-PCR termék limitáló primereken keresztül történő mátrixhoz kapcsolásával, majd egy egyszerű hődenaturációs lépéssel az ssDNS-t sikerült elválasztanunk a blokkoló primerektől és dsDNS-től. Habár a többi egyszálúsítási módszerrel összevetve ez egyszerű megközelítés, megjegyzendő, hogy ezen lépés beiktatása kompromisszumokkal jár, a tisztítási lépéssel az egyszálúsítás bonyolultabbá válik, valamint az előállított ssDNS biotin jelölhetősége is elveszik.

5.2. Primer blokkolt aszimmetrikus PCR felhasználása

A PBA-PCR használhatóságát az aptamerek szelekciójának ellenőrzése és az aptamer jelöltek karakterizálásának kapcsán vizsgáltuk AlphaScreen rendszerben, melyről Dausse és munkatársai a HAPIScreen leírásakor bizonyították [104], hogy jól alkalmazható ilyen célra. Az ellenőrzéshez szükséges aptamerek és a SELEX ciklusokból származó szűkített DNS könyvtárak a proBNP-re történő SELEX-ből származtak. Az aptamer szelekció 7 cikusból állt, az 1-4. és 6. SELEX lépésben a proBNP 9 aminosav hosszúságú peptid szakaszára, az 5. és 7. ciklusban pedig a laboratóriumunkban *in vitro* transzlációs rendszerben előállított fehérjére történt a szelekció. Az aptamerek szelektivitását negatív és kontraszelektív lépésekkel fokoztuk, míg a célmolekulakötő-affinitásukat a szelektív nyomás folyamatos növelésével javítottuk. Az utolsó szelektív lépés végéről származó PCR terméket TOPO vektorba klónoztuk, majd kompetens baktérium sejtekbe transzformáltuk, az inszertet tartalmazó kolónia-PCR termékeket Sanger-szekvenálással ellenőriztük. A szekvencia adatok alapján az aptamer jelöltek többsége különböző, duplán előforduló szekvenciából mindössze 4-et azonosítottunk.

A SELEX végén tapasztalható aptamer diverzitás általános jelenség, a megfigyelés hátterében az áll, hogy az oligonukleotidok egy része nem a

célmolekulakötő-képességük, hanem hatékonyabb PCR amplifikációjuk következtében dúsul fel a szelekció végére, így nem feltétlenül a legnagyobb kópiaszámban jelenlévő aptamerek rendelkeznek a legjobb célmolekulakötő-képességgel [29]. Habár motívum- és másodlagos szerkezet jósló programokkal az ígéretes aptamer jelöltek prediktálhatóak, megbízható eredményt csak az oligonukleotidok egyenkénti kölcsönhatás-vizsgálatával nyerhetünk. Az ehhez szükséges nagyszámú aptamer jelölt előállítása komoly kihívást jelent, a kémiai szintetizálás a magas költségek miatt általában nem alternatíva, ezért az ssDNS előállítása az esetek többségében PCR-t követő egyszálúsítási módszerrel történik. Szintetikus oligonukleotid templárról PBA-PCR-rel és lambda exonukleáz kezeléssel készített aptamerek működését AlphaScreen mérésben hasonlítottuk össze. A különböző módszerekkel előállított aptamerek egymáshoz viszonyítva hasonlóképpen működtek, ez alapján a PBA-PCR az aptamerek ellenőrzéséhez szükséges ssDNS előállítására jól alkalmazható. A módszer nagy áteresztőképességű aptamer szűrésre való felhasználhatóságát a kolónia-PCR termékekből PBA-PCR-rel előállított 48 aptamer jelölttel vizsgáltuk meg. Az eredmények igazolták, hogy az aptamerek a bakteriális DNS szennyeződést tartalmazó kolónia-PCR termékekből is előállíthatóak PBA-PCR segítségével. Az AlphaScreen eredmények alátámasztották, hogy az aptamerek egyenkénti karakterizálása rendkívül fontos, ugyanis az egyes jelöltek *E. coli* expressziós rendszerben előállított proBNP-kötő képessége nagyon eltérőnek bizonyult. A legjobbnak bizonyult aptamerek hígított szérumot tartalmazó mintában is megőrizték célmolekulakötő-képességüket, ami a SELEX-ben alkalmazott kontraszelektációs lépés sikerességét jelzi. Aptamerek előszűrésekor különösen fontos, hogy a jelöltek előállítása egyszerűen, gyorsan és olcsón kivitelezhető legyen, melyek közül mindegyik feltételnek megfelel a PBA-PCR módszer.

A szelekció előrehaladtának vizsgálatával meghatározható a szükséges SELEX ciklusok száma [99]. A SELEX ciklusok végéről származó szűkített könyvtárak célmolekulakötő-képességének vizsgálatával pontos képet kaphatunk a magas affinitással rendelkező aptamerek dúsulásáról. A kevert DNS templátot tartalmazó minta amplifikálása azonban nehézségbe ütközhet, ezért ellenőriztük a PBA-PCR alkalmazhatóságát SELEX előrehaladtának vizsgálatában is. A szelektációs ciklusok végéről származó szűkített dsDNS könyvtárakat optimalizált PBA-PCR-rel sikeresen

egyszálúsítottuk, a PCR termékek proBNP-kötő képességét AlphaScreen-nel ellenőriztük. Az eredmények alapján a célmolekula-specifikus aptamerek dúsulása bekövetkezett a szelekció előrehaladtával. A detektált lumineszcens jelek elemzéséből jól látható a 4. SELEX ciklusban alkalmazott intenzívebb mosási lépés és az 5. SELEX ciklus után alkalmazott kontraszelektációs lépés hatása is, ugyanis az aspecifikusan kötődő aptamerek eltávolításával a szűkített DNS könyvtárak kötőképessége csökkent az 4. és 6. ciklusban. A jelenség nem egyedi, a szelektációs nyomás változtatása gyakran eredményezi a kötőképesség visszaesését a szelekció során [100,105]. A szelekció végét általában az egymást követő ciklusból származó szűkített DNS könyvtárak stagnáló célmolekula-kötő képessége jelzi [151]. Ez az általunk vizsgált szelekciónál nem volt megfigyelhető, újabb szelektációs lépések elvégzésétől azonban eltekintettünk, mivel a hét ciklusból álló SELEX megfelelő proBNP-kötő képességgel rendelkező aptamereket eredményezett.

Módszerfejlesztésünkkel sikerült az aszimmetrikus PCR hiányosságait kiküszöbölnünk. A PBA-PCR megalkotásával létrehoztunk a lambda exonukleáz kezelésnél egyszerűbben, gyorsabban és olcsóbban megvalósítható, robosztus egyszálúsítási technikát, melyben az alkalikus denaturálással ellentétben az oligonukleotidok biotin jelöléssel történő előállítása is megvalósítható. A PBA-PCR gyakorlati alkalmazhatóságát eltérő vizsgálatokban sikerült igazolnunk.

5.3. Spiegelmer alapú szendvics mérés AlphaLisa rendszerben

Az aptamerek széleskörű elterjedésének komoly gátat szab a nukleáz enzimekkel szembeni gyenge ellenállóképességük. Ennek orvoslására az elmúlt 30 évben több módosítást hajtottak végre, ezek közül a legnagyobb áttörést a spiegelmer kifejlesztésével sikerült elérni, melyek az L-nukleotid építőköveknek köszönhetően szérumban sem degradálódnak [27]. Ennek köszönhetően a spiegelmer nagy teranosztikai potenciállal rendelkezik. Ennek megfelelően tűztük ki célul egy szívizom eredetű troponin I kimutatásra alkalmas spiegelmer alapú szendvics mérés létrehozását, melyhez a laboratóriumunkban korábban két spiegelmer szelekció történt. Az első SELEX a cTnI fehérje N-terminálisan elhelyezkedő peptid epitópjára készült, a

spiegelmerok előszűrése és karakterizálása SPR módszerrel került kivitelezésre [29]. A második szelekció a célfehérje C-terminális epitópjára történt, az oligonukleotidok előszűrését ebben az esetben membránszűrés módszerrel valósítottuk meg. Dolgozatom második részében az előszűrésben kiválasztott C-terminálisra specifikus spiegelmerok (C6 és A6) karakterizálását és a két SELEX-ből származó, legnagyobb affinitással rendelkező spiegelmer pár (B10-C6) szendvics mérésben történő tesztelését végeztem el.

Fehérjére specifikus spiegelmerok szelektálása és a D-oligonukleotid jelöltek előszűrése, módszertani okokból fakadóan, általában peptid szakaszra történik. Mindeddig egyetlen publikáció jelent meg, melyben a teljes, 110 aminosav hosszúságú D-enantiomer fehérjére történt a szelekció [152]. Ebből adódóan a szelektálást és szűrést követően szintetizált spiegelmerok célfehérje felismerő képességének ellenőrzése elengedhetetlen. Az ilyen irányú kölcsönhatás-vizsgálatokban troponin (I-T-C) komplexet használtunk, mely a monomomer cTnI-nél nagyobb molekulatömegének köszönhetően megbízhatóbb jeleket eredményez biolayer interferometria mérésben. A BLItz készülékkel végzett vizsgálatok alapján a szelektált spiegelmerok troponin (I-T-C) komplexhez nagy affinitással kötődnek, valamint a két szelekcióból származó spiegelmerok hasonlóan alacsony nanomólos K_d -val rendelkeznek, ami a cTnI diagnosztikában jelenleg használt antitesteknél nagyobb célmolekula-kötőképességet biztosít [153].

