# 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	5		
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

## Tartalomjegyzék

Rövidítés	sek je	gyzéke	4
1. Iroc	lalmi	i háttér	6
1.1.	Bev	ezetés	6
1.2.	Az a	aptamerek megjelenése	7
1.3.	Az a	aptamer-ligand kölcsönhatások molekuláris háttere	9
1.4.	Apt	amer-ligand kölcsönhatás vizsgálata	11
1.5.	Apt	amerek előállítása SELEX-technikával	12
1.5.	1.	Oligonukleotid könyvtárak tervezésének szempontjai	14
1.5.2	2.	Az aptamerek szelektivitásának növelése	15
1.5.	3.	Az aptamerek kémiai módosításának lehetőségei	16
1.5.4	4.	Spiegelmer-SELEX	19
1.6.	Az a	aptamerek alkalmazási területei	21
1.7.	Izor	nkontrakció a harántcsíkolt izmokban	25
1.8.	A tr	oponinkomplex	27
1.8.	1.	A troponin I szövetspecificitása	29
1.8.2	2.	A troponin I-fehérje funkcionális egységei	31
1.8.	3.	A troponin I-fehérje poszttranszlációs módosulásai	32
1.9.	Az a	akut miokardiális infarktus diagnosztikája	34
1.9.	1.	Troponinok az AMI diagnosztikájában	37
1.9.2	2.	Troponinok detektálási módszerei	38
2. Céll	kitűz	ések	44
3. Móo	dszer	ek	45
3.1.	Troj	ponin I-fehérjék előállítása	48
3.1.	1.	Troponin-gének amplifikációja	48
3.1.2	2.	Agaróz gélelektroforézis	49
3.1.3	3.	Vektorkonstrukciók létrehozása ligálásfüggetlen klónozással	50
3.1.4	4.	Kompetens sejtek transzformálása	51
3.1.	5.	Pozitív kolóniák kiválasztása és a plazmidok előkészítése	51
3.1.0	6.	mRNS előállítása in vitro transzkripcióval	52
3.1.2	7.	Fehérjék előállítása in vitro transzlációval	54
3.1.3	8.	Fehérjék detektálása Coomassie festéssel	55
3.1.9	9.	Fehérjék detektálása Western blot módszerrel	56

	3.2.	cTnl	I-specifikus Spiegelmerek szelekciója és vizsgálata	57
	3.2	2.1.	A D-peptid kovalens kapcsolása	57
	3.2.2.		Spiegelmerek szelekciója	58
	3.2	2.3.	D-oligomerek amplifikálása	61
3.2.4.		2.4.	Antitest konjugálása Protein A akceptor gyöngyhöz	62
	3.2	2.5.	ALPHA-mérések	62
4.	Er	redmén	nyek	64
4	4.1.	Vek	torkonstrukciók létrehozása ligálásfüggetlen klónozással	64
4	4.2.	mRN	NS előállítása in vitro transzkripcióval	66
4	4.3.	Trop	ooninfehérjék termeltetése és analízise	67
4	4.4.	Az e	ljárás során felhasznált D-peptid szekvenciájának meghatározása	68
4	4.5.	cTnl	l specifikus Spiegelmerek szelekciója	70
4	4.6.	Olig	omerek vizsgálata képalkotó felületi plazmonrezonanciával	72
	4.6	6.1.	Szelektált oligonukleotidok vizsgálata D-peptiddel	72
	4.6	6.2.	Spiegelmerek karakterizálása	74
4	4.7.	Spie	gelmerek vizsgálata ALPHA-módszerrel	77
	4.7	7.1.	ALPHAScreen mérések in vitro transzlációval előállított fehérjékkel	77
	4.7	7.2.	ALPHAScreen és ALPHALisa gyöngyök összehasonlítása	80
	4.7	7.3.	ALPHALisa reakcióelegy optimalizálása	82
	4.7	7.4.	ALPHALisa-mérések humán szérumban	82
5.	Μ	egbesz	élés	86
	5.1.	cTnl	l specifikus Spiegelmerek szelekciója	86
	5.2.	Spie	gelmer-jelöltek kiválasztása és karakterizálása	88
	5.3.	Trop	oonin I detektálása szendvics típusú rendszerben	91
6.	Kö	övetkez	ztetések	94
7.	Ös	sszefog	lalás	95
8.	Summary			
9.	Irodalomjegyzék			
10.	. Saját publikációk jegyzéke			
11.	l. Köszönetnyilvánítás			
12	2. Függelék			

## Rövidítések jegyzéke

DNS	dezoxi-ribonukleinsav
6xHis	6 db hisztidint tartalmazó címke
ACS	akut koronária szindróma
Ad	D-alanin
Ala	alanin
ALP	alkalikus foszfatáz
ALPHA	"Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay"
AMI	akut miokardiális infarktus
ATP	adenozin-trifoszfát
BP	bázispár
BSA	marha szérumalbumin
Cd	D-cisztein
cDNS	komplementer DNS
СК	kreatin kináz
cps	"counts per second"
CRP	C-reaktív protein
cTnI	kardiális troponin I
CV	variációs koefficiens
dCTP	dezoxicitozin-trifoszfát
dGTP	dezoxiguanozin-trifoszfát
DMP	dimetil-pimelimidát
dNTP	dezoxinukleozid-trifoszfát
Ed	D-glutamin
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EKG	elektrokardiogram
ELISA	"Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Felügyelet
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FRET	Förster-féle rezonáns energiaátadás
fsTnI	gyors vázizom eredetű troponin I
Glu	glutamin
GST	glutation-S-transzferáz
HA protein	hemagglutinin protein
Hd	D-hisztidin
His	hisztidin
HRP	tormaperoxidáz
HS-TEG	(11-merkaptoundecil)tetraetilén-glikol
kbp	kilobázispár
K <sub>D</sub>	disszociációs konstans
Kd	D-lizin

kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LNA	zárt nukleinsav (locked nucleic acid)
LOD	kimutatás határa (limit of detection)
Lys	lizin
mA	miliAmper
mRNS	hírvivő RNS
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	foszfátpufferes sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
Pd	D-prolin
PEG	polietilén-glikol
РКА	protein-kináz A
POC	point of care
Pro	prolin
PSMA	prosztataspecifikus membránantigén
PVDF	poli(vinilidén-fluorid)
R	arginin
RIA	"radioimmunoassay"
RNS	ribonukleinsav
rpm	fordulatszám/perc
S	szerin
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
siRNS	kis interferáló RNS
SPR	felületi plazmonrezonancia
SPRi	képalkotó felületi plazmonrezonancia
ssTnI	lassú vázizom eredetű troponin I
sTnI	vázizom eredetű troponin I
Td	D-threonin
TEG	tetraetilén-glikol
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
Thr	threonin
TnC	troponin C
TnI	troponin I
TnT	troponin T
Tris	tris-(hidroximetil)-amino-metán
Tyr	tirozin
U	Unit
WHO	Egészségügyi Világszervezet
Yd	D-tirozin

