Szívizom eredetű troponin I detektálása nukleázrezisztens oligomerekkel

Doktori értekezés

Szeitner Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Hegyesi Hargita, Ph.D. habil., egyetemi docens
Dr. Borsy Adrienn Éva, Ph.D., laboratóriumvezető

Szigorlati bizottság
elnöke: Dr. Varga Gábor, D.Sc., egyetemi tanár
tagjai: Dr. Egyed Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Osváth Szabolcs, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2018

I. Bevezetés

A középkorú és idősebb populációban a szív- és érrendszeri betegségek körébe tartozó akut miokardiális infarktus (AMI) szerte a világon vezető szerepet játszik a halálozásban. A túlélést és a gyógyulást biztosító korai ellátás előfeltétele a minél rövidebb időn belül felállított, pontos diagnózis, így az AMI modern laboratóriumi diagnosztikájában a kreatin-kináz, a laktát-dehidrogenáz-1 és az aszpartát-aminotranszferáz enzimek kinetikus mérését mára teljesen felváltotta a specifikus biomarkerek immunológiai módszerekkel történő meghatározása. A klinikumban jelenleg „arany-standard”-ként elfogadott szívmarkerek, a kardiális troponinok (cTn) nagy érzékenységgel detektálhatók a vérben. A hozzávetőlegesen 80 kDa molekulatömegű heterotrimer troponinkomplex I, T és C alegységből épül fel, melyek mindegyike eltérő tulajdonsággal és funkcióval bír. A komplex gátló alegysége a troponin I, a C alegység Ca^{2+}-kötő doménnel rendelkezik, míg a TnT a tropomiozinra horgonyozza a hármas komplexet. A troponin C csak kétféle izoformában van jelen a három eltérő harántcsíkolt izomtípusban. A felnőtt szívizomban és a lassú vázizomban azonos – a TNNC1 által kódolt – izoformák fejeződnek ki. Ezzel ellentétben a troponin I és troponin T három-három izoformáját a lassú vázizom, a gyors vázizom és a szívizom troponingének kódolják, így a kardiális TnI és TnT fehérjék fokozott kijutása a keringésbe a szívizom-károsodás szelektív indikátora.

Az elmúlt években bebizonyosodott, hogy rövid, egyszálú oligonukleotidok is képesek szelektíven, nagy affinitással célmolekuláikhoz kötődni, így megfelelő alternatívái lehetnek az antitesteknek. A nukleinsavak kémiai szerkezetüket tekintve nukleotid egységekből felépülő makromolekulák, amelyek a genetikai információ tárolása mellett, a fehérjeszintézisben, a transzláció és transzkripció szabályozásában is elengedhetetlen szerepet játszanak. Ma már ismert, hogy a nukleinsavak, annak ellenére, hogy felépítésükben kizárólag 4-féle nukleotid vesz

részt önszerveződésük révén stabil, de egyúttal dinamikus szerkezetek és szupramolekuláris komplexek kialakítására is képesek, és mind az RNS, mind a DNS nagy affinitással képes célmolekuláikhoz kötődni.