Az L-oligonukleotid szintetizáltatása meglehetősen drága, az előállítási költségek csökkentésére megoldást jelenthet a spiegelmerok csonkolása, mely legegyszerűbben a primer-kötő részek eltávolításával valósítható meg. Számítógépes elemzések alapján az aptamerek két végén elhelyezkedő szekvenciák általában nem vesznek részt a célmolekula-aptamer kölcsönhatás kialakításában. Cowperthwaite és Ellington feltételezése szerint ez részben annak köszönhető, hogy azon aptamerek, melyek másodlagos szerkezetének kialakításában részt vesz a primerkötő szakasz, azok nehezebben amplifikálhatóak, mivel a PCR-ben a primerek kevésbé tapadnak a templáthoz a molekulán belül kialakult kötések miatt [8]. Méréseink ezeknek a megfigyeléseknek ellentmondanak, a legerősebb K_d -val rendelkező C6 spiegelmer célmolekulakötő- affinitása csökken a primer részek eltávolításával. Az általunk

tapasztalt, aptamerek csonkolásával együttjáró affinitáscsökkenés azonban nem egyedi, a szakirodalomban számos további ilyen példa található [154].

Szívinfarktus esetén a felszabaduló kardiális troponin I fehérje szabad és troponin T és troponin C fehérjével alkotott hármass (I-T-C) komplex formában is megjelenik a keringésben, az optimális diagnosztikai rendszerek a fehérje mindkét formáját kimutatják. Eredményeink alapján a szendvics típusú mérésben ellenőrzött spiegelmer pár (B10-C6) ezen követelményeknek is eleget tesz; a laboratóriumunkban *in vitro* transzlációs rendszerben előállított cTnI fehérje és a Hytest cégtől vásárolt humán szívizomból tisztított troponin (I-T-C) komplex kimutatására egyaránt alkalmas a receptor pár.

A receptorok megbízható működését a célmolekulakötő-affinitás mellett a megfelelő specificitás legalább ugyanolyan mértékben meghatározza, ezért a célmolekulával nagymértékű homológiát mutató fehérjék esetén a kölcsönhatás vizsgálatot mindenképp el kell végezni. A cTnI fehérje közel 50%-os szekvencia azonosságot mutat a vázizom eredetű troponin I fehérjével (sTnI) [143], ezért a spiegelmeres keresztreakcióját kontrollként *in vitro* transzlációs rendszerben előállított sTnI fehérjével megvizsgáltuk szendvics mérésnél. Az Alpha mérések alapján a cTnI specifikus epitópokra szelektált spiegelmeres képesek megkülönböztetni a troponin I fehérje két izoformáját.

Az aptamerek és spiegelmeres felhasználásának elterjedését nagyban gátolja, hogy az oligonukleotidok tesztelése és felhasználása sok esetben eltérő körülmények között történik, emiatt a szakirodalomban közölt, kiemelkedően jó affinitással rendelkező aptamerek a nem megfelelő alapossággal kivitelezett karakterizálásuk következtében valós mintában gyengébb affinitást mutathatnak. Ezen probléma kiküszöböléséhez a spiegelmer pár működését SELEX-ben használt szelekciós pufferben és hígított szérumot tartalmazó oldatban is megvizsgáltuk. Bár a szérumot tartalmazó mintában az Alpha jelek visszaestek, a vizsgált spiegelmer párral komplex fehérje mátrixban is megbízhatóan kimutatható volt a cTnI fehérje.

Az Alpha mérések érzékenységét több tényező befolyásolja, ezért az ideális mérési körülmények meghatározásával a rendszer szenzitivitása jelentősen növelhető

[115,155–157]. Számos paraméter optimalizálásával sikerült olyan mérési beállításokat meghatározni, melyben a lumineszcens jelek intenzitása jó linearitást mutatott a cTnI fehérje ng/ml-es koncentráció tartományában. Ez az érték elmarad a jelenleg használatos antitest alapú, nagyérzékenységű troponin tesztek pg/ml-es cTnI fehérje kimutatási határától, a különbség azonban feltehetőleg nem a receptorok kötőképességéből, hanem a mérési rendszerek hatékonyságából ered, ugyanis az általunk fejlesztett spiegelmer affinitása nem marad el a diagnosztikai rendszerben alkalmazott antitestek K_d -jától [153].

Összegezve, sikerült AlphaLisa rendszerben igazolni egy teljesen spiegelmer alapú cTnI fehérje kimutatásra alkalmas szendvics mérés működőképességét. A rendszer megfelelő szelektivitása mellett azt is igazoltuk, hogy egyaránt alkalmas a cTnI monomer és komplex akár vérszérumban történő kimutatására is. Mindezek az eredmények jelzik a spiegelmer alapú diagnosztikai mérések fejlesztésének létjogosultságát.

6. Következtetések

A primer blokkolt aszimmetrikus PCR-rel (PBA-PCR), az ideális primer arányoknak köszönhetően, a hagyományos aszimmetrikus PCR-hez képest, nagyobb mennyiségű egyszálú DNS állítható elő. Továbbá a reakció elegyben lévő 3' blokkolt primerek hatékonyan gátolják a melléktermék-képződést, ennek köszönhetően a PBA-PCR megfelelő méretű terméket eredményez egyedi és kevert templátnál egyaránt.

Az optimalizált PBA-PCR univerzálisan használható eltérő primer régióval rendelkező egyedi és kevert DNS templátok esetén. A random DNS könyvtár összetétele az amplifikáció során nem torzul, a szekvencia diverzitás érdemben nem változik.

Szükség esetén a PBA-PCR kiegészíthető egy hődenaturációs tisztítási lépéssel, melynek eredményeként dsDNS-től mentes, tisztán egyszálú DNS állítható elő.

A PBA-PCR jól alkalmazható aptamer jelöltek előszűréséhez, mivel az ezzel a megközelítéssel előállított aptamer jelöltek a PBA-PCR-nél idő- és költségigényesebb lambda exonukleáz kezeléssel készített oligonukleotidokéhoz hasonló hatékonysággal alkalmazhatók. Mindemellett a PBA-PCR alkalmas az aptamerek kolónia PCR-ből történő amplifikálására, ami nagymennyiségű, eltérő szekvenciával rendelkező oligonukleotid gyors, egyszerű és olcsó előállítását teszi lehetővé.

A SELEX ciklusok végéről származó, szűkített DNS könyvtárak PBA-PCR-rel történő amplifikálása és egyszálúsítása szintén megvalósítható, ennek köszönhetően a PBA-PCR termékek célmolekula-kötő képességének vizsgálata lehetővé teszi a szelekció progressziójának ellenőrzését.

Laboratóriumunkban korábban a cTnI fehérje C-terminális részére szelektált spiegelmerek megfelelő szelektivitással és affinitással rendelkeznek. A két cTnI epitóra kivitelezett szelekcióból származó spiegelmer pár szendvics típusú mérésben alkalmas a cTnI fehérje és a troponin (I-T-C) komplex kimutatására. Továbbá a spiegelmer alapú szendvics mérés megfelelő szelektivitással rendelkezik, a célfehérjével magas homológiát mutató sTnI fehérje nem zavarja a mérést.

Optimalizált paraméterekkel összeállított szendvics típusú mérésben a cTnI fehérje ng/ml-es koncentráció tartományban kimutatható, akár szérumból is. Az antitest-alapú, nagyérzékenységű troponin tesztek cTnI kimutatási határa a bemutatott spiegelmeket használóknál több nagyságrenddel alacsonyabb, azonban a nagy érzékenység valószínűsíthetően a mérési rendszerek hosszas optimalizálásának köszönhető. Mindezek alapján a szelektált spiegelmek kiemelkedő célmolekula-kötő affinitásuknak, szelektivitásuknak és valós mintákban való működésüknek köszönhetően, ígéretes alternatívái lehetnek az cTnI diagnosztikában használt antitesteknek.

7. Összefoglalás

Az aptamerek megjelenése óta több, mint 30 év telt el, széleskörű gyakorlati felhasználásuk azonban máig nem történt meg, ami részben az aptamerek szelektálásából adódó nehézségekből, valamint a szelektált aptamerek nem megfelelő karakterizálásából adódik. PhD munkámmal ezen korlátozó tényezők csökkentéséhez szerettünk volna hozzájárulni.

A primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) fejlesztésével egy olyan egyszálúsítási technológia létrehozása volt a célunk, mellyel az aptamer szelekció és az aptamer jelöltek ellenőrzése költséghatékonyan, egyszerűen megvalósítható. Módszerfejlesztésünk alapja, hogy az aszimmetrikus PCR-elegyhez adott 3' blokkolt limitáló primerek, melyekről termék nem keletkezik, ekvimoláris koncentrációban tartják a forward és reverse primereket, aminek köszönhetően a limitáló primer olvadáspontja nem változik, így az aszimmetrikus PCR hatásfoka növelhető, továbbá a ssDNS termékek egymáshoz tapadásának gátlásával hátráltatják a melléktermékek képződését a PCR-ben. Eredményeink alapján az optimalizált PBA-PCR-rel hatékonyan állítható elő mellékterméktől mentes ssDNS mind egyedi, mind kevert szekvenciát tartalmazó DNS templátról. A termék későbbi felhasználása alapján a módszer változtatható, hődenaturációs lépéssel a részben kétszálú PBA-PCR termékből tiszta ssDNS állítható elő. A PBA-PCR alkalmazhatóságának teszteléséhez proBNP specifikus aptamereket szelektáltunk. A PBA-PCR-rel előállított oligonukleotidok alkalmasak voltak az aptamer jelöltek előszűrésére AlphaScreen mérésben, emellett a SELEX ciklusok végéről származó, PBA-PCR-rel előállított, szűkített könyvtárak alkalmasak voltak a szelekció előrehaladtának vizsgálatára.