### 1. Irodalmi háttér

#### 1.1. Bevezetés

A nukleinsavak kémiai szerkezetüket tekintve nukleotidegységekből felépülő makromolekulák, amelyek a genetikai információ tárolása mellett a fehérjeszintézisben, a transzláció és transzkripció szabályozásában is elengedhetetlen szerepet játszanak. Képviselőik a dezoxiribonukleinsavak (DNS) és a ribonukleinsavak (RNS). Szerkezetük és funkciójuk megismerése mérföldkövet jelentett a molekuláris biológia történetében és nagymértékben hozzájárult a sejtekben végbemenő folyamatok megértéséhez. 1967ben, a DNS kettőshélix struktúrájának azonosítását követően Francis Crick megalkotta centrális dogma néven híressé vált elméletét, miszerint a biopolimerek, azaz a DNS, az RNS és a fehérjék közötti információ néhány kivételtől eltekintve egy irányba áramlik. Annak ellenére, hogy a modell túlságosan egyszerűsített képet adott a makromolekulák közti kölcsönhatásokról, számos fontos kísérlet kiindulási alapjául szolgált. A XX. század második felében megismertük a riboszómális RNS-ek és a transzfer RNS-ek szerepét, valamint a transzkripció és a transzláció mechanizmusainak alapjait is. Ezek az eredmények szintén alátámasztották, hogy a nukleinsavak az öröklődő biológiai információ tárolásában és fehérjékké történő kifejezésében egyaránt kulcsszerepet töltenek be. A genetikai kód megfejtése után a genom fehérjét kódoló szakaszainak feltérképezése mellett egyre nagyobb figyelem irányult a makromolekulák szerkezetének és kölcsönhatásainak vizsgálata felé is. A tudomány történetében fontos előrelépést jelentett a katalitikus hatású RNS molekulák – úgynevezett ribozimekfelfedezése, ami elvezetett ahhoz a felismeréshez, hogy a nukleinsavak szerepe nem korlátozódik csupán a genetikai információ átadására, hanem az élő sejtekben és laboratóriumi körülmények közt egyaránt változatos funkciókkal rendelkezhetnek [1, 2]. Ma már ismert, hogy a nukleinsavak – annak ellenére, hogy felépítésükben kizárólag négyféle nukleotid vesz részt, önszerveződésük révén stabil, de egyúttal dinamikus szerkezetek és szupramolekuláris komplexek kialakítására is képesek, továbbá az RNS és a DNS is képes nagy affinitással célmolekuláihoz kötődni. A nukleinsavak ezen képessége és viszonylagosan egyszerűen kivitelezhető in vitro evolúciója egy olyan

tudományterület létrejöttéhez vezetett, melynek eredményei napjainkra a terápiás és diagnosztikai eljárásokban egyaránt megjelentek.

#### 1.2. Az aptamerek megjelenése

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. A Science folyóiratban bemutatott kísérletük során a nitrocellulóz membránon rögzített polimerázt a teljes random RNS-könyvtárral kölcsönhatásba hozták, majd ezt követően a kialakult fehérje-RNS komplex oligonukleotidjait amplifikálták. Az inkubációs és amplifikációs lépések többszöri ismétlése után az eredeti, kiindulási szekvencia mellett egy másik – négy nukleotidban eltérő – Gp43specifikus oligonukleotidot azonosítottak, mely az eredeti RNS-hez hasonló K<sub>D</sub> értékkel kötődött fehérjepartneréhez [3].Ezzel szinte egyidejűleg 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 és meros, illeszkedés, illetve részecske jelentésű görög szavakból alkotott aptamer elnevezést [4]. Később ugyanez a szerzőpáros egy másik publikációjában azt is igazolta, hogy nem csak RNS-molekulák képesek célmolekuláikhoz nagy affinitással kötődni, hanem egyszálú DNS is funkcionálhat aptamerként. A random DNS-könyvtárból szelektált, szerves festékeket felismerő aptamereket vizsgálva megállapították, hogy a célmolekula-DNS közti kölcsönhatás szekvencia- és ligandspecifikus, valamint kialakulása a DNS hajtogatódásától függ [5].

Mindkét csoport munkájának jelentősége abban rejlik, hogy a kutatók felismerték módszerük általános alkalmazhatóságát, így fontos kiindulási pontjául szolgáltak a nukleinsavak *in vitro* evolúciójához kapcsolódó kombinatorikus kémiai

kutatásoknak. Az első RNS-aptamerek szelektálása óta a terület óriási fejlődésen ment keresztül, amit jól demonstrál a témához kapcsolódó publikációk számának folyamatos növekedése is. 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 [6]. 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 [7]. Mindezen túl a szelekció körülményei az aptamer későbbi felhasználásához igazítva szabadon megválaszthatók, ezzel is biztosítva a molekulák funkcionalitását és a ligandjukhoz történő specifikus kötődését.

Az in vitro szelekció további előnye, hogy az eljárás akár automatizálható is, így nagyszámú célmolekulára is rövid időn belül kivitelezhető [8]. Nem elhanyagolható szempont a szelektált aptamerek szekvenciájának pontos ismerete sem, aminek köszönhetően az oligonukleotidok jól reprodukálható kémiai szintézissel tiszta formában előállíthatók. Az aptamerek egyszerűbb szerkezetük és kis méretük ellenére is az antitestekével összevethető affinitással kötődnek célmolekuláikhoz, disszociációs konstansuk általában a μM-nM-os tartományba esik, de ismertek pM-os K<sub>D</sub>-vel rendelkező aptamerek is [9]. Emellett szerkezetükből adódóan a nukleinsavak a fehérjemolekuláknál hosszú távon stabilabbak, a fizikai-kémiai hatásoknak jobban ellenállnak és a denaturációt követően regenerálhatók, valamint különböző funkciós csoportokkal vagy jelölő molekulákkal irányítottan módosíthatóak. A fentiekben ismertetett kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően a monoklonális antitestek váltak, és az orvosi diagnosztikai, terápiás felhasználásukon kívül már számos területen bizonyították alkalmazhatóságukat.

#### 1.3. Az aptamer-ligand kölcsönhatások molekuláris háttere

Az aptamerek jellegzetes szerkezeti elemei közt a hélixeken kívül egyéb motívumok is megtalálhatók. A leggyakrabban előforduló hajtűstruktúrán kívül ide sorolhatók még a G-kvartettek és a pszeudocsomók is, amelyek kialakításában a Watson-Crick bázispárosodáson kívül nem-kanonikus – például Hoogsteen vagy reverz Hoogsteen – bázispárosodások is részt vehetnek (1. ábra). A hajtűkanyarok egy vagy több egyszálú hurokból és az ezeket összekötő kettősszálú szárrészből állnak. A pszeudocsomók egy hajtűszerkezet hurokrésze és a hajtűtől jobbra és balra elhelyezkedő szekvenciák közötti komplementaritás révén alakulhatnak ki. A guanozinban gazdag szekvenciákra jellemző négyszálú struktúrákban, az úgynevezett. quadruplexekben pedig négy guanin egy G-kvartettet hoz létre, amelyben egy guanin másik két szomszédos guaninnal hidrogénhíd kötéseket alakít ki. Általában kettő-három G-kvartettből quadruplex szerkezet jön létre, amelynek stabilizálásában koordinatívan kötött fémionok – jellemzően kálium- vagy nátriumionok – vesznek részt a guaninok karbonilcsoportjainak a kvartett középpontja felé történő koordinálása révén [10, 11].



ábra: Aptamerek hajtogatódása során kialakuló jellegzetes szerkezetek.
(A) Hajtű, (B) Pszeudo-csomó, (C) G- quadruplex [12]

Az aptamerek és célmolekuláik közti kölcsönhatás kialakításában az elektrosztatikus vonzóerők kiemelt szerepet játszanak. Több aptamerrel kapcsolatban igazolódott, hogy a negatívan töltött cukor-foszfátváz a célmolekula pozitív töltésű részéhez kötődik. Példaként említhető a Toggle-25t RNS-aptamer, amely a trombin argininben gazdag felszínéhez kapcsolódik [13], míg a P16 peptid-aptamer komplex esetében a foszfátcsoportok lizin aminosavakhoz történő kapcsolódását figyelték meg a

kutatók [14]. Az elektrosztatikus erőkön kívül a stabil szerkezet kialakítását további kölcsönhatások, úgymint a van der Waals-erők, a hidrogénhidak és az aromás gyűrűk közötti tapadás ("stacking" kölcsönhatás), illetve ezek kombinációja is elősegíti.