Az 1990-es években két kutatócsoport egymástól függetlenül ismerte fel annak a lehetőségét, hogy *in vitro* technikával szelektív egyszálú oligonukleotidok állíthatók elő. Tuerk és Gold a Gp43 T4 DNS polimerázhoz kapcsolódó RNS szekvencia nyolc nukleotid hosszúságú szakaszát randomizálva oligonukleotid könyvtárat hoztak létre, majd a SELEX-nek elnevezett (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) eljárással új, a polimerázhoz nagy affinitással kötődő RNS szekvenciákat azonosítottak. Szinte teljesen egy időben Ellington és Szostak random RNS könyvtárból kiindulva hasonló szelekciós módszer alkalmazásával olyan stabil szerkezettel rendelkező szekvenciákat azonosítottak, amelyek kis molekulájú szerves festékek szelektív megkötésére képesek. A szerzők a célmolekulához specifikusan kötődő oligonukleotidokra elsőként alkalmazták az aptus (latin) és meros (görög), illeszkedés, illetve részecske jelentésű szavakból származó aptamer elnevezést. Mivel a nukleinsavakhoz eredendően kötődő molekulákon kívül olyanokra is szelektálható aptamer, amelyek a természetben nem kerülnek kölcsönhatásba nukleinsavakkal, az elmúlt évek alatt már több száz célmolekulára, többek között szervetlen és szerves kismolekulákra, peptidekre, fehérjékre, szénhidrátokra, lipidekre és komplex ligandumokra, például vírusokra, sejtorganellumokra, baktériumokra és sejtekre is végeztek aptamer szelekciót. Az aptamerek szelekciójához és szintéziséhez az antitestekkel ellentétben nincs szükség állatok immunizálására és élő sejtek felhasználására, így elméletileg alacsony immunogenitású vagy akár toxikus molekulákra specifikus oligonukleotidok is előállíthatók. Mindezen túl a szelekció körülményei az aptamer későbbi felhasználásához igazítva szabadon megválaszthatók, ezzel is biztosítva a molekulák funkcionalitását és specifikus kötődését a ligandjukhoz. Az aptamerek *in vivo* alkalmazása az antitestekkel ellentétben nem generál immunválaszt, a megfelelő komplementer oligonukleotid

adásával pedig terápiás hatásuk akár fel is függeszthető. Szerkezetükből adódóan a nukleinsavak a fehérje molekuláknál hosszú távon stabilabbak, a fizikai-kémiai hatásoknak jobban ellenállnak és a denaturációt követően regenerálhatók, valamint különböző funkciós csoportokkal vagy jelölő molekulákkal irányítottan módosíthatóak. A nukleinsavak széleskörű alkalmazásának egyik fő korlátozó tényezője, hogy a biológiai mintákban gyakran előforduló endo- és exonukleázok hatására rövid idő alatt lebomolhatnak, emiatt az enzimatikus hasítással szemben ellenálló oligonukleotidok szintézise napjainkban kiemelkedő jelentőséggel bír.

Az aptamerek új generációjának megszületése során kulcsfontosságú volt annak felismerése, hogy az oligonukleotidokat alkotó cukrok kiralitáscentrumainak inverziójával a nukleázokkal szemben rezisztens molekulák hozhatók létre. Néhány évvel az első aptamer szelekciós kísérletek után Klussman és munkatársai olyan eljárást dolgoztak ki, amelynek segítségével a D-adenozinhoz specifikusan kötődő L-RNS molekulákat, úgynevezett Spiegelmereket sikerült szelektálniuk. Eredményeik szerint az előállított L konfigurációjú aptamer enantiomer párjához képest rendkívüli stabilitást mutatott humán szérumban. A fentiekben ismertetett előnyös tulajdonságaiknak köszönhetően a monoklonális antitestek alternatíváiként ezek a „kémiai antitestek” napjainkra ígéretes szintetikus molekulákká váltak. Jelenleg már több terápiás Spiegelmer a klinikai kísérletek fázisában van, azonban alkalmazásuk a diagnosztika területén még nem terjedt el.

II. Célkitűzések

Munkánk fő célkitűzése az volt, hogy az akut miokardiális infarktus laboratóriumi diagnosztikájában kiemelt fontosságú biomarkert, a kardiális troponin I-t szelektíven felismerő, nukleázrezisztens oligonukleotidokat azonosítsunk, valamint az alkalmazhatóságukat megvizsgáljuk komplex biológia közegben. PhD-munkám során megvalósítandó feladataim az alábbiak voltak:

1. a Spiegelmerek vizsgálatához szükséges két humán troponin I fehérje (sTnI és cTnI) előállítása búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszerrel;
2. a szelekció során felhasználni kívánt D-peptid szekvenciájának meghatározása;
3. random DNS oligonukleotid könyvtárból D-oligomerek szelekciója;
4. SELEX eljárással azonosított szekvenciák előszűrésére alkalmas, nagy áteresztő képességű, jelölésmentes módszer fejlesztése
5. kardiális troponin I szendvics típusú meghatározásra alkalmas eljárás kidolgozása;
6. a kiválasztott Spiegelmer gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata humán szérumban antitest helyettesítő molekulaként.

