

# Módszerfejlesztések diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelekciójához

Doktori tézisek

**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

## I. Bevezetés

Az aptamerek olyan mesterségesen előállított egyszálú oligonukleotidok, melyek az antitestekhez hasonló affinitással és szelektivitással képesek célmolekulájukhoz kapcsolódni. Ezen tulajdonságuknak köszönhetően receptormolekulaként való alkalmazásuk alternatívát nyújthat diagnosztikai rendszerek fejlesztéséhez, és 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 az aptamerek fejlesztéséhez és karakterizálásához szükséges egyedi és kevert DNS minták amplifikálása és az egyszálú oligonukleotidok laboratóriumi előállítása sokszor nehézségekbe ütközik. Továbbá az aptamerek nem megfelelő, azaz csak ideális körülmények között történő karakterizálásából adódó pontatlanságok gyakran gyakorlati jelentőséggel nem rendelkező aptamerek publikálásához vezettek, ami végső soron rontotta a beléjük vetett bizalmat.

Az elmúlt harminc évben számos módszerfejlesztés történt a SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) módszer egyes lépéseivel kapcsolatban, melynek köszönhetően célmolekulájukat nagyobb affinitással és szelektivitással kötő aptamerek jelentek meg. Az aptamerek kötőképességének javítása mellett kiemelt fontosságú a biostabilitás növelése, melyre a leghatékonyabb módszer a szérum mintában több nap után sem lebomló spiegelmer alkalmazása. Az L-konfigurációjú cukrokat tartalmazó spiegelmer 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.

A SELEX során az oligonukleotidok amplifikálásakor komoly problémát jelent a melléktermékképződés. A sikeres PCR reakció tervezésének egyik legfontosabb pontja a primer tapadási helyek gondos megválasztása, mellyel a melléktermék képződése elkerülhető. A primer 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 reakcióban 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.

A szelekcióban az egyes SELEX lépések közötti szűkített oligonukleotid könyvtárak regenerálása, a szelekció progressziójának ellenőrzése, valamint a SELEX végén az egyes aptamer jelöltek karakterizáláshoz szükséges oligonukleotidok laboratóriumi előállítására is PCR-t követő egyszálúsítási lépéssel történik. Egyszálúsítási technikákkal szemben elvárás, hogy nagytisztaságú ssDNS-t eredményezzenek minimális szekvencia-veszteség mellett. A leggyakrabban használt egyszálúsítási módszerek a duplaszálú DNS denaturációján és a komplementer szálak elválasztásán alapulnak. Méretkülönbség alapján történő egyszálúsításnál denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel elválaszthatók egymástól a PCR-ben módosított reverse primerekkel előállított, eltérő hosszúságú komplementer ssDNS szálak, azonban az eljárás időigényes és jelentős nukleinsav-veszteséggel jár, ezért használata nem terjedt el széleskörűen. A leggyakrabban használt egyszálúsítási módszer az alkalikus denaturáció, melynek alapja, hogy a biotinizált reverse primerrel előállított PCR terméket sztreptavidinnel borított mágneses gyöngyhöz kapcsolják, majd a nem biotinizált DNS-szálat NaOH-os denaturációval választják el az immobilizált komplementer száltól. Az eljárás során azonban 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, melynek során a felesleges DNS szálat a PCR-ben 5' végen foszforilált primer segítségével állítják elő. Az amplifikálást követően a PCR termékhez lambda exonukleáz enzimet adnak, mely nagy hatékonysággal emészteti a dsDNS 5' végen foszforilált szálát, azonban az eljárásnál - az

enzim nagyfokú szelektivitásának ellenére - az ssDNS részleges enzimatis lebontásával is számolni kell.

Az egyszálúsítási eljárások közül teoretikusan az aszimmetrikus PCR a legegyszerűbben és legköltséghatékonyabban kivitelezhető módszer. Az eltérő koncentrációban alkalmazott primerek következtében 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 működésének csökkent hatékonysága 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. 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.