Az aptamer-ligand komplexek kialakulásának pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, az eredmények többsége azonban arra utal, hogy a kölcsönhatás kialakulása a kulcs-zár típusú dokkolás helyett valószínűsíthetően az indukált illeszkedés mechanizmusa szerint történik. Az utóbbi hipotézis alapján a nukleinsavak a célmolekula kötésekor adaptív konformáció-változással nyerik el végleges szerkezetüket. Reiter és munkatársainak eredményei szerint az indukált illeszkedésen kívül a nagy affinitású kölcsönhatások kialakításához a szabad aptamerek megfelelő hajtogatódása is hozzájárulhat [15]. A kutatók NMR-vizsgálatokkal igazolták, hogy a szabad anti-NF-κB RNS aptamerre jellemző szerkezeti sajátosságok, például a nem kanonikus bázispárosodások és a belső hurok bázisai közti átfedések a fehérjével alkotott komplex esetén is megfigyelhetők. Ugyanakkor a fehérje kötődése jelentősen megváltoztatja a GUAA négyes hurok szerkezetét, ami arra utal, hogy a látszólag stabil hurok dinamikus és mobilis fehérjefelismerő egységként funkcionál (2. ábra).



2. ábra: Az anti-NF-κB RNS-aptamer NF-κB p50 dimerrel alkotott komplexének szerkezete. (A) A 29 nukleotid hosszúságú anti-NF-κB RNS-aptamer feltételezett másodlagos szerkezete oldatokban. A kanonikus Watson–Crick RNSbázispárokat piros, a belső hurok 5'-régióját cián, a lötyögő bázispárt zöld, a GNRAtípusú négyes hurkot szürke, míg a belső hurok 3'-régióját kék szín jelöli. (B) Kristályszerkezet alapján meghatározott RNS-aptamer szerkezet. (C) NF-κB p50 – RNS-aptamerkristály komplex szerkezete. A p50 két alegységét narancs és sárga szín jelöli [15]

#### 1.4. Aptamer-ligand kölcsönhatás vizsgálata

Az aptamer-szelekciót követően az egyik legnehezebb feladatot a legnagyobb affinitású szekvenciák kiválasztása jelenti a nagyszámú aptamerjelölt közül. A biomolekuláris kölcsönhatások erősségét jellemző K<sub>D</sub>-érték meghatározására alkalmas analitikai technikák egy része a szabad aptamer és az aptamer-protein komplex méretkülönbség alapján történő elválasztásán alapszik. Ide sorolható többek közt a dialízis, ultraszűrés, vagy akár a nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia is [16]. Ezeknek az eljárásoknak az áteresztőképessége limitált, így több aptamer-szekvencia egyidejű tesztelése esetén az elválasztást nem igénylő módszerek, mint például a fluoreszcencia-intenzitás és anizotrópia, izotermikus titrálási kalorimetria és a felületi plazmon-rezonancia eredményesebbek lehetnek [17–19]. A jelölésmentes technikák közé tartozó felületi plazmonrezonancia (SPR) mérésével a szenzor felületére immobilizált aptamerhez kötődő fehérje mennyisége valós időben mérhető. Ennek köszönhetően a technikával nem csak egyensúlyi állapotról nyerhető információ, hanem az asszociációs és disszociációs sebességi állandók is meghatározhatók [20].

A biológiai kölcsönhatások mérésére általánosan alkalmazott, laboratóriumunkban is használt homogén méréstechnika alapjait Ullmann dolgozta ki A rendkívül érzékeny 1994-ben [21]. eljárás nagy jelerősítésű, homogén, távolságmodulált lumineszcencia assay (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) ALPHAScreen néven terjedt el a gyakorlatban [22]. A kölcsönhatás vizsgálatát egy polisztirol donor- és akceptor mikrogyöngy teszi lehetővé, melyek a felületükre immobilizált molekulák kölcsönhatása következtében megfelelő közelségbe kerülnek. Nagy intenzitású, 680 nm hullámhosszúságú lézerfény hatására a donor gyöngyben található fényérzékeny molekula (általában valamilyen ftalocianin származék) 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. Annak köszönhetően, hogy a gerjesztő fény hullámhossza nagyobb, mint a detektálási hullámhossz, a technika az alacsony háttérfluoreszcencia miatt rendkívül érzékeny detektálást tesz lehetővé. A módszer

további előnye, hogy az oxigénmolekulák szingulett állapotuk élettartama alatt akár 200 nm-t is megtehetnek diffúzióval az oldatban. Ez sokkal nagyobb távolságot megenged a kölcsönható molekulák számára, mint például a FRET technika. Az eljárással változatos molekulatípusok között fellépő kölcsönhatások tanulmányozhatók, a módszer ugyanis sikeresnek bizonyult többek között fehérje–fehérje, és fehérje–RNS kölcsönhatások vizsgálata estén is [23–25]. Dausse és munkatársai eredményei pedig bizonyították, hogy az általuk kidolgozott, ALPHA technológián alapuló HAPIscreen (High throughput APtamer Identification screen) módszerrel az RNS-oligomerek és hajtűstruktúrával rendelkező RNS-ligandjaik közti interakció is hatékonyan detektálható [26]. Az ALPHA-eljárás általános alkalmazhatóságát munkacsoportunk eredményei is megerősítették, melyek szerint az ALPHA-módszerrel meghatározott K<sub>D</sub>-értékek az SPR-es mérések alapján kalkulált értékekkel jó egyezést mutatnak [27].

#### 1.5. Aptamerek előállítása SELEX-technikával

Az aptamer-szelekció folyamata valójában Darwin evolúciós elméletének molekuláris szinten történő alkalmazásán alapszik, amelynek során a mintegy 10<sup>14</sup>-10<sup>16</sup> szekvenciát tartalmazó random oligonukleotid könyvtárból kerülnek eltérő kiválogatásra a ligandot legnagyobb affinitással kötő molekulák. A kémiai szintézissel létrehozott kiindulási könyvtárat alkotó oligonukleotidoknál alapesetben egy randomizált régiót két olyan primerkötő szakasz fog közre, amelyek a szelekció során a szekvenciák amplifikációját teszik lehetővé. A klasszikus SELEX során a szelekciót megelőzően a célmolekulát szilárd hordozóhoz rögzítik, majd így hozzák kapcsolatba az oligonukleotid könyvtárral. Elméletileg a kiindulási könyvtárban minden szekvencia csak egy példányban van jelen, ezért az első lépés rendkívül kritikus a szelekció sikerességének szempontjából. Az aspecifikusan kötődő oligomerek eltávolítása után a ligandhoz kapcsolódó nukleotidok amplifikációja polimeráz-láncreakcióval történik, amelyet DNS-aptamerek esetében a duplaszálú DNS egyszálúsítása követ, míg az RNSaptamer szelekciója során a PCR után nyert kétszálú termék az in vitro transzkripciós reakcióban templátként alkalmazható. Az így előállított molekulák a SELEX következő szakaszában használhatók fel. A szelekciós nyomás a ciklusok során az intenzív mosási lépések közbeiktatásán túl az inkubálási idő és a ligand mennyiségének csökkentésével

is fokozható, aminek hatására az oligonukleotid könyvtárban várhatóan 8-15 ciklus után a legnagyobb affinitású molekulák dúsulnak fel. Az eljárás végén az egyes aptamer jelöltek bázissorrendje klónozás után szekvenáltatással határozható meg (3. ábra).