A dolgozat második részében laboratóriumunkban korábban szelektált, kardiális troponin I (cTnI) fehérje N és C-terminálisára specifikus spiegelmerok karakterizálását végeztük el, valamint a két szelekcióból származó spiegelmerok szendvics típusú mérésben való alkalmazhatóságát vizsgáltuk AlphaLisa módszerrel. Eredmények alapján a szelektált spiegelmerok megfelelő affinitással kötődnek célmolekulájukhoz és nagy specificitásuknak köszönhetően a cTnI fehérjével magas homológiát mutató sTnI fehérjéhez nem kapcsolódnak, emellett sikerült létrehoznunk egy spiegelmer-alapú szendvics típusú mérést, mellyel a cTnI fehérjét szabad formában és troponin (I-T-C) komplexben is sikerült kimutatnunk szérumból tartalmazó mintából is.

8. Summary

Although various methods have been developed to improve the SELEX over the last three decades, the conversion of the dsDNA to ssDNA, and the adequate characterization of oligonucleotide candidates remains a challenging task of successful aptamer selection. The goal of my PhD work was to attenuate these limiting factors.

We aimed at developing a new, modified asymmetric PCR to circumvent the shortcomings of presently applied ssDNA production protocols. The key of our method is the addition of a 3' terminal blocked reverse primer to the PCR mixture. On one hand it holds the forward and reverse primer in equimolar concentration; therefore the amplification is not hindered by the decreased melting temperature of the limiting primer. On the other hand, this approach could dramatically decrease the nonspecific annealing and consequently, the formation of PCR by-products. According to the obtained results, the novel approach worked equally efficiently with using unique oligonucleotide and complex ssDNA library as template of the PCR. If needed for the downstream processes, completely ssDNA can also be produced from the partially double stranded PBA-PCR product by a heat purification step. ProBNP specific aptamers were selected for testing the applicability of the novel method and the obtained data indicated that the modified asymmetric PCR is an appropriate choice of ssDNA production for monitoring the SELEX progression and screening the individual aptamer candidates.

In the second part of my PhD dissertation, we aimed to characterise cardiac troponin I specific spiegelmers, which were selected previously in our laboratory for two different epitopes of the protein. According to our results the selected spiegelmers possess higher target binding capacity than antibodies of the present cTnI diagnostics. Next, we aimed to verify the applicability of the selected spiegelmers in a cTnI specific sandwich assay by AlphaLisa measurement. The obtained results demonstrated that spiegelmers sandwich assay is suitable for selective measurement of cTnI monomer and I-T-C complex even in such complex matrices as blood serum in the nM range.

9. Irodalomjegyzék

- [1] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* (80-.). 249 (1990) 505–510. doi:10.1126/science.2200121.
- [2] a D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands., *Nature*. 346 (1990) 818–22. doi:10.1038/346818a0.
- [3] A.D. Ellington, J.W. Szostak, Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures., *Nature*. 355 (1992) 850–852. doi:10.1038/355850a0.
- [4] T. Schütze, B. Wilhelm, N. Greiner, H. Braun, F. Peter, M. Mörl, V.A. Erdmann, H. Lehrach, Z. Konthur, M. Menger, P.F. Arndt, J. Glökler, Probing the SELEX process with next-generation sequencing, *PLoS One*. 6 (2011) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0029604.
- [5] M. Takahashi, X. Wu, M. Ho, P. Chomchan, J.J. Rossi, J.C. Burnett, J. Zhou, High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14. doi:10.1038/srep33697.
- [6] C. Lozupone, S. Changayil, I. Majerfeld, M. Yarus, Selection of the simplest RNA that binds isoleucine., *RNA*. 9 (2003) 1315–1322. doi:10.1261/rna.5114503.
- [7] M. Legiewicz, C. Lozupone, R. Knight, M. Yarus, Size, constant sequences, and optimal selection., *RNA*. 11 (2005) 1701–1709. doi:10.1261/rna.2161305.
- [8] M.C. Cowperthwaite, A.D. Ellington, Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures., *J. Mol. Evol.* 67 (2008) 95–102. doi:10.1007/s00239-008-9130-4.
- [9] B. Hall, J.M. Micheletti, P. Satya, K. Ogle, J. Pollard, A.D. Ellington, Design, synthesis, and amplification of DNA pools for in vitro selection., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* Chapter 9 (2009) Unit 9.2. doi:10.1002/0471142700.nc0902s39.
- [10] A. Berezhnoy, C.A. Stewart, J.O. 2nd Mcnamara, W. Thiel, P. Giangrande, G.

- Trinchieri, E. Gilboa, Isolation and optimization of murine IL-10 receptor blocking oligonucleotide aptamers using high-throughput sequencing., *Mol. Ther.* 20 (2012) 1242–1250. doi:10.1038/mt.2012.18.
- [11] A. Ozer, J.M. Pagano, J.T. Lis, New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization, *Mol Ther Nucleic Acids.* 3 (2014) e183. doi:10.1038/mtna.2014.34.
- [12] W. Pan, P. Xin, G.A. Clawson, Minimal primer and primer-free SELEX protocols for selection of aptamers from random DNA libraries., *Biotechniques.* 44 (2008) 351–360. doi:10.2144/000112689.
- [13] K.M. Ruff, T.M. Snyder, D.R. Liu, Enhanced functional potential of nucleic acid aptamer libraries patterned to increase secondary structure., *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9453–9464. doi:10.1021/ja103023m.
- [14] Y. Zhou, X. Qi, Y. Liu, F. Zhang, H. Yan, DNA Nanoscaffold-Assisted Selection of Femtomolar Bivalent Aptamers for Human alpha-Thrombin with Potent Anticoagulant Activity., *Chembiochem.* (2019). doi:10.1002/cbic.201900265.
- [15] T. Wang, C. Chen, L.M. Larcher, R.A. Barrero, R.N. Veedu, Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development., *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 28–50. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.
- [16] S. Ni, H. Yao, L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A. Lu, G. Zhang, Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes., *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). doi:10.3390/ijms18081683.
- [17] X. Yang, D.G. Gorenstein, Progress in thioaptamer development., *Curr. Drug Targets.* 5 (2004) 705–715. doi:10.2174/1389450043345074.
- [18] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, C. Bock, A. Bock, E.N. Brody, J. Carter, A.B. Dalby, B.E. Eaton, T. Fitzwater, D. Flather, A. Forbes, T. Foreman, C. Fowler, B. Gawande, M. Goss, M. Gunn, S. Gupta, D. Halladay, J. Heil, J. Heilig, B. Hicke, G. Husar, N. Janjic, T. Jarvis, S. Jennings, E. Katilius, T.R. Keeney, N. Kim, T.H. Koch, S. Kraemer, L. Kroiss, N. Le, D. Levine, W. Lindsey, B. Lollo, W. Mayfield, M. Mehan, R. Mehler, S.K. Nelson, M. Nelson, D. Nieuwlandt, M. Nikrad, U. Ochsner, R.M. Ostroff, M. Otis, T. Parker, S. Pietrasiewicz, D.I. Resnicow, J. Rohloff, G. Sanders, S. Sattin, D. Schneider, B. Singer, M. Stanton, A. Sterkel, A. Stewart, S. Stratford, J.D. Vaught, M. Vrkljan, J.J. Walker, M. Watrobka, S. Waugh, A. Weiss, S.K. Wilcox, A. Wolfson, S.K. Wolk, C. Zhang,

- D. Zichi, Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery., *PLoS One*. 5 (2010) e15004. doi:10.1371/journal.pone.0015004.
- [19] J.D. Vaught, C. Bock, J. Carter, T. Fitzwater, M. Otis, D. Schneider, J. Rolando, S. Waugh, S.K. Wilcox, B.E. Eaton, Expanding the chemistry of DNA for in vitro selection., *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4141–4151. doi:10.1021/ja908035g.
- [20] M. Kimoto, K.-I. Matsunaga, I. Hirao, Evolving Aptamers with Unnatural Base Pairs., *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 9 (2017) 315–339. doi:10.1002/cpch.31.
- [21] J.C. Rohloff, A.D. Gelinas, T.C. Jarvis, U.A. Ochsner, D.J. Schneider, L. Gold, N. Janjic, Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents, *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 3 (2014) e201. doi:10.1038/mtna.2014.49.
- [22] F. Tolle, G.M. Brändle, D. Matzner, G. Mayer, A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54 (2015) 10971–10974. doi:10.1002/anie.201503652.
- [23] T.M. Dewey, A. Mundt, G.J. Crouch, M.C. Zyzniewski, B.E. Eaton, New Uridine Derivatives for Systematic Evolution of RNA Ligands by Exponential Enrichment, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 8474–8475. doi:10.1021/ja00137a027.
- [24] R. Yamashige, M. Kimoto, Y. Takezawa, A. Sato, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, Highly specific unnatural base pair systems as a third base pair for PCR amplification., *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 2793–2806. doi:10.1093/nar/gkr1068.
- [25] K. Percze, T. Mészáros, Analysis of Modified Nucleotide Aptamer Library Generated by Thermophilic DNA Polymerases., *Chembiochem.* (2020). doi:10.1002/cbic.202000236.
- [26] S. Shigdar, J. Macdonald, M. O'Connor, T. Wang, D. Xiang, H. Al Shamaileh, L. Qiao, M. Wei, S.-F. Zhou, Y. Zhu, L. Kong, S. Bhattacharya, C. Li, W. Duan, Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation., *Sensors (Basel)*. 13 (2013) 13624–13637. doi:10.3390/s131013624.
- [27] S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, V.A. Erdmann, J.P. Fürste, Mirror-image RNA that binds D-adenosine., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 1112–1115.

doi:10.1038/nbt0996-1112.