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. Az akut miokardiális infarktus (AMI) és a szívelégtelenség felismerésében és az alkalmazandó kezelés meghatározásában kiemelt fontossággal bírnak a betegségre jellemző biomarkerek. Az AMI diagnosztizálásában, az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2018-ban kiadott, legfrissebb ajánlása szerint kulcsfontosságú a kardiális troponin szint vizsgálata. Az Európai Kardiológiai Társaság (ESC) ajánlása szerint a BNP 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. A kardiális troponin I (cTnI) fehérje kimutatására alkalmas diagnosztikai rendszerek létrehozása komoly kihívást jelent, hiszen az alkalmazott receptoroknak nagyfokú specificitással kell rendelkezniük, mivel

a vázizom eredetű troponin I (sTnI) fehérje nagymértékű homológiát mutat a szívizom eredetű izoformával. A receptorok fejlesztését tovább nehezíti, hogy a véráramba kerülő troponinok többsége (I-T-C) komplexben marad, így a TnC alegység részlegesen elfedi a cTnI fehérjét, valamint a konformációját is megváltoztatja a szabad cTnI fehérjéhez képest, ami a receptorok biomarker felismerését akadályozhatja. Receptorok előállításakor ezért különösen fontos az cTnI fehérje epitópok gondos megválasztása, ellenőrzésükkor szükséges a cTnI és Troponin (I-T-C) komplex kötő képességet egyaránt igazolni. Az aptamerek és spiegelmerok a magas célmolekula kötő affinitásuknak és magas szelektivitásuknak köszönhetően alkalmasak diagnosztikai rendszerekben való felhasználásra, a biomarkerek megbízható kimutatására alkalmas mérési rendszer létrehozásához szükséges az oligonukleotidok körültekintő karakterizálása.

## **II. 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 mintában 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 spiegelmerok karakterizálása biolayer interferometria módszerrel.

- cTnI specifikus spiegelmer pár ellenőrzése szendvicstípusú mérésben cTnI fehérje és troponin (I-T-C) komplex célmolekulákkal. Spiegelmerek szelektivitásának vizsgálata és a szérum mintában történő mérés ellenőrzése.

### **III. Módszerek**

#### **Célfehérjék előállítása**

A proBNP-t kódoló génszakaszt megszintetizáltattuk és *E. coli* expressziós rendszerben használható vektorba ligáltuk. A hexaHIS címkével rendelkező proBNP-t autoindukciós rendszerben állítottuk elő. A termeltetett fehérjét affinitás gyönggyel tisztítottuk, az előállított proBNP tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követő Coomassie-kék festéssel és Western blot módszerrel ellenőriztük, koncentrációját fluoriméter segítségével határoztuk meg.

A GST címkével ellátott cTnI, sTnI és proBNP fehérjék *in vitro* transzlációs rendszerben történő előállításához szükséges mRNS-t *in vitro* transzkripció reakcióval készítettük a laboratóriumunkban korábban előállított vektor konstrukciók segítségével. A fehérjék előállítását búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszerben végeztük. A transzlált fehérjék búzacsíra kivonatból történő tisztítását affinitás gyöngy használatával végeztük el. Az előállított fehérjék tisztaságát és mennyiségét SDS-PAGE-t követő Coomassie-kék festéssel és western blot módszerrel ellenőriztük.

#### **proBNP specifikus aptamerek szelektálása**

ProBNP specifikus aptamerek szelektálásakor a SELEX lépések során felváltva használtunk mágneses ágyhoz kapcsolt peptid és fehérje célmolekulát. Negatív szelektációs lépésben „üres” mágneses ágyat, míg a kontraszelektációs lépésben proBNP mentes plazmafehérjével és GST fehérjével kapcsolt mágneses ágyat használtunk. Az aptamer szelektáció 7 ciklusból állt, az 1-4. és 6. SELEX lépésben a proBNP 9 aminosav hosszúságú peptid szakaszára, az 5. és 7. ciklusban pedig az *in vitro* transzlációs rendszerben előállított GST címkével jelölt fehérjére történt a szelektáció. Az aptamerek célmolekulakötő-affinitását a szelektációs nyomás folyamatos fokozásával növeltük. Az utolsó szelektációs lépés végéről származó PCR terméket TOPO vektorba inszertáltuk, majd kompetens baktérium sejtekbe transzformáltuk, a kolónia-PCR termékeket

automatizált kapilláris elektroforézis készülékkel ellenőriztük, az inszertet tartalmazó kolónia-PCR termékek bázissorrendjét Sanger-szekvenálással határoztuk meg.

### **PBA-PCR ellenőrzése**

A primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) működését a klasszikus szimmetrikus PCR-rel és aszimmetrikus PCR-rel hasonlítottuk össze. A forward és reverse primer aránya a klasszikus PCR-nél 1:1, az aszimmetrikus PCR-nél és a PBA-PCR-nél 20:1 volt. A PBA-PCR-nél 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 PCR termékek ellenőrzését PAGE-vel történő elválasztással végeztük el. 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 sztreptavidinnel borított gyöngyökhöz kapcsoltuk, az egyszálú DNS-t tartalmazó felülúszót a gyöngyökről leszártuk és PAGE-én elválasztottuk.