3. ábra: Az aptamer-szelekció főbb lépései [28]

Az elmúlt néhány évben a fejlesztéseknek köszönhetően az új generációs szekvenálási eljárások széles körben elérhetővé váltak, ennek megfelelően az aptamerkutatás területén is igyekeznek kihasználni az új technikák adta lehetőségeket. Nagy előnyük a hagyományos szekvenáláshoz képest, hogy a szelektált könyvtár szekvenciáinak meghatározása céljából nem szükséges a munkaigényes klónozási lépést elvégezni és akár a könyvtár összetételének dinamikus változása is nyomon követhető szelekció közben [28]. A szekvenciák meghatározását jellemzően az egyes oligomerek karakterizálása követi, azonban az alkalmazott módszerek rendszerint idő- és munkaigényesek, valamint a nagyszámú aptamerjelölt kémiai szintézise jelentős költséggel járhat. Ennek hatására a gyakorlatban korábban széles körben elterjedt volt az a megközelítés, miszerint a szelekciós ciklusokat addig ismétlik, míg a feldúsított könyvtárban már csak néhány szekvencia dominál. Ez a szemléletmód azonban figyelmen kívül hagyja, hogy a SELEX során kétféle szelekciós nyomás hatására dúsulnak fel az egyes oligonukleotidok; egyrészt szelektálódnak a célmolekulákhoz való affinitásuk, másrészt pedig az amplifikációs hatékonyságuk alapján. Ezzel összhangban, az évek során elvégzett nagyszámú aptamer-szelekciós kísérlet eredménye igazolta, hogy a célmolekulához legnagyobb affinitással kötődő aptamerek nem feltétlenül a SELEX végére feldúsult, legnagyobb kópiaszámban előforduló szekvenciával rendelkeznek [29]. Ennek a felismerésnek köszönhetően mára már megjelentek azok a SELEX-változatok is, amelyeknél minimálisra csökkentették a ciklusok számát, sőt akár amplifikációs lépés nélkül végezték el a szelekciót [30, 31].

#### 1.5.1. Oligonukleotid könyvtárak tervezésének szempontjai

A SELEX-módszer elterjedését követően a kutatók számos alternatív megoldást dolgoztak ki annak érdekében, hogy tovább egyszerűsítsék a viszonylag munkaigényes eljárást, ugyanakkor fejlesztéseikkel igyekeztek a módszer hatékonyságát is növelni. A megfelelő affinitású és specifikus aptamerek szelekciója érdekében már a kiindulási könyvtár tervezésekor is érdemes több szempontot figyelembe venni. Különösen fontos lépés a randomizált szakasz optimális hosszának meghatározása, mivel a rövidebb könyvtárak előállítása gazdaságosabb és a rövidebb aptamerek a későbbi alkalmazások szempontjából is ideálisabbak lehetnek. Az évek során több aptamer esetében beigazolódott, hogy a célmolekulák felismeréséhez nincs szükség teljes hosszúságú oligonukleotidra. Például a 60 nukleotidnyi random részt tartalmazó, 96 nukleotid hosszúságú trombinaptamert mintegy 15 nukleotidból álló funkcionális szakaszra sikerült lerövidíteni [32]. A rövid randomizált szakaszt tartalmazó könyvtárak használata azonban nagymértékben limitálhatja a változatos szerkezetek kialakulásának lehetőségét, míg a hosszabb variábilis szekvencia nagyobb komplexitást ad a könyvtáraknak, és nagy affinitású aptamerek szelekciójához járulhat hozzá. Kompromisszumos megoldásként a gyakorlatban leginkább a 30-40 nukleotid hosszúságú random részt tartalmazó oligonukleotid-könyvtárak használata terjedt el.

A randomizált szakaszok mellett az oligonukleotidok általában 15-20 nukleotid hosszúságú primerkötő szekvenciákat tartalmaznak. Ezek a szakaszok a randomizált bázisok számától függően együttesen az aptamer szekvenciájának akár több mint felét is alkothatják. A primerkötő régiók elhagyása a szelekció után gyakran az aptamerek kötőképességének csökkenéséhez vezet, ugyanis ezen régió nukleotidjai hozzájárulhatnak az aptamer stabil vázának kialakításához vagy akár a ligandkötő motívum részét is képezhetik. Annak érdekében, hogy a célmolekula kötésében döntő

módon a random szekvenciarészlet vegyen részt, több megoldás is született. A Tailored SELEX és a Dual SELEX-technikák jó alternatívát nyújtanak a primerrégiók lerövidítésére. Esetükben a könyvtár rövid, 7–10 nukleotidos konzervált szakaszt tartalmaz, de akár primerkötő szekvenciák nélkül is megvalósítható az aptamer-szelekció [33–35]. A módszerek közös sajátossága, hogy a hagyományos SELEX-hez képest több enzimatikus lépés közbeiktatására van szükség, ami bonyolítja a szelekció folyamatát, a ligálási lépések alacsony hatásfoka pedig a ligandhoz nagy affinitással kötődő szekvenciák elvesztéséhez is vezethet [36]. Mindezen hátrányok következtében ezek a módszerek nem terjedtek el.

#### 1.5.2. Az aptamerek szelektivitásának növelése

A szelekció egyik kulcslépése a ligandhoz specifikusan, nagy affinitással kötődő oligonukleotidok és a könyvtárban előforduló többi oligomer elkülönítése. Ennek érdekében a célmolekulákat gyakran valamilyen távtartó molekulán keresztül hordozó mátrix felületére, például mikrotitertálcára, affinitástisztító gyantára rögzítik, így egy egyszerű mosási lépéssel a ligandhoz aspecifikusan kötődő szekvenciák hatékonyan eltávolíthatók a rendszerből [37].

A ciklusok közé beiktatott negatív szelekciós lépéssel azok az oligonukleotidok is eliminálhatók, amelyek a célmolekulát hordozó anyagokhoz és felületekhez nem specifikusan kötődnek. Ekkor a könyvtárat elsőként a célmolekulát nem tartalmazó mátrixszal inkubálják, majd az elválasztást követően a szelekcióhoz az így nyert felülúszót használják fel. Az aptamerek specificitása kontraszelekciós lépésekkel is tovább növelhető, aminek köszönhetően nagyfokú homológiát mutató fehérjékre vagy akár csak egyetlen funkciós csoportban különböző molekulákra specifikus aptamerek is előállíthatók [38]. A negatív szelekcióhoz hasonlóan a kontraszelekció célja az aspecifikusan kötődő szekvenciák eliminálása, ebben az esetben viszont a célvegyülettel analóg molekulák kerülnek felhasználásra. A módszer alkalmazhatóságát bizonyítja többek közt a teofillint felismerő aptamer szekvenciájának azonosítása. Kísérletük során a szerzők szefarózgyantához rögzítették a teofillint, majd az RNS-könyvárral történő inkubálás után a gyantát koffeinnel mosták a nem specifikusan kötődő molekulák eltávolítása céljából. Az így szelektált RNS-aptamer mintegy 10000-szer nagyobb affinitással kapcsolódott célmolekulájához, mint a koffeinhez, ami csupán egyetlen metilcsoporttal tér el attól [39].

Az aptamerekkel megvalósítható rendkívül specifikus detektálásra további példa az arginin-specifikus aptamer, amely akár a D- és L-enantiomerek megkülönböztetésére is alkalmas [40]. A negatív és kontraszelekciós lépések bevezetésével elért eredmények hozzájárultak ahhoz a felismeréshez, hogy a hordozóhoz rögzített egyedi célmolekulákon kívül akár komplex, heterogén célpontok is felhasználhatók az aptamerek szelektálására. Ennek az elméletnek a gyakorlati hasznosításában az egyik legjelentősebb előrelépést a sejtekre történő szelekciós eljárás (Cell-SELEX) kidolgozása jelentette. A módszer ugyanis a sejtfelszíni molekulák pontos ismerete nélkül is lehetővé teszi a kiválasztott sejttípushoz kötődő aptamerek előállítását [41]. A Cell-SELEX során az aptamerek specificitása a sejtekkel végzett kontraszelekciós lépéssel növelhető.