- [28] A. Vater, S. Klussmann, Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer(®) therapeutics., *Drug Discov. Today*. 20 (2015) 147–155. doi:10.1016/j.drudis.2014.09.004.
- [29] Z. Szeitner, G. Lautner, S.K. Nagy, R.E. Gyurcsanyi, T. Meszaros, A rational approach for generating cardiac troponin I selective Spiegelmers., *Chem. Commun. (Camb)*. 50 (2014) 6801–6804. doi:10.1039/c4cc00447g.
- [30] S.K. Haßel, G. Mayer, Aptamers as Therapeutic Agents: Has the Initial Euphoria Subsided?, *Mol. Diagn. Ther.* 23 (2019) 301–309. doi:10.1007/s40291-019-00400-6.
- [31] K.A. Marshall, A.D. Ellington, In vitro selection of RNA aptamers., *Methods Enzymol.* 318 (2000) 193–214. doi:10.1016/s0076-6879(00)18053-x.
- [32] R.D. Walters, D.T. McSwiggen, J.A. Goodrich, J.F. Kugel, Selection and characterization of a DNA aptamer that can discriminate between cJun/cJun and cJun/cFos., *PLoS One*. 9 (2014) e101015. doi:10.1371/journal.pone.0101015.
- [33] U.A. Ochsner, L.S. Green, L. Gold, N. Janjic, Systematic selection of modified aptamer pairs for diagnostic sandwich assays., *Biotechniques*. 56 (2014) 125-128,130,132-133. doi:10.2144/000114134.
- [34] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, High-resolution molecular discrimination by RNA., *Science*. 263 (1994) 1425–1429. doi:10.1126/science.7510417.
- [35] T.L. Bailey, J. Johnson, C.E. Grant, W.S. Noble, The MEME Suite., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W39-49. doi:10.1093/nar/gkv416.
- [36] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction., *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3406–3415. doi:10.1093/nar/gkg595.
- [37] O. Kikin, L. D’Antonio, P.S. Bagga, QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences., *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) W676-82. doi:10.1093/nar/gkl253.
- [38] L. Civit, S.M. Taghdisi, A. Jonczyk, S.K. Haßel, C. Gröber, M. Blank, H.J.

- Stunden, M. Beyer, J. Schultze, E. Latz, G. Mayer, Systematic evaluation of cell-SELEX enriched aptamers binding to breast cancer cells., *Biochimie*. 145 (2018) 53–62. doi:10.1016/j.biochi.2017.10.007.
- [39] G.L. Lokesh, H. Wang, C.H. Lam, V. Thiviyanathan, N. Ward, D.G. Gorenstein, D.E. Volk, X-Aptamer Selection and Validation., *Methods Mol. Biol.* 1632 (2017) 151–174. doi:10.1007/978-1-4939-7138-1_10.
- [40] D. Irvine, C. Tuerk, L. Gold, SELEXION. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 739–761.
- [41] J. Wang, J.F. Rudzinski, Q. Gong, H.T. Soh, P.J. Atzberger, Influence of target concentration and background binding on in vitro selection of affinity reagents., *PLoS One*. 7 (2012) e43940. doi:10.1371/journal.pone.0043940.
- [42] A. Ozer, B.S. White, J.T. Lis, D. Shalloway, Density-dependent cooperative non-specific binding in solid-phase SELEX affinity selection., *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 7167–7175. doi:10.1093/nar/gkt477.
- [43] R.K. Mosing, M.T. Bowser, Isolating aptamers using capillary electrophoresis-SELEX (CE-SELEX)., *Methods Mol. Biol.* 535 (2009) 33–43. doi:10.1007/978-1-59745-557-2_3.
- [44] S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 20–21. doi:10.1021/ja037832s.
- [45] E. Kowalska, F. Bartnicki, K. Pels, W. Strzalka, The impact of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resins on DNA aptamer selection., *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5495–5499. doi:10.1007/s00216-014-7937-y.
- [46] J.G. Bruno, In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 117–120. doi:10.1006/bbrc.1997.6517.
- [47] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection., *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 83–91. doi:10.1007/s00216-005-3388-9.
- [48] N. Paniel, G. Istamboulié, A. Triki, C. Lozano, L. Barthelmebs, T. Noguier,

- Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor., *Talanta*. 162 (2017) 232–240. doi:10.1016/j.talanta.2016.09.058.
- [49] J. Wang, Q. Gong, N. Maheshwari, M. Eisenstein, M.L. Arcila, K.S. Kosik, H.T. Soh, Particle display: a quantitative screening method for generating high-affinity aptamers., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 4796–4801. doi:10.1002/anie.201309334.
- [50] R. Stoltenburg, N. Nikolaus, B. Strehlitz, Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics., *J. Anal. Methods Chem.* 2012 (2012) 415697. doi:10.1155/2012/415697.
- [51] M. Homann, H.U. Göringer, Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes., *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 2006–2014. doi:10.1093/nar/27.9.2006.
- [52] M.-C. Mercier, M. Dontenwill, L. Choulier, Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers., *Cancers (Basel)*. 9 (2017). doi:10.3390/cancers9060069.
- [53] M.A. Shampo, R.A. Kyle, Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA., *Mayo Clin. Proc.* 77 (2002) 606. doi:10.4065/77.7.606.
- [54] A. Drabovich, S.N. Krylov, Single-stranded DNA-binding protein facilitates gel-free analysis of polymerase chain reaction products in capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A*. 1051 (2004) 171–175.
- [55] F. Tolle, J. Wilke, J. Wengel, G. Mayer, By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX., *PLoS One*. 9 (2014) e114693. doi:10.1371/journal.pone.0114693.
- [56] M.U. Musheev, S.N. Krylov, Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue., *Anal. Chim. Acta*. 564 (2006) 91–96. doi:10.1016/j.aca.2005.09.069.
- [57] A. Levay, R. Brenneman, J. Hoinka, D. Sant, M. Cardone, G. Trinchieri, T.M. Przytycka, A. Berezhnoy, Identifying high-affinity aptamer ligands with defined cross-reactivity using high-throughput guided systematic evolution of ligands by exponential enrichment., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) e82. doi:10.1093/nar/gkv534.

- [58] W.H. Thiel, T. Bair, K. Wyatt Thiel, J.P. Dassie, W.M. Rockey, C.A. Howell, X.Y. Liu, A.J. Dupuy, L. Huang, R. Owczarzy, M.A. Behlke, J.O. McNamara, P.H. Giangrande, Nucleotide bias observed with a short SELEX RNA aptamer library., *Nucleic Acid Ther.* 21 (2011) 253–263. doi:10.1089/nat.2011.0288.
- [59] K. Varadaraj, D.M. Skinner, Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases., *Gene.* 140 (1994) 1–5. doi:10.1016/0378-1119(94)90723-4.
- [60] A.J. Stevens, S. Stuffrein-Roberts, S.L. Cree, A. Gibb, A.L. Miller, K. Doudney, A. Aitchison, M.R. Eccles, P.R. Joyce, V. V Filichev, M.A. Kennedy, G-quadruplex structures and CpG methylation cause drop-out of the maternal allele in polymerase chain reaction amplification of the imprinted MEST gene promoter., *PLoS One.* 9 (2014) e113955. doi:10.1371/journal.pone.0113955.
- [61] M. Nakano, J. Komatsu, S. Matsuura, K. Takashima, S. Katsura, A. Mizuno, Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion., *J. Biotechnol.* 102 (2003) 117–124. doi:10.1016/s0168-1656(03)00023-3.
- [62] B.J. Hindson, K.D. Ness, D.A. Masquelier, P. Belgrader, N.J. Heredia, A.J. Makarewicz, I.J. Bright, M.Y. Lucero, A.L. Hiddessen, T.C. Legler, T.K. Kitano, M.R. Hodel, J.F. Petersen, P.W. Wyatt, E.R. Steenblock, P.H. Shah, L.J. Bousse, C.B. Troup, J.C. Mellen, D.K. Wittmann, N.G. Erndt, T.H. Cauley, R.T. Koehler, A.P. So, S. Dube, K.A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D.P. Stumbo, S.P. Hodges, S. Romine, F.P. Milanovich, H.E. White, J.F. Regan, G.A. Karlin-Neumann, C.M. Hindson, S. Saxonov, B.W. Colston, High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number., *Anal. Chem.* 83 (2011) 8604–8610. doi:10.1021/ac202028g.
- [63] M. McKeague, E.M. McConnell, J. Cruz-Toledo, E.D. Bernard, A. Pach, E. Mastronardi, X. Zhang, M. Beking, T. Francis, A. Giamberardino, A. Cabecinha, A. Ruscito, R. Aranda-Rodriguez, M. Dumontier, M.C. DeRosa, Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters., *J. Mol. Evol.* 81 (2015) 150–161. doi:10.1007/s00239-015-9708-6.
- [64] M. McKeague, M.C. Derosa, Challenges and opportunities for small molecule aptamer development., *J. Nucleic Acids.* 2012 (2012) 748913. doi:10.1155/2012/748913.
- [65] T. Hultman, S. Stahl, E. Hornes, M. Uhlen, Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support., *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 4937–4946. doi:10.1093/nar/17.13.4937.