A PBA-PCR optimalizálásakor az ideális primer arányok meghatározásához a forward primer mennyiségén nem változtattunk, míg a reverse és 3' blokkolt reverse primer arányát 1:9 és 1:99 között változtattuk. A PCR program optimális ciklusszámának meghatározásához 25, 35, 45, és 55 ciklusból álló PBA-PCR-t és hagyományos aszimmetrikus PCR-t állítottunk össze egyedi oligonukleotid vagy random DNS könyvtár templáttal. A PBA-PCR univerzális használhatóságának ellenőrzéséhez optimalizált beállításokkal mértünk össze 8 PCR reakciót, melyek templátjaként 4 egyedi és 4 random DNS könyvtár szekvencia szolgált, a PCR termékek ellenőrzését PAGE elválasztással végeztük el.

A teljes mértékben egyszálú DNS előállításához az optimalizált PBA-PCR-t 5' végen biotinilált és 3' végen blokkolt reverse primerekkel és 5' végen biotinilált reverse primerekkel állítottuk össze, majd a PCR termékét sztreptavidines paramágneses gyöngyökhöz kapcsoltuk. A gyöngyökhöz kapcsolódó blokkoló reverse primerről az ssDNS-t eltérő hőmérsékleteken eluáltuk, a felülúszót PAGE-vel történő elválasztással ellenőriztük.

A szekvencia diverzitás megőrzésének vizsgálatára optimalizált PBA-PCR-rel amplifikáltunk random DNS könyvtár templátot jelöletlen primerek felhasználásával. A PBA-PCR termékét új generációs szekvenálásra a Xenovea Kft-nek elküldtük.

Az egyszálúsítási módszerek összehasonlításához 4 aptamer jelöltet állítottunk elő szintetizált oligonukleotid templátokról optimalizált PBA-PCR-rel és lambda exonukleáz kezeléssel. Az előállított oligonukleotid fehérjekötő képességét *in vitro* translációs rendszerben készített, GST címkével ellátott proBNP-vel ellenőriztük AlphaLisa rendszerben. A biotinnal jelölt aptamereket sztreptavidinnel borított akceptor gyöngyökhöz, a fehérjéket pedig glutationos donor gyöngyökhöz kapcsoltuk.

A módszer nagy áteresztőképességű aptamer ellenőrzésben való alkalmazhatóságának vizsgálatához 48 biotinilált aptamer jelöltet állítottunk elő PBA-PCR segítségével. A reakciók templátjaként a SELEX végéről származó, szekvenálathoz készített kolónia PCR termékek szolgáltak. Az aptamerek ellenőrzését AlphaScreen módszerrel végeztük. A méréshez *E. coli* expressziós rendszerben előállított hexaHIS címkével jelölt proBNP-t használtunk. A biotinnal jelölt aptamereket sztreptavidinnel borított donor gyöngyökhöz, a fehérjéket pedig nikkelkelát akceptor gyöngyökhöz kapcsoltuk. A 6 legjobban működő aptamer jelölt célmolekula-kötő képességét komplex fehérje mintában is megvizsgáltuk.

A PBA-PCR alkalmazhatóságát az aptamer szelekció előrehaladtának ellenőrzésében is megvizsgáltuk. Ehhez a kiindulási DNS könyvtárat és az egyes SELEX ciklusok (1-7) PCR termékeit optimalizált PBA-PCR-rel amplifikáltuk. Az így előállított szűkített DNS könyvtárak célfehérjekötő-képességét AlphaScreen Histidine detection kit használatával ellenőriztük az előző bekezdésben leírtak alapján.

### **TnI specifikus spiegelmeres tesztelése**

Laboratóriumunkban korábban szelektált cTnI fehérje szelektív B10, A6, C6 és C6r (C6 jelölt primer régió nélküli rövid változata) spiegelmeres célmolekulakötő képességét biolayer interferometria módszerrel vizsgáltuk BLItz (FortéBio) készüléken.

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



spiegelmereket sztreptavidinnel borított donor és akceptor gyöngyökhöz rögzítettük. Célmolekulaként humán szívizomból származó troponin (I-T-C) komplexet vagy *in vitro* transzlációval előállított cTnI fehérjét használtunk. Kontrollként humán szívizomból származó és *in vitro* transzlációval előállított sTnI fehérjét használtunk. A szendvics párok alkalmazhatóságát szelekciós pufferben és hígított, cTnI-mentes szérumot tartalmazó mintában teszteltük.