#### 1.5.3. Az aptamerek kémiai módosításának lehetőségei

A nukleinsavak széleskörű alkalmazásának egyik fő korlátozó tényezője, hogy a biológiai mintákban gyakran előforduló endo- és exonukleázok hatására rövid idő alatt lebomolhatnak. A reakciót a nukleázokon kívül a magasabb hőmérséklet, az átmeneti fémek ionjai és a hidroxidionok egyaránt katalizálhatják. A nukleinsavak stabilitásának fokozására az elmúlt évek alatt számos stratégia született, melyek közül az egyik legkézenfekvőbb megoldás az oligonukleotidok szelekciós eljárás utáni, post-SELEX kémiai módosítása [42] (4. ábra). Az aptamerek 3' végének védelme *in vivo* alkalmazásokban és szérumminták vizsgálatakor különösen fontos lehet. A vizsgálatok eredményei alapján ezekben a mintákban gyakran exonukleázok bontják le az oligonukleotidokat [43]. Az exonukleázok okozta hasítás megakadályozható az aptamerek 3'-végére kapcsolt biotinnal vagy a 3'-3' kötést létrehozó inverz timidinnel is. A 3' mellett az aptamerek 5'-végének módosítása is megvalósítható, például amin, foszfát, polietilén-glikol, koleszterin, zsírsav, fehérje kapcsolható hozzá, amelyek sapkát képezve szintén megvédik a nukleinsavakat a degradációtól [44, 45].

Az RNS-ek fokozott instabilitása a ribonukleotidok 2' pozíciójú reaktív hidroxilcsoportjára vezethető vissza, amely bázikus pH-n deprotonálódva – a szomszédos foszfodiészter kötés hidrolízise révén – ciklikus 2',3'-foszfátvegyület kialakításában vesz részt. Ennek megfelelően a nukleázrezisztencia a 2'-pozícióban módosított bázisok beépítésével is jelentősen növelhető, viszont ezek az utólagos változtatások hátrányosan befolyásolhatják az aptamerek kötőképességét. Habár az aptamerek a post-SELEX módosítások után is újraszelektálhatók, ezeknek a lépéseknek a kivitelezése sok időt vehet igénybe, ami nagymértékben korlátozza az eljárás rutinszerű alkalmazását [46].

A megfelelő affinitású és stabil oligomerek előállításának másik lehetséges módja a speciális, módosított nukleotidokat tartalmazó oligonukleotid-könyvtárakból történő aptamer-szelekció. Ezen könyvtárak létrehozásának fontos feltétele, hogy a kémiai módosításoknak a SELEX folyamán alkalmazott DNS- és RNS-polimerázokkal kompatibilisnek kell lenniük. Napjainkban a fehérjemérnökség területén elért eredményeknek köszönhetően már számos rekombináns technikával létrehozott enzim áll rendelkezésre, amelyek a természetben előforduló nukleotidokon kívül idegen bázisok beépítésére is képesek.

Miután Padilla és Sousa úttörőnek számító munkájukkal demonstrálták, hogy a T7 RNS-polimeráz Y639F variánsa 2'-amino és 2'-fluoro-pirimidinek beépítésére is alkalmas, több RNS-polimeráz esetében is igazolódott, hogy a transzkripció során módosított nukleotidok hasznosítására is képesek [47]. Az amino- és fluor- szubsztituált könyvtárak szintézise mellett 2'-O-metil-szubsztituált ribózt, valamint C5-helyzetben módosított pirimidint tartalmazó RNS-könyvtárakra is találhatunk példát [48,49]. Ezekkel a kémiai módosításokkal az RNS-aptamerek féléletidejét humán szérumban néhány másodpercről több órára sikerült növelni [50]. A módosított DNS-könyvtárak leghatékonyabban a *Thermococcus kodakaraensis* baktériumból származó *KOD Dash* polimerázzal állíthatók elő, amely a C5-helyzetben módosított pirimidineken kívül a 7deazapurinokat és timidin-analógokat is megfelelő hatékonysággal képesek hasznosítani [51]. Az aptamerek stabilitása a cukor-foszfát-láncon történő kémiai módosítások közül a dNTP α helyzetű foszforatomján lévő oxigén kénnel történő szubsztitúciójával is jelentősen fokozható. Ezekben a tioaptamer néven ismertté vált oligonukleotidokban az egyes nukleotidokat foszforotioát-kötések kapcsolják össze [52,53].

A zárt nukleinsavak szintézise további alternatívát jelenthet az aptamerek degradálódásának megakadályozására. A Wengel és Imanishi által 1998-ban kifejlesztett nukleinsavakban a 2'-helyzetű oxigén metilén hídon keresztül kapcsolódik a ribóz 4'-szénatomjához, ezáltal a ribózgyűrű 3'-endo konformációja rögzül [54, 55]. Az

LNA *de novo* szintézisét elsőként *Phusion High Fidelity* polimerázzal sikerült megvalósítani, amelyet követően Imanishi és munkatársai igazolták, hogy a KOD polimeráz csökkent 3',5' exonukleáz aktivitása miatt még alkalmasabb az előállításukra [56, 57]. Egy tanulmány szerint azonban a LNA-adenozin tartalom egy 40 nukleotidnyi randomizált szakasszal rendelkező DNS könyvtár amplifikációja során a 7. ciklusra a kezdeti 20,5%-ról 6,6%-ra csökkent. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a timidin tartalom változásában is LNA-TTP felhasználásakor. Vagyis a módosított nukleotidokat tartalmazó, random oligonukleotid könyvtárakból kiinduló aptamer szelekció legfőbb korlátozó tényezője, hogy a DNS és RNS polimerázok által beépíthető módosított nukleotidok száma limitált [58]. A beépítés csökkenő hatásfoka így kizárja a hagyományosan 8-12 iteratív ciklusból álló szelekció végrehajtását [59].



4. ábra: Az oligonukleotidok kémiai módosításának néhány lehetősége [60]

#### 1.5.4. Spiegelmer-SELEX

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 [61]. Ezt követően Williams és munkatársai megállapították, hogy a vazopresszinre szelektált L-oligomer koncentrációja mind az S1-, mind a DNáz I endonukleázzal való 10 napos inkubálást követően is változatlan maradt, míg azonos körülmények közt a D-aptamer 10 másodperc alatt degradálódott. A humán szérumban végzett kísérletek eredményei szerint 7 nap után sem volt tapasztalható az L-nukleotidokból felépülő nukleinsavak hasítása [62].

A Spiegelmer technológia alapját az az elv képezi, hogy jól definiált térszerkezettel rendelkező makromolekulák, például nukleinsavak és fehérjék enantiomer párjai az eredeti molekulához képest tükörképi szerkezetet vesznek fel, ennek megfelelően a két egymással kölcsönható molekula enantiomerjei az eredeti molekulákkal megegyező módon lépnek interakcióba [63] (5. ábra). Fontos kiemelni, hogy a szelekció során felhasznált enzimek sztereoszelektivitása miatt valójában a célmolekula tükörképi párja kerül felhasználásra, emiatt az L-oligomerek előállítása jóval összetettebb feladat, mint a természetben előforduló, D-cukoregységeket tartalmazó aptamerek szelekciója.