III. Módszerek

Fehérje előállítása *in vitro* transzlációval

Az irodalmi adatok alapján a teljes hosszúságú troponin I fehérje túltermeltetése bakteriális rendszerben igen alacsony hatásfokkal működik, ezért a célfehérjéket búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszerben állítottuk elő. A troponin I gének amplifikációját követően a GST-vel jelölt fehérjék termeltetésére alkalmas konstrukciókat ligálás independens klónozással hoztuk létre, majd *in vitro* transzkripciós reakcióval mRNS-t szintetizáltunk. A transzlációs reakció

kivitelezéséhez tápláló oldatot pipettáztunk a mikrotiter tálca egyik kamrájának aljára, ezután óvatosan alárétegeztük az mRNS és búzacsírakivonat elegyét. Az inkubációt követően a transzláció hatékonyságát SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük, amelynek során transzlációs mintákat poliakrilamid gélen választottunk el, végül Coomassie-kék festéssel tettük láthatóvá a fehérjéket. A GST-vel jelölt troponin I-fehérjék termelődését immunoblot-technikával is igazoltuk, melynek során az elválasztott fehérjéket PVDF membránra blottoltuk, majd a blokkolást követően az elsődleges antitesteket és a HRP-konjugált másodlagos antitesteket egy-egy órán át inkubáltuk a membránnal. A detektálást kemilumineszcens technikával végeztük.

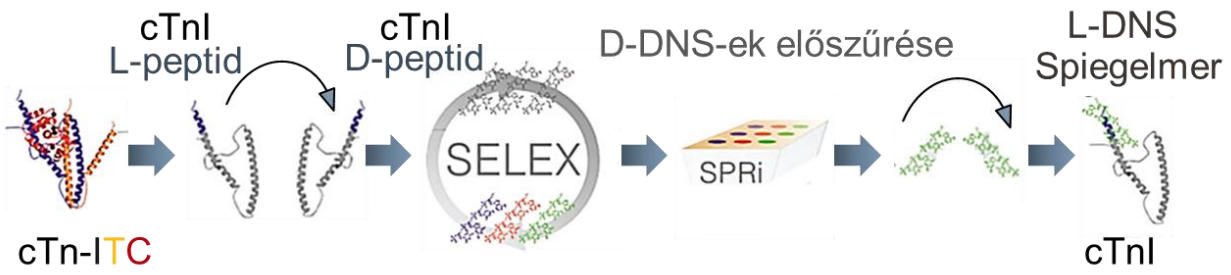
Spiegelmerek szelekciója

A Spiegelmerek szelekciója nem valósítható meg a konvencionális aptamerszelekciós módszer használatával, ugyanis az eljárás közben alkalmazott polimerázok nem képesek a tükörképi nukleotidok felismerésére. Emellett az utolsó szelekciós lépést követően a könyvtár szekvenálásához baktériumokba történő klónozásra és további amplifikálási lépésre van szükség. Mindezen okok miatt a szelekció során valójában nem a célmolekula, hanem annak tükörképi párja került felhasználásra (1. ábra). Munkánk első lépéseként egy 40 nukleotidnyi randomizált szakaszt tartalmazó DNS-könyvtárat terveztünk, amelyből a troponin I enantiomer párját reprezentáló D-peptidre specifikus aptamereket kívántunk szelektálni. Ezt követően a szelekcióhoz felhasználandó peptid szekvenciájának meghatározása érdekében elvégeztük a nagyfokú homológiát mutató szívizom és lassú vázizom eredetű troponin-szekvenciák összehasonlító elemzését. A cTnI fehérje N-terminálisa közelében elhelyezkedő, 9 aminosavból álló domén kiválasztását követően a megszintetizált D-peptidet paramágneses gyöngyhöz kapcsoltuk, amelyet a továbbiakban a szelekció során használtunk fel. Az aptamer könyvtárat elsőként peptid nélküli, ciszteinnel blokkolt gyönggyel 1 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük, majd a felülúszót leszívtuk, és a bromoacetiles