## **IV. Eredmények**

### **Célfehérjék előállítása és proBNP specifikus aptamerek szelektálása**

Az SDS-PAGE-ét követő Coomassie-kék festés és western blot módszerek eredményei alapján megfelelő mennyiségben és minőségben sikerült előállítanunk és tisztítanunk a GST címkével jelölt proBNP-t, cTnI fehérjét és az sTnI fehérjét *in vitro* transzlációval, valamint a HexaHIS címkével ellátott proBNP-t *E. coli* expressziós rendszerrel.

A proBNP specifikus aptamerek szelekciója során alkalmazott 7 SELEX ciklus végén az amplifikálási lépések a várt 76 nukleotid hosszúságú terméket eredményezték, melléktermék-képződést egyik PCR során sem tapasztaltunk. Továbbá 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. A 96 megszekvenáltatott minta BioEdit programmal történő elemzése alapján 80 aptamer jelölt szekvenciájának meghatározása volt sikeres, mely közül 4 duplikátumként fordult elő.

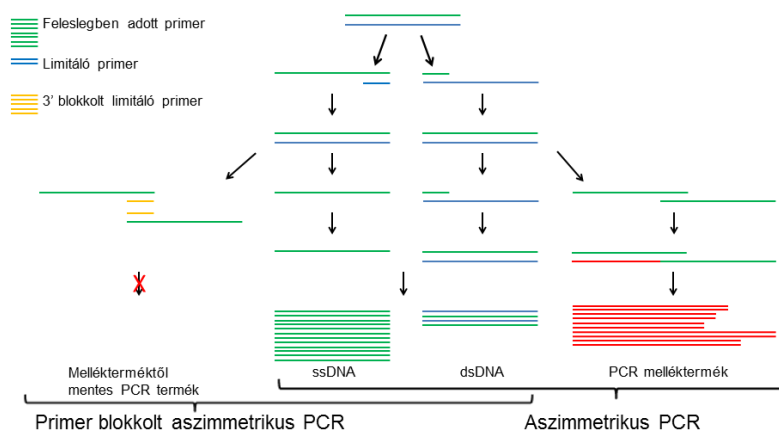
### **PBA-PCR ellenőrzése**

A PBA-PCR, a klasszikus szimmetrikus PCR és aszimmetrikus PCR terméke 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

keletkezésre utaló elmosódás a két termék között. A dsDNS-től elválasztott aszimmetrikus PCR és PBA-PCR termékek 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' végen blokkolt primerek miatt kialakuló részlegesen kétszálú terméknek köszönhető.

A PBA-PCR primer arányainak optimalizálásakor az 1:49-es és 1:99-es reverse : 3' blokkolt reverse primer arány mellett minimális mennyiségű dsDNS keletkezését tapasztaltuk, azonban ezekben a PCR reakciókban 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. A PCR ciklusszámának optimalizálásakor kapott összehasonlító eredmények alapján az aszimmetrikus PCR terméke, az összes vizsgált ciklusszám esetén kisebb mennyiségben tartalmazza a megfelelő méretű ssDNS-t a PBA-PCR termékéhez képest egyedi szekvencia és DNS könyvtár templát esetén egyaránt. Már a legalacsonyabb vizsgált ciklusszám nagymennyiségű melléktermék képződését eredményezte a hagyományos aszimmetrikus PCR-nél, a ciklusszám növelésével az eredeti hosszúságú termék fokozatos eltűnése és az aspecifikus termékek felhalmozódása volt megfigyelhető, melynek mértéke DNS könyvtár templát esetén még szembetűnőbbnek bizonyult. Ezzel szemben a PBA-PCR-ben alkalmazott blokkoló primerek, kevert szekvenciákat tartalmazó templát esetén is képesek voltak megakadályozni a melléktermék-képződést (1. ábra). A 45. PCR ciklusig a termékben szinte kizárólag a megfelelő méretű egyszálú termék keletkezése figyelhető meg PAGE vizsgálat alapján. Az optimális ciklusszám és primer arány meghatározását követően az ideális beállításokkal összemért reakció négy eltérő primer pár esetén is melléktermékektől mentes, nagymennyiségű ssDNS-t eredményezett egyedi és random DNS könyvtár templát amplifikálásakor egyaránt.

### Primer blokkolt és hagyományos aszimmetrikus PCR összehasonlítása



**1. ábra. A PBA-PCR és az aszimmetrikus PCR működésének összehasonlítása**

Az új generációs szekvenáltatás eredményei alapján a PBA-PCR nincs negatív hatással az amplifikált random DNS könyvtár diverzitására, a szekvenciák 99,8%-a csak egyszer fordult elő a szekvenáltatáskor leolvasott 203 795 DNS szakaszban.