A Spiegelmer szelekciós eljárás az eredeti célmolekula szintetikus, tükörképi párjára történő hagyományos, D-konfigurációjú aptamerek szelekcióján alapszik, amelyet az aptamerrel azonos szekvenciájú, L-nukleotidokból álló oligomer előállítása követ [40]. A molekulák szimmetriaviszonyaiból adódóan az így azonosított Spiegelmer az eredeti célmolekulához ugyanakkora affinitással képes kötődni, mint amekkora affinitással képes a D-aptamer a szelekcióhoz felhasznált tükörképi célmolekulához kapcsolódni. Az optikailag aktív célmolekula enantiomerjét szintetikusan kell előállítani, emiatt általában csak kisebb méretű molekulákat és fehérje epitópokat alkalmaznak a szelekció során. Így például az adenozinon kívül ismertek argininre,

peptidekre – például ghrelin, vazopreszin – és a fehérjék közül az enterotoxin B-re, MCP-1-re specifikus Spiegelmerek [64]

A fehérjékre specifikus Spiegelmerek előállítása az antitestek termeltetésénél is gyakran alkalmazott metodika elvét követi, melynek lényege, hogy a fehérje molekulák helyett a megfelelő epitópok kiválasztását követően szintetikus peptideket használnak fel az immunizáláshoz [65]. Annak ismeretében, hogy az oligonukleotidok nem az egész fehérjemolekulát ismerik fel, hanem annak csak bizonyos aminosav motívumaival lépnek kölcsönhatásba, Klussman és munkatársai a 25 kDa méretű enterotoxin B fehérje stabil, 25 aminosavból álló régióját jelölték ki a szelekció célpontjaként. A Spiegelmer SELEX-et követően a kiválasztott oligomert SPR-módszerrel karakterizálták. Eredményeik szerint mindkét enantiomer esetében az oligonukleotid-peptid komplex disszociációs konstansának 200 nM körüli értéket állapítottak meg, míg a Spiegelmer és a teljes hosszúságú fehérje kötődése 420 nM-os K<sub>D</sub>-értékkel volt jellemezhető [66]. Ezenkívül a fehérjék teljes hosszúságú enantiomer párjára történő szelekcióra is találhatunk példát. Joyce és munkatársai 2015-ben egy ribonukleáz tükörképi párjának előállítását követően olyan L-oligomereket hoztak létre, amelyek az enzimhez kötődve képesek voltak a nukleázaktivitás gátlására [67].



5. ábra: A Spiegelmer-szelekció sematikus ábrája [68]

#### 1.6. Az aptamerek alkalmazási területei

Az első aptamerek szelekcióját ismertető publikáció megjelenése óta mintegy 25 év telt el, azonban az aptamerek alkalmazásában rejlő lehetőségeket csak az utóbbi néhány évben ismerte fel a gyógyszeripar. Az aptamerek in vivo alkalmazása az antitestekkel ellentétben nem generál immunválaszt, a megfelelő komplementer oligonukleotid adásával pedig terápiás hatásuk akár fel is függeszthető. Ennek köszönhetően napjainkban számos kutatás irányul terápiás alkalmazhatóságuk vizsgálatára [69]. Az első, FDA által engedélyezett aptamert időskori makula degeneráció kezelésére fejlesztette ki a NeXstar Pharmaceuticals. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktorra (VEGF) szelektált oligonukleotid az angiogenezis gátlása révén fejti ki hatását, mivel az RNS aptamerek megakadályozzák, hogy a növekedési faktor kölcsönhatásba lépjen a vaszkuláris endoteliális sejtréteg felszínén található receptorával [70]. A további fejlesztéseket követően végül 2'-dezoxi és 2'fluoropirimidin módosított nukleotidokat alkalmaztak a stabilitás növelése érdekében, és egy inverz dezoxi-timidint kapcsoltak a 3'-végre [71, 72]. Az aptamer gyors kiürülését a szervezetből az 5'-véghez kapcsolt, 40 kDa tömegű polietilén-glikol csoporttal akadályozták meg [73]. A terápiás célra használt aptamer készítmény Macugen (Pegaptanib) néven 2004-ben került kereskedelmi forgalomba, és az azóta eltelt időben már több aptamer is a klinikai kísérletek 2. és 3. fázisába jutott (1. táblázat).

Aptamer	Típus	Módosítás	Célpont	Orvosi indikáció
ARC1905 (Ophthotech)	38-nt RNS	2'-fluoropirimidin 2'-O-metil 3'-invertált dT 40 kDa PEG	Komplement faktor C5	Időskori makula degeneráció
E10030 ( <i>Ophthotech</i> )	29-nt DNS	2'-O-metil 3'-invertált dT 40 kDa PEG	Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)	Időskori makula degeneráció
REG1 (Regado Biosciences)	37-nt RNS	2'-fluoropirimidin	IX-es véralvadási faktor	Koszorúér betegség
ARC1779 (Archemix Corporation)	39-nt DNS	3'-invertált dT 2'-O-metil 20 kDa PEG	aktivált von Willebrand faktor (vWF)	Trombotikus citopénia von Willebrand-betegség
AS1411				Leukémia
Antisoma Research	26-nt DNS	PEG	Nukleolin	Mieloid metasztatikus vesesejtes karcinóma
NOX-A12		L-ribonukleinsav	Stromális eredetű	Mielóma multiplex
(NOXXON Pharma)	45-nt RNS	PEG	növekedési faktor-1	Krónikus limfoid leukémia
NOX-E36		L-ribonukleinsav		2-es típusú cukorbetegség
(NOXXON	40-nt RNS	PEG	protein-1 (CCL2)	Krónikus gyulladás
Pharma)			F	Albuminuria
NOX-H94		L-ribonukleinsav		Anémia
(NOXXON Pharma)	44-nt RNS	PEG	Hepcidin	Gyulladás

#### 1. táblázat: Klinikai vizsgálatokban résztvevő nukleinsav aptamerek [74]

Az extracelluláris és sejtfelszíni célmolekulákon kívül elméletileg intracelluláris molekulák is lehetnek az aptamerek célpontjai, mivel az aptamerek sejtekbe juttatása többféle módon is kivitelezhető. Egyik leggyakrabban használt módszer az oligonukleotidok bejuttatására a nanorészecskékhez történő konjugálás, de a sejtek akár aptamert kódoló vektorokkal is transzfektálhatók [75, 76]. Több tanulmány is igazolta, hogy az aptamerek sejtfelszíni receptorukhoz kötődésük után internalizálódhatnak, így akár más molekulák, például gyógyszerhatóanyagok és siRNS-ek specifikus célbajuttatására is alkalmasak lehetnek [77-79]. McNamara és munkatársai elsőként hoztak létre olyan RNS aptamer - siRNS kiméra molekulákat, amelyek a PSMA-t tumorsejtekbe internalizálódva voltak célgének expresszáló képesek а csendesítésére [80]. А kiméra további optimalizálását követően Giagrande

munkacsoportja a tumorsejtek növekedésének jelentős mértékű gátlásáról számolt be [81].