gyöngyhöz kapcsolt peptiddel további 1 órát termosztáltuk. Az inkubációs idő leteltével a gyengén vagy egyáltalán nem kötődött DNS-szekvenciákat PBS-oldattal történő mosással távolítottuk el. Ezt követően a gyöngyöket desztillált vízben felszuszpendáltuk és forralással eluáltuk a peptidhez specifikusan kötődő oligonukleotidokat. A Spiegelmerek enantiomerjeit tartalmazó felülúszót a továbbiakban a PCR-reakció összeállításához templátként használtuk fel. Az összesen 9 ciklusból álló Spiegelmer SELEX során a fehérje mennyiségét és az inkubálási időt fokozatosan csökkentettük, továbbá egyre intenzívebb mosással növeltük a szelektált oligonukleotidok affinitását. A klónozást követően Sanger-szekvenáltatással határoztuk meg az aptamerek randomizált szakaszának bázissorrendjét.

Spiegelmer-jelöltek kiválasztása és karakterizálása

A nagyszámú L-oligonukleotid szintézise magas költséggel jár, ezért a Műszaki Egyetem Analitikai Tanszékének kutatócsoportjával olyan eljárást fejlesztettünk ki, ami fordított megközelítést alkalmazva, a Spiegelmer-jelöltek szintézise nélkül a szekvenciák előszűrésére ad lehetőséget. A közbeiktatott lépés során az izolált D-oligonukleotid és a D-cTnI-peptid közti kölcsönhatás erősségét felületi plazmonrezonanciás képalkotó berendezéssel (SPRi) vizsgáltuk, melyhez az oligonukleotidokat PCR-rel amplifikáltuk fel. Az így nyert kétszálú, biotinilált DNS termékeket az eljárás egyszerűsítése érdekében a kicseppentés után közvetlenül az SPR-chip felületén NaOH-dal egyszálúsítottuk. További kísérleteinkkel azt kívántuk igazolni, hogy a szelektált D-oligonukleotidok és a D-peptid kölcsönhatásának vizsgálatakor megfigyelt tendenciák érvényesülnek a különböző Spiegelmerek és a fehérje kölcsönhatásánál is. A legtöbb kópiában előforduló és a szekvenciák előszűrésénél legígéretesebbnek bizonyuló szekvenciát megszintetizáltattuk L-nukleotidokból, majd az 5’ vég tiolcsoportján keresztül a szenzorchip arany felületére immobilizáltuk, és cTnI fehérjével vizsgáltuk a kölcsönhatás kinetikáját (1. ábra).



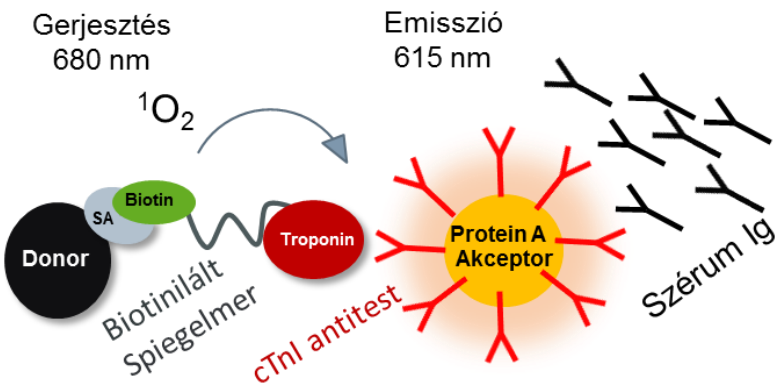
1. ábra: A Spiegelmer-szelekció sematikus ábrája