- [66] R. Wilson, Preparation of single-stranded DNA from PCR products with streptavidin magnetic beads., *Nucleic Acid Ther.* 21 (2011) 437–440. doi:10.1089/nat.2011.0322.
- [67] M. Svobodová, A. Pinto, P. Nadal, C.K. O’ Sullivan, Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes, *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 1–8. doi:10.1007/s00216-012-6183-4.
- [68] A. Paul, M. Avci-Adali, G. Ziemer, H.P. Wendel, Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX., *Oligonucleotides.* 19 (2009) 243–254. doi:10.1089/oli.2009.0194.
- [69] G.K. Kili, L. Tilton, C.M. Karbiwnyk, [Letter to the Editor] NaOH concentration and streptavidin bead type are key factors for optimal DNA aptamer strand separation and isolation., *Biotechniques.* 61 (2016) 114–116. doi:10.2144/000114449.
- [70] C. Liang, D. Li, G. Zhang, H. Li, N. Shao, Z. Liang, L. Zhang, A. Lu, G. Zhang, Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX., *Analyst.* 140 (2015) 3439–3444. doi:10.1039/c5an00244c.
- [71] Y. Sheng, M.T. Bowser, Isolating single stranded DNA using a microfluidic dialysis device., *Analyst.* 139 (2014) 215–24. doi:10.1039/c3an01880f.
- [72] C. Marimuthu, T.-H. Tang, J. Tominaga, S.-C. Tan, S.C.B. Gopinath, Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation., *Analyst.* 137 (2012) 1307–1315. doi:10.1039/c2an15905h.
- [73] R.G. Higuchi, H. Ochman, Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction., *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 5865. doi:10.1093/nar/17.14.5865.
- [74] J.L. Brewster, G. Tolun, Half a century of bacteriophage lambda recombinase: In vitro studies of lambda exonuclease and Red-beta annealase., *IUBMB Life.* 72 (2020) 1622–1633. doi:10.1002/iub.2343.
- [75] T.T. Nikiforov, R.B. Rendle, M.L. Kotewicz, Y.H. Rogers, The use of phosphorothioate primers and exonuclease hydrolysis for the preparation of single-stranded PCR products and their detection by solid-phase hybridization., *PCR Methods Appl.* 3 (1994) 285–291. doi:10.1101/gr.3.5.285.

- [76] K.R. Thomas, B.M. Olivera, Processivity of DNA exonucleases., *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 424–429.
- [77] M. Citartan, T.-H. Tang, S.-C. Tan, S.C.B. Gopinath, Conditions optimized for the preparation of single-stranded DNA (ssDNA) employing lambda exonuclease digestion in generating DNA aptamer, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2011) 1167–1173. doi:10.1007/s11274-010-0563-8.
- [78] N. V Komarova, S.I. Glukhov, M.S. Andrianova, A.E. Kuznetsov, Use of the Cy3 and Cy5 Fluorescent Labels to Protect a DNA Strand from Degradation under λ Exonuclease Treatment, *Moscow Univ. Chem. Bull.* 73 (2018) 19–26. doi:10.3103/S0027131418020062.
- [79] M. Avci-Adali, A. Paul, N. Wilhelm, G. Ziemer, H.P. Wendel, Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation, *Molecules.* 15 (2010) 1–11. doi:10.3390/molecules15010001.
- [80] A.P. Null, J.C. Hannis, D.C. Muddiman, Preparation of single-stranded PCR products for electrospray ionization mass spectrometry using the DNA repair enzyme lambda exonuclease., *Analyst.* 125 (2000) 619–626. doi:10.1039/a908022h.
- [81] L.A. Jones, L.E. Clancy, W.D. Rawlinson, P.A. White, High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity., *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 3019–3027. doi:10.1128/AAC.01603-05.
- [82] D.F. Bibby, A.C. Gill, L. Kirby, C.F. Farquhar, M.E. Bruce, J.A. Garson, Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins., *J. Virol. Methods.* 151 (2008) 107–115. doi:10.1016/j.jviromet.2008.03.013.
- [83] S.S. Oh, K.M. Ahmad, M. Cho, S. Kim, Y. Xiao, H.T. Soh, Improving aptamer selection efficiency through volume dilution, magnetic concentration, and continuous washing in microfluidic channels., *Anal. Chem.* 83 (2011) 6883–6889. doi:10.1021/ac201269f.
- [84] K.P. Williams, D.P. Bartel, PCR product with strands of unequal length., *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 4220–4221. doi:doi.org/10.1093/nar/23.20.4220.
- [85] X. Cao, S. Li, L. Chen, H. Ding, H. Xu, Y. Huang, J. Li, N. Liu, W. Cao, Y. Zhu, B. Shen, N. Shao, Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection

- of *Staphylococcus aureus.*, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 4621–4628.
doi:10.1093/nar/gkp489.
- [86] C.B. Joeng, J.H. Niazi, S.J. Lee, M.B. Gu, ssDNA aptamers that recognize diclofenac and 2-anilinophenylacetic acid., *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 5380–5387. doi:10.1016/j.bmc.2009.06.044.
- [87] U.B. Gyllensten, H.A. Erlich, Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 7652–7656.
doi:doi.org/10.1073/pnas.85.20.7652.
- [88] M. Tabarzad, B. Kazemi, H. Vahidi, R. Aboofazeli, S. Shahhosseini, N. Nafissi-Varcheh, Challenges to design and develop of DNA aptamers for protein targets. I. Optimization of asymmetric PCR for generation of a single stranded DNA library., *Iran. J. Pharm. Res. IJPR.* 13 (2014) 133–141.
- [89] M. Heiat, R. Ranjbar, A.M. Latifi, M.J. Rasaee, G. Farnoosh, Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64 (2017) 541–548.
doi:10.1002/bab.1507.
- [90] M. Citartan, T.H. Tang, C. Tan, C.H. Hoe, R. Saini, J. Tominaga, Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 34 (2012) 125–131.
- [91] C.-Z. He, K.-H. Zhang, T. Wang, Q.-S. Wan, P.-P. Hu, M.-D. Hu, D.-Q. Huang, N.-H. Lv, Single-primer-limited amplification: a method to generate random single-stranded DNA sub-library for aptamer selection., *Anal. Biochem.* 440 (2013) 63–70. doi:10.1016/j.ab.2013.05.008.
- [92] J.A. Sanchez, K.E. Pierce, J.E. Rice, L.J. Wangh, Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 1933–1938. doi:10.1073/pnas.0305476101.
- [93] K. Shao, X. Shi, X. Zhu, L. Cui, Q. Shao, D. Ma, Construction and optimization of an efficient amplification method of a random ssDNA library by asymmetric emulsion PCR., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64 (2017) 239–243.
doi:10.1002/bab.1467.
- [94] S.Y. Low, J.E. Hill, J. Peccia, DNA aptamers bind specifically and selectively to

- (1->3)-beta-D-glucans., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (2009) 701–705. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.087.
- [95] A. Ogawa, N. Tomita, N. Kikuchi, S. Sando, Y. Aoyama, Aptamer selection for the inhibition of cell adhesion with fibronectin as target., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4001–4004. doi:10.1016/j.bmcl.2004.05.042.
- [96] C. Wang, M. Zhang, G. Yang, D. Zhang, H. Ding, H. Wang, M. Fan, B. Shen, N. Shao, Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment., *J. Biotechnol.* 102 (2003) 15–22. doi:10.1016/s0168-1656(02)00360-7.
- [97] N.S. Hamedani, F. Blumke, F. Tolle, F. Rohrbach, H. Ruhl, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Potzsch, J. Muller, Capture and Release (CaR): a simplified procedure for one-tube isolation and concentration of single-stranded DNA during SELEX., *Chem. Commun. (Camb).* 51 (2015) 1135–1138. doi:10.1039/c4cc08233h.
- [98] Y. Zhang, H. Xu, H. Zhou, F. Wu, Y. Su, Y. Liang, D. Zhou, Indirect purification method provides high yield and quality ssDNA sublibrary for potential aptamer selection, *Anal. Biochem.* 476 (2015) 84–90. doi:10.1016/j.ab.2015.02.027.
- [99] K.M. Ahmad, S.S. Oh, S. Kim, F.M. McClellan, Y. Xiao, H.T. Soh, Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform., *PLoS One.* 6 (2011) e27051. doi:10.1371/journal.pone.0027051.
- [100] N. Mencin, T. Smuc, M. Vranicar, J. Mavri, M. Hren, K. Galesa, P. Krkoc, H. Ulrich, B. Solar, Optimization of SELEX: comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91 (2014) 151–159. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.031.
- [101] Z. Luo, L. He, J. Wang, X. Fang, L. Zhang, Developing a combined strategy for monitoring the progress of aptamer selection., *Analyst.* 142 (2017) 3136–3139. doi:10.1039/c7an01131h.
- [102] F. Chen, S.M. Pruett-Miller, Y. Huang, M. Gjoka, K. Duda, J. Taunton, T.N. Collingwood, M. Frodin, G.D. Davis, High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases., *Nat. Methods.* 8 (2011) 753–755. doi:10.1038/nmeth.1653.
- [103] F.M. Spiga, P. Maietta, C. Guiducci, More DNA–Aptamers for Small Drugs: A Capture–SELEX Coupled with Surface Plasmon Resonance and High-Throughput Sequencing., *ACS Comb. Sci.* 17 (2015) 326–333.

doi:10.1021/acscombsci.5b00023.

- [104] E. Dausse, S. Taouji, L. Evade, C. Di Primo, E. Chevet, J.-J. Toulme, HAPIScreen, a method for high-throughput aptamer identification., *J. Nanobiotechnology*. 9 (2011) 25. doi:10.1186/1477-3155-9-25.
- [105] B. Mondal, S. Ramlal, P.S.R. Lavu, H.S. Murali, H.V. Batra, A combinatorial systematic evolution of ligands by exponential enrichment method for selection of aptamer against protein targets., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 9791–9803. doi:10.1007/s00253-015-6858-9.
- [106] M. McKeague, A. De Girolamo, S. Valenzano, M. Pascale, A. Ruscito, R. Velu, N.R. Frost, K. Hill, M. Smith, E.M. McConnell, M.C. DeRosa, Comprehensive analytical comparison of strategies used for small molecule aptamer evaluation., *Anal. Chem.* 87 (2015) 8608–8612. doi:10.1021/acs.analchem.5b02102.
- [107] K. Percze, Z. Szakács, É. Scholz, J. András, Z. Szeitner, C.H.V.D. Kieboom, G. Ferwerda, M.I.D. Jonge, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros, Aptamers for respiratory syncytial virus detection, *Sci. Rep.* 7 (2017). doi:10.1038/srep42794.
- [108] C. Entzian, T. Schubert, Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST)., *Methods*. 97 (2016) 27–34. doi:10.1016/j.ymeth.2015.08.023.
- [109] X. Zheng, B. Hu, S.X. Gao, D.J. Liu, M.J. Sun, B.H. Jiao, L.H. Wang, A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation., *Toxicon*. 101 (2015) 41–47. doi:10.1016/j.toxicon.2015.04.017.
- [110] A. Sotokawauchi, N. Nakamura, T. Matsui, Y. Higashimoto, S.-I. Yamagishi, Glyceraldehyde-Derived Pyridinium Evokes Renal Tubular Cell Damage via RAGE Interaction., *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). doi:10.3390/ijms21072604.
- [111] A. Sultana, J.E. Lee, Measuring protein-protein and protein-nucleic Acid interactions by biolayer interferometry., *Curr. Protoc. Protein Sci.* 79 (2015) 19.25.1-26. doi:10.1002/0471140864.ps1925s79.
- [112] X. Lou, M. Egli, X. Yang, Determining Functional Aptamer-Protein Interaction by Biolayer Interferometry., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 67 (2016) 7.25.1-7.25.15. doi:10.1002/cpnc.18.