A terápiás célra történő felhasználás mellett napjainkban a diagnosztika területén is ígéretes aptamer kutatások zajlanak. A nagyszámú aptamer jelölt ellenére a humán klinikai diagnosztikában ez idáig nem került sor rutinszerű alkalmazásukra, egyedül az élelmiszeranalitikában találhatunk erre példát. A Neoventures Biotechnology nevű kanadai cég által kifejlesztett OTA-Sense and ALPHA-Sense Detection System elnevezésű reagensek mycotoxinok detektálására alkalmasak. Ezek a forgalmazott készletek a folyadékkromatográfiás meghatározással megegyező érzékenységgel és szelektivitással rendelkeznek, a mérések kivitelezésének ideje pedig töredéke az antitestekkel történő detektálásnak [82]. A patogéneket és biomarkereket specifikusan felismerő aptamer fejlesztések többsége a fertőző, tumoros és kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikájához kapcsolódik (2. táblázat). Az utóbbinál mioglobinra, CRP-re, L-homociszteinre és trombinra szelektált DNS-aptamerre egyaránt találunk példát [83]. A Cell-SELEX eljárásnak köszönhetően a célmolekulák előállítása, illetve tisztítása nélkül is szelektálhatók aptamerek. Ebből adódóan az egyik leginkább tanulmányozott terület a tumoros sejtek sejtfelszíni markereinek azonosítása. Számos kutató beszámolt a hasnyálmirigy, máj, prosztata, mell, vastagbél, és asztroglia eredetű tumorsejt aptamerekkel történő detektálásáról [84-86].

Célpont	Random régió hossza (mer)	K <sub>D</sub> (nM)	Diagnosztikai módszer		
Tumoros	s megbetegedés	sek			
Prosztata tumorsejt (PC-3, metasztatikus)	45 73,59		Direkt eljárás (FITC-jelöléssel)		
Metasztatikus emlő tumorsejt (MDA-MB-231)	45	44,0	Direkt eljárás (Cy5-jelöléssel)		
Máj tumorsejt (HepG2)	50	19	Direkt eljárás (FITC-jelöléssel)		
Glioblastoma multiforme sejt (A172)	42	75,3	Direkt eljárás (Biotin módosítással)		
Fertő	ző betegségek				
influenzavírus HA protein (H5N1)	74	4,65	Dot blot (Sztreptavidin-alkalikus foszfatáz)		
Leishmania promastigota és hidrofil felületi protein (HSP)	36	nm	Aptamer-mágneses gyöngy szendvics eljárás (HRP)		
Rágcsáló prionfehérje (H-MoPrP90'231)	45	20	Target -indukálta disszociáció		
Plasmodium falciparum laktát-dehidrogenáz (PfLDH)	35	42-59	Direkt eljárás (Arany nanorészecskés jelölés)		
Kardiovaszkuláris betegségek					
Mioglobin	40	4,93	Target-indukálta disszociáció		
L-homocisztein	60	600	Target-indukálta disszociáció		

## 2. táblázat: DNS-aptamerek a humán betegségek diagnosztikájában [87]

#### 1.7. Izomkontrakció a harántcsíkolt izmokban

Gerincesekben az izomszövet három fő típusát – vázizom-, szívizom- és simaizomszövetet – különböztethetjük meg, melyek közt a strukturális eltérések főként a felépítő molekulák változatos elrendeződésére és a specifikus szabályozó fehérjék jelenlétére vagy hiányára vezethetők vissza. A fénymikroszkópos felvételeken harántcsíkolt mintázatot mutató váz- és szívizom sejtjeinek funkcióképességét sorba rendeződött szarkomer egységek biztosítják, felépítésükben pedig speciális kontraktilis és szabályozó fehérjék vesznek részt. A jellegzetes különbségek ellenére az izomrostok fehérjeállományának mintegy 75%-át alkotó két fő molekula, az aktin és a miozin szerkezete az egyes izomtípusokban alapvetően megegyezik.

A miofilamentumok motoros fehérjéi közé tartozó aktin globuláris fehérje monomerjei (G-aktin) fiziológiás körülmények között nem egymástól elkülönülten fordulnak elő, hanem a monomerekből felépülő két lánc hélix-szerűen egymás köré tekeredve az F-aktint alkotja. Az izom-összehúzódás folyamatának aktív komponense a miozin, amely ATPáz aktivitással rendelkezik, és az ATP hidrolízisével nyert energiát térszerkezet-változással járó mechanikai mozgássá képes alakítani. Az izomkontrakció máig legelfogadottabb és kísérletesen legjobban alátámasztott modellje, a csúszó filamentum elmélet szerint a kontrakció alapját valójában nem egy molekula rövidülése, hanem a két molekuláris elem, a miozin és az aktin egymáshoz képest történő elmozdulása okozza [88]. Az összehúzódás során a bekövetkező strukturális változások hatására az egymáshoz viszonyítva párhuzamosan rendezett fehérjemolekulákból kontraktilis aktomiozin komplex alakul ki. A miozin feji része az F-aktin gyöngyfüzérszerűen felcsavarodó egy-egy globuláris egységéhez kötődik, majd a fej behajlása miatt ezen elcsúszik. A szögváltozás következtében a két fehérje összhossza kisebb lesz, ekkor az A-sávban lévő H-zóna szélessége csökken, az izom elernyedésekor viszont a H-sáv hossza növekszik.

simaizmok működése leginkább а miozin könnyűláncok Míg а foszforiláltságától függ, a harántcsíkolt izmok és a szívizom működése elsősorban a troponin-tropomiozin rendszeren keresztül szabályozódik. A tropomiozin kétláncú αhélixekből "coiled-coil" felépülő, szerkezetű elnyújtott fehérje, amely а troponinkomplexszel együtt az aktin polimerhez kötötten helyezkedik el a vékony filamentumban (6. ábra). Mindegyik tropomiozin molekula 7 aktin monomerrel lép

kölcsönhatásba és egy troponinkomplexet köt meg, ami az 1:1:7 moláris arányt biztosítja a miofibrillumban [89]. Az izom nyugalmi állapotában az aktin és miozin nem kötődik egymáshoz, mert kölcsönhatásukat a tropomiozin gátolja. Az összehúzódás iniciálásához elengedhetetlen a  $Ca^{2+}$ -ionok aktivátor szerepe. Koncentrációjának emelkedése esetén ez a gátló hatás felfüggesztődik, és lehetővé válik a miozin-aktin ciklus kialakulás [90].



Z-lemez

A-sáv



6. ábra: A szarkomer (A) és a filamentumok (B) szerkezete. A szívizom sejtek funkcionális egységét, a szarkomert kontraktilis és szerkezeti fehérjék sokasága alkotja. Működése a vékony (aktin) és a vastag filamentum (miozin) közt intracelluláris Ca<sup>2+</sup> hatására ciklikusan kialakuló kölcsönhatáson alapszik. A troponinkomplexet alkotó három fehérje (a TnI, TnT és TnC) a tropomiozinnal (TM) együtt a vékony filamentumhoz kötötten képesek a miozin kötődését szabályozni, míg a vastag filamentumhoz kapcsolódó regulátor fehérjék, mint például az RLC, ELC a miozin pozíciójának és mechanikai tulajdonságainak szabályozásában vesznek részt [91]

#### **1.8.** A troponinkomplex

A kontrakció intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-függő szabályozásának molekuláris hátterét elsőként az 1960-as években Ebashi és munkatársai vizsgálták. Tanulmányukban megállapították, hogy a szarkoplazmából felszabaduló Ca<sup>2+</sup> a troponinkomplexen és a tropomiozinon keresztül fejti ki hatását. 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<sup>2+-</sup>kötő doménnel rendelkezik, míg a TnT a tropomiozinra horgonyozza a hármas komplexet [92,93]. Az izomsejtek nyugalmi állapotában, Ca<sup>2+</sup> hiányában a troponinkomplex I-alegysége inhibitor régióján keresztül az aktinhoz kapcsolódik, gátolva ezzel az aktomiozin ATP-áz funkcióját. Ca<sup>2+</sup> jelenlétében viszont a TnC Cterminális doménje a TnI-hez kötődik, az indukált konformáció-változás az inhibitor hatás elvesztéséhez, így végül az izomkontrakcióhoz vezet [94].