Spiegelmerek vizsgálata ALPHA-módszerrel

A leggyakrabban alkalmazott cTnI-diagnosztikai módszerek többsége a célfehérje két vagy akár több kötőhelyen történő felismerésen alapszik, mivel a receptorok ún. szendvics típusú elrendezésével jelentősen növelhető a mérés érzékenysége és a szelektivitása. Annak bizonyítására, hogy a Spiegelmer szendvics típusú rendszerben, egy másik receptor molekulával párban is felismeri a cTnI-t, homogén típusú mérési eljárást fejlesztettünk. A kölcsönhatás vizsgálatokat ALPHA (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) módszerrel kiviteleztük. Az eljárás alapját olyan polisztirol donor- és akceptor mikrogyöngyök adják, melyek a felületükre immobilizált molekulák kölcsönhatása következtében megfelelő közelségbe kerülnek. Nagy intenzitású, 680 nm hullámhosszúságú lézerfény hatására a donor gyöngyben található fényérzékeny molekula a környező oxigénmolekulákból gerjesztett állapotú, szingulett oxigén keletkezését váltja ki, amely az akceptor gyöngyben található 1,4-oxatiin származékkal lép reakcióba. A kémiai reakciók kaszkádja kemilumineszcenciához vezet, ami tovább aktiválja az ugyanabban a gyöngyben található antracén származékot. Ennek eredményeképp a végső fluorofórok a gerjesztő fénynél rövidebb hullámhosszú, 520-620 nm közötti fényt emittálnak.

A Spiegelmert a DNS-szál 5’-végéhez tetraetilén-glikol-távtartón keresztül kapcsolódó biotin módosítással szintetizáltattuk meg, míg második receptor

molekulaként a cTnI-fehérje 169-178 helyzetű epitópját felismerő monoklonális antitestet használtunk. Ennek megfelelően a méréshez sztreptavidin donor és Protein A-val borított akceptorgyöngyöket választottunk (2. ábra). A humán szérumban történő méréseket megelőzően az ellenanyagot elsőként az akceptor gyönggyel inkubáltuk, majd dimetil-pimelimidáttal hoztunk létre keresztkötést az antitest Fc-régiója és a Protein A molekulák közt.



2. ábra: Spiegelmerek funkcionalitásának vizsgálata komplex közegben ALPHA módszerrel

IV. Eredmények

cTnI specifikus Spiegelmerek szelekciója és a szekvenciák előszűrése

A szekvenálást követően a megegyező szekvenciák és a hasonló mintázatok azonosításához a szekvenciák többszörös összerendezését kellett elvégeznünk. A peptidre szelektált oligonukleotidok variábilis régióinak bázissorrendjét a ClustalX2 nevű szoftverrel összehasonlító analízisnek vetettük alá, melynek eredménye megerősítette bizonyos szekvenciák feldúsulását, hiszen a 85-ből 32 azonos nukleotidsorrenddel rendelkezett, 6 kettő, a többi pedig egy-egy kópiában fordult elő. Fordított megközelítést alkalmazva elsőként a D-peptid-ligand és a D-oligonukleotidok kölcsönhatását vizsgáltuk. Eredményeink szerint mindegyik

vizsgált oligonukleotid kötődött a D-peptid célmolekulához. A kolóniák közt legnagyobb számban előforduló oligonukleotid azonban csak a második legkisebb affinitással kapcsolódott ligandjához, alátámasztva azt az elméletet, miszerint a legalkalmasabb aptamerjelölt nem szükségszerűen a leggyakrabban reprezentált szekvenciával rendelkezik.