- [113] R.M. Eglén, T. Reisine, P. Roby, N. Rouleau, C. Illy, R. Bossé, M. Bielefeld, The use of AlphaScreen technology in HTS: current status., *Curr. Chem. Genomics*. 1 (2008) 2–10. doi:10.2174/1875397300801010002.
- [114] Z. Szeitner, A. Doleschall, M. Varga, K. Keltai, K. Révész, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros, Spiegelmers as potential receptors for cTnI diagnostics, *Anal. Methods*. 9 (2017) 5091–5093. doi:10.1039/C7AY01777D.
- [115] M.E. Bembenek, A. Burkhardt, J. Ma, Z. Li, H.-K. Loke, D. Wu, Q. Xu, O. Tayber, L. Xie, P. Li, L. Li, Determination of complementary antibody pairs using protein A capture with the AlphaScreen assay format., *Anal. Biochem*. 408 (2011) 321–327. doi:10.1016/j.ab.2010.09.021.
- [116] J.G. Bruno, A.M. Richarte, T. Phillips, Preliminary Development of a DNA Aptamer-Magnetic Bead Capture Electrochemiluminescence Sandwich Assay for Brain Natriuretic Peptide., *Microchem. J. Devoted to Appl. Microtech. All Branches Sci*. 115 (2014) 32–38. doi:10.1016/j.microc.2014.02.003.
- [117] Y. Zhang, B.S. Lai, M. Juhas, Recent advances in aptamer discovery and applications, *Molecules*. 24 (2019). doi:10.3390/molecules24050941.
- [118] H. Kourlas, D.S. Schiller, Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review., *Clin. Ther*. 28 (2006) 36–44. doi:10.1016/j.clinthera.2006.01.009.
- [119] H. Kaur, J.G. Bruno, A. Kumar, T.K. Sharma, Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines., *Theranostics*. 8 (2018) 4016–4032. doi:10.7150/thno.25958.
- [120] S. Fredriksson, W. Dixon, H. Ji, A.C. Koong, M. Mindrinos, R.W. Davis, Multiplexed protein detection by proximity ligation for cancer biomarker validation., *Nat. Methods*. 4 (2007) 327–329. doi:10.1038/nmeth1020.
- [121] P. Ganz, B. Heidecker, K. Hveem, C. Jonasson, S. Kato, M.R. Segal, D.G. Sterling, S.A. Williams, Development and Validation of a Protein-Based Risk Score for Cardiovascular Outcomes Among Patients With Stable Coronary Heart Disease., *JAMA*. 315 (2016) 2532–2541. doi:10.1001/jama.2016.5951.
- [122] A. Penn-Nicholson, T. Hraha, E.G. Thompson, D. Sterling, S.K. Mbandi, K.M. Wall, M. Fisher, S. Suliman, S. Shankar, W.A. Hanekom, N. Janjic, M. Hatherill, S.H.E. Kaufmann, J. Sutherland, G. Walzl, M.A. De Groote, U. Ochsner, D.E. Zak, T.J. Scriba, Discovery and validation of a prognostic proteomic signature

for tuberculosis progression: A prospective cohort study., *PLoS Med.* 16 (2019) e1002781. doi:10.1371/journal.pmed.1002781.

- [123] A. Egerstedt, J. Berntsson, M.L. Smith, O. Gidlöf, R. Nilsson, M. Benson, Q.S. Wells, S. Celik, C. Lejonberg, L. Farrell, S. Sinha, D. Shen, J. Lundgren, G. Rådegran, D. Ngo, G. Engström, Q. Yang, T.J. Wang, R.E. Gerszten, J.G. Smith, Profiling of the plasma proteome across different stages of human heart failure., *Nat. Commun.* 10 (2019) 5830. doi:10.1038/s41467-019-13306-y.
- [124] Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015., *Lancet (London, England)*. 388 (2016) 1459–1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
- [125] K. Thygesen, J.S. Alpert, A.S. Jaffe, B.R. Chaitman, J.J. Bax, D.A. Morrow, H.D. White, Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)., *J. Am. Coll. Cardiol.* 72 (2018) 2231–2264. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1038.
- [126] J.J. V McMurray, S. Adamopoulos, S.D. Anker, A. Auricchio, M. Böhm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M.A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Køber, G.Y.H. Lip, A. Pietro Maggioni, A. Parkhomenko, B.M. Pieske, B.A. Popescu, P.K. Rønnevik, F.H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P.T. Trindade, A.A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher, ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 1787–1847. doi:10.1093/eurheartj/ehs104.
- [127] K. Kangawa, H. Matsuo, Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP)., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 (1984) 131–139. doi:10.1016/0006-291x(84)91077-5.
- [128] T. Sudoh, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, A new natriuretic peptide in porcine brain., *Nature*. 332 (1988) 78–81. doi:10.1038/332078a0.
- [129] T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168 (1990) 863–870. doi:10.1016/0006-291x(90)92401-k.
- [130] Y. Nakagawa, T. Nishikimi, K. Kuwahara, Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart., *Peptides*. 111 (2019) 18–25.

doi:10.1016/j.peptides.2018.05.012.

- [131] A. Matsuo, C. Nagai-Okatani, M. Nishigori, K. Kangawa, N. Minamino, Natriuretic peptides in human heart: Novel insight into their molecular forms, functions, and diagnostic use., *Peptides*. 111 (2019) 3–17. doi:10.1016/j.peptides.2018.08.006.
- [132] U. Schellenberger, J. O'Rear, A. Guzzetta, R.A. Jue, A.A. Protter, N.S. Pollitt, The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein., *Arch. Biochem. Biophys.* 451 (2006) 160–166. doi:10.1016/j.abb.2006.03.028.
- [133] A.G. Semenov, N.N. Tamm, K.R. Seferian, A.B. Postnikov, N.S. Karpova, D. V Serebryanaya, E. V Koshkina, M.I. Krasnoselsky, A.G. Katrukha, Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases., *Clin. Chem.* 56 (2010) 1166–1176. doi:10.1373/clinchem.2010.143883.
- [134] N. Vodovar, M.-F. Séronde, S. Laribi, E. Gayat, J. Lassus, R. Boukef, S. Nouira, P. Manivet, J.-L. Samuel, D. Logeart, S. Ishihara, A. Cohen Solal, J.L.J. Januzzi, A.M. Richards, J.-M. Launay, A. Mebazaa, Post-translational modifications enhance NT-proBNP and BNP production in acute decompensated heart failure., *Eur. Heart J.* 35 (2014) 3434–3441. doi:10.1093/eurheartj/ehu314.
- [135] K. Masuta, K. Funatsuki, Y. Inoue, I. Masuda, T. Nishikimi, Y. Nakagawa, K. Horii, H. Nishi, M. Igarashi, N. Ota, A Mixture of Glycosylated proBNP and BNP-32 Is a Suitable Calibrator for BNP Immunoassays, *Open J. Clin. Diagnostics*. 9 (2019) 51–63.
- [136] K.R. Seferian, N.N. Tamm, A.G. Semenov, A.A. Tolstaya, E. V Koshkina, M.I. Krasnoselsky, A.B. Postnikov, D. V Serebryanaya, F.S. Apple, M.M. Murakami, A.G. Katrukha, Immunodetection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood., *Clin. Chem.* 54 (2008) 866–873. doi:10.1373/clinchem.2007.100040.
- [137] A.G. Semenov, A.B. Postnikov, N.N. Tamm, K.R. Seferian, N.S. Karpova, M.N. Bloshchitsyna, E. V Koshkina, M.I. Krasnoselsky, D. V Serebryanaya, A.G. Katrukha, Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site., *Clin. Chem.* 55 (2009) 489–498. doi:10.1373/clinchem.2008.113373.
- [138] M.-C. Lin, J. Nawarak, T.-Y. Chen, H.-Y. Tsai, J.-F. Hsieh, S. Sinchaikul, S.-T. Chen, Rapid detection of natriuretic peptides by a microfluidic LabChip analyzer with DNA aptamers: Application of natriuretic peptide detection.,