A PBA-PCR terméke részben kétszálú, ugyanis az ssDNS-hez kapcsolódik a 3' blokkolt primer. A PBA-PCR termék limitáló primereken keresztül történő mátrixhoz kapcsolásával, majd egy egyszerű hődenaturációs lépéssel az ssDNS elválasztható a blokkoló primerektől és dsDNS-től. 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. 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.

### **PBA-PCR alkalmazhatósága**

A PBA-PCR használhatóságát az aptamerek szelekciójának ellenőrzése és az aptamer jelöltek karakterizálásának kapcsán vizsgáltuk AlphaScreen rendszerben.

A PBA-PCR-rel előállított aptamerek alkalmazhatóságát lambda exonukleáz kezeléssel készített aptamerekkel hasonlítottuk össze az AlphaScreen mérésben. A lambda exonukleáz emésztéssel előállított aptamerek magasabb lumineszcens jelet produkáltak a célmolekula jelenlétében, azonban 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.

A nagy áteresztőképességű aptamer ellenőrzésben való alkalmazhatóságához 48 biotinilált aptamer jelöltet állítottunk elő PBA-PCR-rel, melyhez az aptamer jelöltek szekvenálathoz készített kolónia PCR termékek szolgáltak templákként. Az aptamerek *-E. coli* expressziós rendszerben előállított, hexaHis címkével jelölt- proBNP kötő képességét AlphaScreen méréssel végeztük. 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. 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.

A PBA-PCR alkalmazhatóságát az aptamer szelekció előrehaladtának ellenőrzésében is megvizsgáltuk. A SELEX ciklusok végéről származó, 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 ciklusból származó egyszálú oligonukleotid könyvtárak eltérő hatékonysággal kötik a proBNP-t, a detektált jelek növekedése a nagy affinitással rendelkező aptamerek dúsulását jelzi.

### **TnI specifikus spiegelmeres tesztelése**

Biolayer interferometria méréseink alapján a laboratóriumunkban korábban szelektált cTnI fehérje szelektív B10-es, A6-os és C6-os spiegelmeres a troponin (I-T-C) komplexhez nagy affinitással kötődnek. A C6 spiegelmer  $\sim 2,95$  nM, az A6-os

spiegelmer  $\sim 4,90$  nM, a B10 oligonukleotid pedig  $\sim 5,61$  nM disszociációs állandóval rendelkezik. A célmolekula kötésében általában a spiegelmer primer régiói nem vesznek részt, ezért elterjedt post-SELEX módosításnak számít ezen DNS szakaszok utólagos eltávolítása. Eredményeink alapján azonban a legalacsonyabb Kd-val rendelkező C6- spiegelmer rövid változatának (C6r) cTnI-kötő képessége csökkent, a C6r spiegelmernél közel háromszor magasabb Kd értéket kaptunk az eredeti hosszúságú C6 spiegelmerhez képest.

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. Szívinfarktus esetén a felszabaduló kardiális troponin I fehérje szabad és troponin T és troponin C fehérjével alkotott hármas (I-T-C) komplex formában is megjelenik a keringésben, az optimális diagnosztikai rendszerek a fehérje mindkét formáját kimutatják. Eredményeink alapján a spiegelmer pár 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 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. 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.

Az alacsonyabb célmolekula-koncentráció kimutatása érdekében cTnI fehérje detektálásra alkalmas, spiegelmer alapú szendvics típusú mérést AlphaLisa rendszerben optimalizáltuk, melynek köszönhetően 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 szelekciós pufferben, mind a hígított szérumot tartalmazó pufferben. A mérésekhez használt, 10 nM sTnI fehérjével kiegészített negatív kontroll mintánál mindkét esetben háttérrel megegyező jelet detektáltunk.

## V. 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 az 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 szérum mintát tartalmazó oldatban is. Az antitest-alapú, nagyérzékenységű troponin tesztek cTnI kimutatási határa a bemutatott spiegelmeket használóénál több nagyságrenddel alacsonyabb, azonban a nagy érzékenység valószínűsíthetően a mérési rendszerek kiterjedt optimalizálásának köszönhető. Mindezek alapján a szelektált spiegelmek kiemelkedő célmolekula-kötő affinitásuknak, szelektivitásuknak és valós mintában való működésüknek köszönhetően ígéretes alternatívái lehetnek az cTnI diagnosztikában használt antitesteknek.

## **VI. Saját publikációk jegyzéke**

### **A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:**

**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

### **A dolgozat témájától független publikációk jegyzéke:**

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. Somorác, 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