Spiegelmerek karakterizálása

A két legígéretesebb Spiegelmer K_D-je a nanomólos tartományba esett, ami a fehérje és a DNS közt kialakuló erős kölcsönhatásra utal. A disszociációs konstans számításakor a B10-es Spiegelmerre 3,5 nM-os, míg az A4-es Spiegelmerre 10,7 nM-os értéket állapítottunk meg, ami összhangban állt az előző vizsgálatunknál tett megfigyelésünkkel, a legnagyobb mértékben feldúsult oligonukleotidnak megfeleltethető Spiegelmer kisebb affinitással kötődött a cTnI fehérjéhez. A szelektált Spiegelmerek affinitásának jellemzését követően az oligomerek szelektivitását is megvizsgáltuk. A cTnI magas izoelektromos pontja (pI=10,31) következtében fiziológiás körülmények közt pozitív töltéssel bír, emiatt nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a molekulák természetéből adódóan negatívan töltött oligonukleotidok csupán az elektrosztatikus kölcsönhatások miatt kötődnek a fehérjéhez. Méréseinket ezért egy másik magas pI-vel rendelkező fehérjével, a lizozimmel (pI=11,35) is elvégeztük, ebben az esetben azonban nem detektáltunk kölcsönhatást. A szelektált Spiegelmerek szelektivitásának ellenőrzése céljából mérésünket vázizom eredetű troponin I-vel is megismételtük, ezek az eredményeink szintén igazolták, hogy a cTnI-nél detektált magasabb jel, nem az aspecifikus kölcsönhatás eredménye.

A szívizomsejtek nekrózisát követően a cTnI nem csak szabad állapotban, hanem a troponin T- és C- fehérjékkel alkotott komplex formájában is a keringés-be juthat, így az akut miokardiális infarktus esetén a troponin-komplexek detektálása is diagnosztikai értékkel bír. Méréseinket ezért az AACC (American

Association for Clinical Chemistry) által nemzetközi referencia mintaként javasolt, humán szívizomból tisztított I-T-C komplexszel is megismételtük. Az SPRi eredmények igazolták, hogy a szelektált Spiegelmerek a cTnI szabad és a hármaskomplex formáját egyaránt felismerik. Végül az SPRi chipet szárítás után 4 °C-on tároltuk, majd 6 hónap múlva ismét elvégeztük a mérést. A Spiegelmerrel módosított szenzorchipek több hónap elteltével sem vesztettek érzékenységükből, továbbá a többszöri, 20 mM-os NaOH-dal végzett regenerálási eljárással szemben is ellenállónak bizonyultak.

Spiegelmerek vizsgálata ALPHA-módszerrel

A mérés során a GST-címkével ellátott szív- illetve a vázizom troponin I-t tartalmazó *in vitro* transzlációs elegyeket különböző hígításban adtuk az ALPHA komponenseihez. A szívizom eredetű troponint tartalmazó elegyeknél mért magasabb jelintenzitás arra utalt, hogy az SPR-eredmények alapján kiválasztott B10-es Spiegelmer a búzacsírakivonat endogén fehérjéit tartalmazó, komplex mátrixban is képes a cTnI kimutatására. Annak érdekében, hogy meggyőződjünk az oligomer szelektivitásáról, *in vitro* transzlációval a jelölő molekulaként használt GST-t és GST-vel jelölt vázizom eredetű troponin I-t is előállítottuk, és ezekkel a transzlációs elegyekkel is megismételtük méréseinket. Mérésünk igazolta, hogy a transzlált cTnI-nél detektált magas ALPHA-jel nem a Spiegelmer aspecifikus kötődésének következménye. A búzacsíra-kivonat nem tekinthető ideális közegnek, több száz különféle endogén fehérjét tartalmaz, ezek alapján feltételeztük, hogy a Spiegelmer-antitest pár a hasonló komplexitású szérummintákban is alkalmazható lehet a troponin I detektálására. A homogén mérési rendszerekben fokozottan érvényesülő mátrixhatás miatt azonban szükségünk volt az eljárás további optimalizálására és az antitestek ALPHA-gyöngyökhöz történő immobilizálására. A troponin I humán szérumban történő mérésekor a jelintenzitás a telítési görbén a ng/ml-es koncentrációtartományában megfelelő linearitást mutatott. Annak a kér-