- Biomicrofluidics. 3 (2009) 34101. doi:10.1063/1.3194283.
- [139] A. Sinha, P. Gopinathan, Y.-D. Chung, S.-C. Shiesh, G.-B. Lee, Simultaneous detection of multiple NT-proBNP clinical samples utilizing an aptamer-based sandwich assay on an integrated microfluidic system., *Lab Chip*. 19 (2019) 1676–1685. doi:10.1039/c9lc00115h.
- [140] H.R. Jang, A.W. Wark, S.H. Baek, B.H. Chung, H.J. Lee, Ultrasensitive and ultrawide range detection of a cardiac biomarker on a surface plasmon resonance platform., *Anal. Chem.* 86 (2014) 814–819. doi:10.1021/ac4033565.
- [141] A.G. Szent-Györgyi, The early history of the biochemistry of muscle contraction., *J. Gen. Physiol.* 123 (2004) 631–641. doi:10.1085/jgp.200409091.
- [142] A.S. Streng, D. de Boer, J. van der Velden, M.P. van Dieijen-Visser, W.K.W.H. Wodzig, Posttranslational modifications of cardiac troponin T: an overview., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 63 (2013) 47–56. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.07.004.
- [143] P.O. Collinson, F.G. Boa, D.C. Gaze, Measurement of cardiac troponins., *Ann. Clin. Biochem.* 38 (2001) 423–449. doi:10.1177/000456320103800501.
- [144] N.A. Morjana, Degradation of human cardiac troponin I after myocardial infarction., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28 (1998) 105–111.
- [145] A. V Vylegzhanina, A.E. Kogan, I.A. Katrukha, E. V Koshkina, A. V Bereznikova, V.L. Filatov, M.N. Bloschitsyna, A.P. Bogomolova, A.G. Katrukha, Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction., *Clin. Chem.* 65 (2019) 882–892. doi:10.1373/clinchem.2018.301127.
- [146] D. Liu, X. Lu, Y. Yang, Y. Zhai, J. Zhang, L. Li, A novel fluorescent aptasensor for the highly sensitive and selective detection of cardiac troponin I based on a graphene oxide platform., *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4285–4291. doi:10.1007/s00216-018-1076-9.
- [147] H. Jo, H. Gu, W. Jeon, H. Youn, J. Her, S.-K. Kim, J. Lee, J.H. Shin, C. Ban, Electrochemical aptasensor of cardiac troponin I for the early diagnosis of acute myocardial infarction., *Anal. Chem.* 87 (2015) 9869–9875. doi:10.1021/acs.analchem.5b02312.
- [148] Z.J. Tolnai, J. András, Z. Szeitner, K. Percze, L.F. Simon, R.E. Gyurcsányi, T.

- Mészáros, Spiegelmer-Based Sandwich Assay for Cardiac Troponin I Detection., *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). doi:10.3390/ijms21144963.
- [149] A. Nehdi, N. Samman, V. Aguilar-Sánchez, A. Farah, E. Yurdusev, M. Boudjelal, J. Perreault, Novel Strategies to Optimize the Amplification of Single-Stranded DNA., *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 401. doi:10.3389/fbioe.2020.00401.
- [150] Z. Tolnai, A. Harkai, Z. Szeitner, E.N. Scholz, K. Percze, A. Gyurkovics, T. Meszaros, A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR., *Anal. Chim. Acta.* 1047 (2019) 225–230. doi:10.1016/j.aca.2018.10.017.
- [151] W. Yan, L. Gu, S. Liu, W. Ren, M. Lyu, S. Wang, Identification of a highly specific DNA aptamer for *Vibrio vulnificus* using systematic evolution of ligands by exponential enrichment coupled with asymmetric PCR., *J. Fish Dis.* (2018). doi:10.1111/jfd.12891.
- [152] C.J. Olea, J. Weidmann, P.E. Dawson, G.F. Joyce, An L-RNA Aptamer that Binds and Inhibits RNase., *Chem. Biol.* 22 (2015) 1437–1441. doi:10.1016/j.chembiol.2015.09.017.
- [153] M.S. Lowenthal, H. Gasca-Aragon, J.E. Schiel, N.G. Dodder, D.M. Bunk, A quantitative LC-MS/MS method for comparative analysis of capture-antibody affinity toward protein antigens., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 2726–2732. doi:10.1016/j.jchromb.2011.07.037.
- [154] B. Shui, A. Ozer, W. Zipfel, N. Sahu, A. Singh, J.T. Lis, H. Shi, M.I. Kotlikoff, RNA aptamers that functionally interact with green fluorescent protein and its derivatives., *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) e39. doi:10.1093/nar/gkr1264.
- [155] P. Li, Z. Chen, B. Liu, K. Li, H. Wang, L. Lin, L. He, J. Wei, T. Liu, Establishment of a novel homogeneous nanoparticle-based assay for sensitive procalcitonin detection of ultra low-volume serum samples., *Int. J. Nanomedicine.* 13 (2018) 5395–5404. doi:10.2147/IJN.S173776.
- [156] J.R. Veloria, A.K. Devkota, E.J. Cho, K.N. Dalby, Development of a cost effective and robust AlphaScreen((R)) platform for application., *Biotechniques.* 64 (2018) 181–183. doi:10.2144/btn-2018-2001.
- [157] A. Von Leoprechting, R. Kumpf, S. Menzel, D. Reulle, R. Griebel, M.J. Valler, F.H. Buttner, Miniaturization and validation of a high-throughput serine kinase

assay using the AlphaScreen platform., J. Biomol. Screen. 9 (2004) 719–725.
doi:10.1177/1087057104268805.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Z. Tolnai, A. Harkai, Z. Szeitner, E.N. Scholz, K. Percze, A. Gyurkovics, T. Meszaros, A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR., *Anal. Chim. Acta.* 1047 (2019) 225–230. doi:10.1016/j.aca.2018.10.017. IF: 5.977

Z.J. Tolnai, J. András, Z. Szeitner, K. Percze, L.F. Simon, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros, Spiegelmer-Based Sandwich Assay for Cardiac Troponin I Detection., *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). doi:10.3390/ijms21144963. IF: 4.556

Egyéb közlemények:

Z. Széll, **Z. Tolnai**, T. Sréter, Environmental determinants of the spatial distribution of *Alaria alata* in Hungary, *Vet. Parasitol.* 198 (2013). doi:10.1016/j.vetpar.2013.08.002. IF: 2,545

Z. Tolnai, Z. Széll, T. Sréter, Environmental determinants of the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* in Hungary, *Vet. Parasitol.* 198 (2013). doi:10.1016/j.vetpar.2013.09.004. IF: 2,545

Z. Tolnai, Z. Széll, G. Marucci, E. Pozio, T. Sréter, Environmental determinants of the spatial distribution of *trichinella britovi* and *trichinella spiralis* in Hungary, *Vet. Parasitol.* 204 (2014). doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.024. IF: 2,46

Z. Tolnai, Z. Széll, T. Sproch, L. Szeredi, T. Sréter, *Dirofilaria immitis*: An emerging parasite in dogs, red foxes and golden jackals in Hungary, *Vet. Parasitol.* 203 (2014). doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.004. IF: 2,46

E. Eszterbauer, B. Forró, **Z. Tolnai**, C.F. Guti, G. Zsigmond, G. Hoitsy, D.M. Kallert, Parental genetic diversity of brown trout (*Salmo trutta m. fario*) brood stock affects offspring susceptibility to whirling disease, *Parasites and Vectors.* 8 (2015). doi:10.1186/s13071-015-0744-2. IF: 3,234

Z. Széll, **Z. Tolnai**, T. Sréter, Environmental determinants of the spatial distribution of *Mesocestoides* spp. and sensitivity of flotation method for the diagnosis of mesocestoidosis, *Vet. Parasitol.* 212 (2015). doi:10.1016/j.vetpar.2015.06.021. IF: 2,242

Z. Tolnai, Z. Széll, T. Sréter, Environmental determinants of the spatial distribution of *Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis* and *Eucoleus aerophilus* in Hungary, *Vet. Parasitol.* 207 (2015). doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.008. IF: 2,242

Z. Tolnai, Z. Sréter-Lancz, T. Sréter, Spatial distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary, *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6 (2015). doi:10.1016/j.ttbdis.2015.05.009. IF: 2,69

Á. Bacsadi, A. Papp, L. Szeredi, G. Tóth, C. Nemes, V. Imre, **Z. Tolnai**, Z. Széll, T. Sréter, Retrospective study on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs in Hungary, *Vet. Parasitol.* 220 (2016). doi:10.1016/j.vetpar.2016.03.001. IF: 2,356

Z. Széll, A. Bacsadi, L. Szeredi, C. Nemes, B. Fezer, E. Bakcsa, H. Kalla, **Z. Tolnai**, T. Sréter, Rapid spread and emergence of heartworm resulting from climate and climate-driven ecological changes in Hungary., *Vet. Parasitol.* 280 (2020) 109067. doi:10.1016/j.vetpar.2020. IF: 2,157

B. Dezsényi, Z. Dubóczki, T. Strausz, E. Csulak, V. Czoma, Z. Káposztás, M. Fehérvári, Á. Somorácz, A. Csilek, A. Oláh, K. Almási, A. Patonai, D. Görög, Z. Széll, **Z. Tolnai**, T. Sréter, J. Danka, H. Auer, B. Grüner, T.F.E. Barth, A. Casulli, Emerging human alveolar echinococcosis in Hungary (2003–2018): a retrospective case series analysis from a multi-centre study, *BMC Infect. Dis.* 21 (2021) 168. doi:10.1186/s12879-021-05859-5. IF: 2,688

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Intézetünk korábbi igazgatóinak, Prof. Dr. Mandl Józsefnek és Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak, amiért lehetővé tették, hogy a doktori munkámat az Orvosi Vegytani Intézetben végezhettem. Köszönöm Tanszékünk jelenlegi igazgatójának, Prof. Dr. Csala Miklósnak, hogy a PhD-képzést követően, támogatásával állást biztosított számomra a Molekuláris Biológiai Tanszéken.

Szeretném megköszönni Mészáros Tamásnak a sokévnnyi útmutatást, támogatást és tanítást. A problémák újabb és újabb irányból történő megközelítését és végül megoldását, valamint az ehhez szükséges kitartó hozzáállást az élet minden területére szeretném magammal vinni. Hálás vagyok a munkacsoporton belüli nyugodt és barátságos légkör kialakításáért. Köszönöm, hogy a kísérletek tervezésekor nem kellett az anyagi korlátok miatt aggódnom.