désnek a megválaszolására, hogy az optimalizált rendszerben a troponin I vázizom és szívizom eredetű izoformái is megkülönböztethetők-e, 50 ng/ml végkoncentrációban adtunk a troponinmentes szérumhoz humán sTnI fehérjét. A detektált fluoreszcens jel a háttérértékkel egyezett meg, ami a módszerünk nagyfokú szelektivitását igazolta.

V. Következtetések

Munkánk során az oligomerek diagnosztikai célú felhasználását szem előtt tartva humán cTnI fehérjére specifikus Spiegelmerek előállítását tűztük ki célul. Eredményeink alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

1. A megfelelő epitóp kiválasztásával humán fehérjéhez nagy affinitással kötődő nukleázrezisztens oligomerek hozhatók létre. Az eljárás sikerességét bizonyítja, hogy a Spiegelmerek a troponin I-monomert és a heterotrimer I-T-C-komplexet egyaránt felismerik. Az SPRi analízis alapján számított disszociációs konstansok értékei a nanomólos tartományba esnek, így a diagnosztikában jelenleg alkalmazott antitestekéhez hasonló affinitással rendelkeznek.

2. A laboratóriumunkban kidolgozott reverz módszerrel a szekvenciák előszűrése a nagyszámú L-oligomer költséges szintézise nélkül is megvalósítható. Eredményeink igazolták, hogy a szelekció során felhasznált D-peptid és a szelektált D-oligomerek kölcsönhatásának vizsgálata lehetőséget ad a legígéretesebb Spiegelmer jelöltek kiválasztására.

3. Eredményeink alapján megállapítható, hogy nem szükségszerűen a szelektált könyvtárban legtöbb kópiában előforduló oligomerek rendelkeznek a legnagyobb affinitással.

4. Az előállított szintetikus receptorok megfelelő szelektivitással rendelkeznek, mivel különbséget tudnak tenni a troponin I fehérjék közeli homológjai között, továbbá a troponinokhoz hasonlóan magas pI-vel rendelkező fehérjéhez, a lizozimhez sem kötődnek. A szelektált Spiegelmerek egyik előnyös tulajdonságaként kiemelhető, hogy komplex közegben is megőrzik szelektivitásukat, amit igazolnak a búzacsíra fehérjekivonatban, illetve vérszérumban kivitelezett méréseink.

5. A vizsgált Spiegelmer szendvics típusú rendszerben, egy másik felismerő molekulával párban is alkalmas a kardiális troponin I humán szérumból történő kimutatására, így receptorként szolgálhat a laboratóriumunkban fejlesztés alatt álló, teljesen Spiegelmer alapú cTnI kimutatási eljárásnak.

VI. Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

1. **Z. Szeitner**, G. Lautner, S.K. Nagy, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros. (2014) A rational approach for generating cardiac troponin I selective Spiegelmers. Chem Commun (Camb), 50: 6801–4. IF: 6,834
2. **Z. Szeitner**, A. Doleschall, M. Varga, K. Keltai, K. Révész, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros. (2017) Spiegelmers as potential receptors for cTnI diagnostics. Anal Methods, 9: 5091–5093. IF:1,9
3. **Z. Szeitner**, J. András, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros. (2014) Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. J Pharm Biomed Anal, 101: 58–65. (review) IF:2,979

A dolgozat témájától független publikációk jegyzéke:

1. K. Percze, Z. Szakács, É. Scholz, J. András, **Z. Szeitner**, C.H. van den Kieboom, G. Ferwerda, M.I. de Jonge, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros. (2017) Aptamers for respiratory syncytial virus detection. Sci Rep, 7: 42794 IF:4,259