Köszönöm András Juditnak, Dr. Nagy Szilviának, Nagyné Dr. Scholz Évának és Dr. Szeitner Zsuzsannának a kezdeti labormunkában nyújtott segítséget. Köszönöm Gyurkovics Annának, hogy mindig mindenben számíthattam segítségére. Köszönöm Kállai Brigittának, Percze Krisztinának és Harkai Ákosnak a munkával kapcsolatos jótanácsaikat és biztatásukat. Köszönöm Mile Valériának, hogy ismét bizonyította, a rendelések terén nem ismer lehetlent.

Szeretném megköszönni Dr. Kovács-Nagy Rékának, hogy elvállalta PhD dolgozatom házbírálatának elkészítését. Köszönöm a hasznos észrevételeit, javaslatait és az értekezéssel végzett alapos munkáját.

Köszönöm a PhD Fokozatszerzési Ösztöndíj támogatást, mely az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 projekt keretében valósult meg.

Köszönöm szüleimnek támogatásukat, hogy mindig bíztak bennem. Köszönöm feleségemnek, Csillának szeretetét és támogatását, folyamatos biztatását, valamint a dolgozat szövegének gondos lektorálását. Köszönöm fiaimnak, Vilmosnak és Marcinak a sok játékot és vidámságot, melyek mindig új erővel töltöttek fel a dolgozat készítésekor.

12. Függelék

1. táblázat. 48 PBA-PCR-rel előállított proBNP specifikus aptamer szekvenciája

Oligo	Szekvencia
1	ATCCAGAGTGACGCAGCATAGATCACGGATCATAACCGATGTTACAGGCCTGAACGGTTGGACACGGTGGCTTAGT
2	ATCCAGAGTGACGCAGCAGCCCTATCGAATTTTAATGCTCCGGACCTTATCGTCAACCTTGGACACGGTGGCTTAGT
3	ATCCAGAGTGACGCAGCAGGGGATGGGCGTTTGTATGTTTCCTATAGACGAGGGAAGTGGACACGGTGGCTTAGT
14	ATCCAGAGTGACGCAGCAGACTGGGGCTTACGTCTGCGTTTATTTAATGCTCCATTGGACACGGTGGCTTAGT
15	ATCCAGAGTGACGCAGCATCAGCATCCTTTCGTAATAGTAGGGCAAACCGAAATCAGACTTGGACACGGTGGCTTAGT
16	ATCCAGAGTGACGCAGCATCAGCATCCTTTCGTAATAGTAGGGCAGAACCAGAATCAAACCTTGGACACGGTGGCTTAGT
18	ATCCAGAGTGACGCAGCAGACTGGGGCTTACGTCTGCGTTTATTTAATGCTCCATTGGACACGGTGGCTTAGT
19	ATCCAGAGTGACGCAGCAGCGCTTGGCACTTCTTAGTTGCTGGGGGGTAGGGGGTAATTGGACACGGTGGCTTAGT
20	ATCCAGAGTGACGCAGCACCGACGCAACTCCCGCTCCCCCATACGTTTCGGTAGATAGTGGACACGGTGGCTTAGT
32	ATCCAGAGTGACGCAGCAAGCATCGTAGTATCATTCTCCAATCACACACCTCTAACGGTGGACACGGTGGCTTAGT
33	ATCCAGAGTGACGCAGCATGTGCCTGTGGTCTAATGTCCGTTGTTGGCGACCGTCAGCTGGACACGGTGGCTTAGT
34	ATCCAGAGTGACGCAGCATGTGTTATTTTTTCTGTCTGTCTGTTACGCAACTTGCCTGGACACGGTGGCTTAGT
35	ATCCAGAGTGACGCAGCAATGGGCTAATCTCGGGGGTAATAAATGTATGCTGGTACGGTGGACACGGTGGCTTAGT
36	ATCCAGAGTGACGCAGCATTGTGTCAGGGGCTTATCAAAGGGTCCCAATAATTAAGAACATGGACACGGTGGCTTAGT
37	ATCCAGAGTGACGCAGCACGATATGCATCTCCGTTAGTTGACTTGTTTGTGGGGAATCTGGACACGGTGGCTTAGT
45	ATCCAGAGTGACGCAGCAATGAGGGTGGACGTTAATGGGCAGGGTTTTAAAGTGAGTTGGACACGGTGGCTTAGT
46	ATCCAGAGTGACGCAGCAAATTTGTCCGGTGAAGCAGCTATTTAGTTATAACGATGCTGGACACGGTGGCTTAGT
47	ATCCAGAGTGACGCAGCACGGTAGTGTACTTGCAATTTGTTGATTCCTCGAAGTAGGGTGGACACGGTGGCTTAGT
51	ATCCAGAGTGACGCAGCAACAATCATCTCATTACATCTCTTTTTCTTACCTCCAACATTGGACACGGTGGCTTAGT
52	ATCCAGAGTGACGCAGCATGCTGCCTATCTGTTTTGGGGATACCTATCTTCACTCTTTTGGACACGGTGGCTTAGT
53	ATCCAGAGTGACGCAGCAGGTAATACCCAATCCCGAGCCTTTCATCCCGCGGCAATTTGGACACGGTGGCTTAGT
63	ATCCAGAGTGACGCAGCAAAACCCGTCCAGTGAGGCCTGGTGTGTGACCTCGGTTATTTGGACACGGTGGCTTAGT
64	ATCCAGAGTGACGCAGCATGAGTCGGGCGAGACGGGGGGGGTCGGGTGGTGGTATCTTGGACACGGTGGCTTAGT
65	ATCCAGAGTGACGCAGCATTGTTCTATCCTTTACCTCTGCTTGGATTCTACGTCGTGTGGACACGGTGGCTTAGT
66	ATCCAGAGTGACGCAGCATCTCGTCGGGCTGCTGACTTTCGGCTTGCTTCTCCGACTTGGACACGGTGGCTTAGT
67	ATCCAGAGTGACGCAGCATGAGGGGGAGGCAACATGTGATCGGTCTTGGAGGTG

	GGTATGGACACGGTGGCTTAGT
68	ATCCAGAGTGACGCAGCATGCAGCCTGTATCTTGGTAACACTTTCGTTGGCTCTCT TGTGGACACGGTGGCTTAGT
77	ATCCAGAGTGACGCAGCACGCATACCCGCTGCAGGTCTTTTATACATTACCAACT AAATGGACACGGTGGCTTAGT
78	ATCCAGAGTGACGCAGCACCCAGCCACGCCAAGCCCCTTCTAACTGCTGTGAGCTC ATCTGGACACGGTGGCTTAGT
79	ATCCAGAGTGACGCAGCATGGGGCGGGGTAAGATTGGGCGGTAAGGGTCTGACG CCTGTGGACACGGTGGCTTAGT
80	ATCCAGAGTGACGCAGCACGACTTAAGGAGTCTATGGCCTTAATTTGTTACGTTTT CGATGGACACGGTGGCTTAGT
81	ATCCAGAGTGACGCAGCAGGGCTAGGTAACCGTAGAACTCGGGAATGATGACAT ATGGTGGACACGGTGGCTTAGT
82	ATCCAGAGTGACGCAGCATGCTACCCTTGTTCGGTGTCTTTAGAGTTGGTGCCGTTT AGTGGACACGGTGGCTTAGT
91	ATCCAGAGTGACGCAGCATGTTATTTTGGGAAAGGTATGGGGTTTTGTGCGGGTG GATTGGACACGGTGGCTTAGT
93	ATCCAGAGTGACGCAGCACCCCATCCGCTATTCCGATATGATTAATTGATCCATC GCATGGACACGGTGGCTTAGT
95	ATCCAGAGTGACGCAGCAGTGCAGTCGGGTTGTTAAGTACTTATGGGGTGAAGA GCGTGGACACGGTGGCTTAGT
96	ATCCAGAGTGACGCAGCATATTTCCCCTGAAGTCTGAGAAATCATCACCTTCGTT AAGTGGACACGGTGGCTTAGT
97	ATCCAGAGTGACGCAGCAGAGTCAGGGTGCGGTATCGGATCTCCTGTGCGGTTGT AGGTGGACACGGTGGCTTAGT
98	ATCCAGAGTGACGCAGCACGTAACTGACATCCTCATGCGTACGCTTGCACCAAT TTTTGGACACGGTGGCTTAGT
105	ATCCAGAGTGACGCAGCATTGGGTGAAATGATGGCGCGGGTAAAGAGACGGTAC ACAATGGACACGGTGGCTTAGT
108	ATCCAGAGTGACGCAGCATCCCGTCGTGTAACATTATTATTCCCAATCGTAACCT GCTGGACACGGTGGCTTAGT
110	ATCCAGAGTGACGCAGCACATCCCTTTACCGTTTTATTGCCGAGGAATATTACTCT CCTGGACACGGTGGCTTAGT
111	ATCCAGAGTGACGCAGCAGGGTAATGAATCGAACGCAGCTTTTAGCTTTTCTCAG GTTTGGACACGGTGGCTTAGT
112	ATCCAGAGTGACGCAGCAGTCCGTTTTCGGGGGTTCTAGGGTAGATTGTTGGGGT CGGTGGACACGGTGGCTTAGT
113	ATCCAGAGTGACGCAGCATGCCTAGCCATTTGCAATTCTGCCCTTCTCAGTTGTT CATGGACACGGTGGCTTAGT
124	ATCCAGAGTGACGCAGCATCACCAGCACCCCTTACAGCTAGTATATAGGAGGTTT ACATGGACACGGTGGCTTAGT
125	ATCCAGAGTGACGCAGCAAATGCCACGGTTAGCCCTTTTTCCCGATAGGAGCTCG GTTTGGACACGGTGGCTTAGT
126	ATCCAGAGTGACGCAGCATGGGCCGTGGGGGTTCTCGTCCTTGCCCGAAATAGTG GTTTGGACACGGTGGCTTAGT