A komplex térszerkezetét feltáró első röntgenkrisztallográfiás és elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a komplex az alábbi két fő strukturális egységre tagolható: a tropomiozint kötő túlnyúló részre és a fő szabályozó szerepet betöltő központi "core" doménre [94, 95]. A troponinok szerkezetéről napjainkig számos közlemény látott napvilágot, amelyek fontos eredményekkel járultak hozzá az izomkontrakció folyamatának megértéséhez, azonban a fehérjekomplex teljes szerkezete és szabályozó mechanizmusának részletei még nem ismertek.

Takeda és munkatársai az E. coli-ban termeltetett rekombináns kardiális troponinkomplexet krisztallográfiás módszerrel tanulmányozták. А teljes troponinmolekula esetében a kristályosítást nem tudták megvalósítani, ezért a kutatók két különböző preparátumot készítettek. A 46 kDa molekulatömegű "core" domén a TnC (1–161), a TnI (31–163) és a TnT (183–288) szakaszokat tartalmazta, míg az 52 kDa-os méretű a TnC (1-161), TnI (31-210) és a TnT (183-288) alegységekből épült fel (zárójelben az aminosavak sorszámai szerepelnek). Mindkét esetben a szívizom eredetű troponin I-re jellemző N-terminális véget a 30. aminosavig lehasították, ami így vázizom troponinhoz hasonló egységeket eredményezett. A kristályok minőségének javítása érdekében a 46 kDa méretű komplexnél további 46 aminosavnyi részletet eltávolítottak a TnI C-terminálisáról. A komplexek szerkezetének vizsgálata alapján

megállapították, hogy a központi domén további, szerkezetileg eltérő aldoménekre különíthető. Az I-T kar egységeket, valamint a TnC és a TnI szekvenciájának részleteiből álló szabályozó fejet mobilis szakaszok kötik össze, ami rendkívül flexibilis struktúra kialakulását teszi lehetővé [97] (7. ábra).



**7. ábra: A kardiális troponinkomplex szerkezetének vázlata.** A troponin fehérjekomplexet három alegység: TnC, TnI, és TnT alkotja. A molekula két szerkezeti egységre, a központi doménre és a TnT túlnyúló részre tagolható. Nagy felbontású krisztallográfiás vizsgálatok szerint a központi domén szerkezetének kialakításában további két alegység, a szabályozó fej (a TnC 3–84 aminosavak és a TnI 150–159 aminosavak közti régió), valamint az I-T kar (a TnC 93–161, a TnI 42–136, és a TnT 203–271 aminosavak közti szakaszok) vesznek részt [98]

A troponinkomplex három alegységének mindegyike izomtípus-specifikus izoformákkal rendelkezik. A TnI és a TnT 3-3 izoformáját a lassú vázizom, a gyors vázizom és a szívizom troponingének kódolják. Ezzel ellentétben a troponin C csak kétféle izoformában van jelen a három eltérő harántcsíkolt izomtípusban, ugyanis a felnőtt szívizomban és a lassú vázizomban azonos – a TNNC1 által kódolt – izoformák fejeződnek ki [99]. A TnC a fehérjék kalmodulin szupercsaládjába tartozik. Az N- és C-terminálisán elhelyezkedő globuláris doméneket hosszú, 9 kanyarulatos α-hélix köti össze, ami végeredményben a molekula súlyzó alakú térszerkezetéhez vezet [100]. Ez az alegység a kétértékű fémionokat négy EF-kéz hélix–kanyar–hélix-szerkezetű

kötőhelyén képes megkötni [101, 102]. A jelenleg elfogadott modell szerint a troponin T alegység tropomiozinhoz rögzíti az I-T-C komplexet, de emellett fontos szerepet tölt be az izomkontrakció Ca<sup>2+</sup>-függő szabályozásában is [103]. Az N-terminálisán található, meglehetősen hosszú hipervariábilis szakasz a miofilamentum egyik ismert komponensét sem képes kötni, feltehetőleg a központi domén konformációjának kialakításában fontos szerepe van, de ennek tisztázásához további vizsgálatokra van szükség [104].

#### 1.8.1. A troponin I szövetspecificitása

Magasabb rendű gerincesekben a troponin I fehérje izomtípusonként eltérő formáit három homológ gén kódolja. A humán 1. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő TNNI1-gén a lassú vázizom (ss), a TNNI2 a gyors vázizom (fs), míg a 19. kromoszóma hosszú karján található TNNI3-gén a szívizom eredetű (c) troponin I izoformák kódolásáért felelős (3. táblázat). Mindhárom gén szerkezete eltérő, transzkripciójuk szabályozása és kifejeződésük mértéke az egyes izomtípusokban az embrionális és a posztnatális fejlődés során is különbözik [105].

Gén	TNNI1	TNNI2	TNNI3
Pozíció a kromoszómán	1q31.3	11p15.5	19q13.4
Exonok száma	9	8	8
Aminosavak száma	187	182	210
Molekulatömeg (kDa)	21,7	21,3	24
Izoelektromos pont	9,59	8,74	9,87
Szövetspecificitás	lassú vázizom; embrionális szívizom	gyors vázizom	felnőtt szívizom

3. táblázat: Humán TnI-gének és szövetspecifikus expressziójuk [99]

A szekvencia-analízis eredményei alapján feltételezhetjük, hogy a troponin Igének jelenlegi formái az evolúció során egy fsTnI-hez hasonló génből duplikációk útján alakultak ki. Legnagyobb fokú hasonlóság az izoformák közül az ssTnI és a cTnI szekvenciái közt fedezhető fel, ami közvetlen evolúciós kapcsolatukra utalhat. Ezt az elméletet támasztja alá az is, hogy az embrionális fejlődés alatt a szívizomban kizárólag az ssTnI izoforma expresszálódik, majd ezt követően a perinatális szakaszban átkapcsol a cTnI-re, és körülbelül 9 hónappal a születés után kizárólag ez a forma fejeződik ki [106]. A troponin I-izoformák funkciójának konzerváltságára utal továbbá az is, hogy azok a létrehozott transzgénikus egerek, melyeknél a szívizomban a cTnI fehérjét ssTnI-vel helyettesítették, életképesek és fertilisek maradtak [107].

A különböző izomrostokban kifejeződő troponin I-izoformák közti eltérések feltehetőleg a miofilamentumok Ca<sup>2+</sup>-érzékenységének, kooperativitásának finomhangolásában, valamint a sejtek környezetükhöz való adaptációjában játszanak szerepet, és hatással lehetnek a pH-változással szembeni tűrőképességre. Ezt erősítette meg Solaro és munkatársainak eredménye is, amely alapján a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy az ssTnI-t tartalmazó troponinkomplex nagyobb Ca<sup>2+</sup> affinitással bír, és akár acidózis esetén, alacsonyabb pH-n is képes biztosítani az embrionális kardiomiocitákban a miofilamentumok megfelelő érzékenyégét [108].

Fontos megemlíteni, hogy az izotípusok fajok közti nagyfokú hasonlósága ellenére madarak és emlősök esetében a felnőtt szívizom TnI-fehérje N-terminálisán egyedi motívum található, amely az evolúció során alakulhatott ki. Ez a struktúra az alacsonyabb rendű gerinceseknél nincs jelen. Ennek megfelelően a vázizom troponin I-gének 1, 2 és 3-as exonja ellentétben a TNNI3 több mint 30 aminosavat kódoló szakaszával csak néhány aminosavat kódol, míg a 4-8 exonok meglehetősen konzerváltak az egyes izotípusok és fajok közt. A humán TNNI1-gén mintegy 5 ezer bázispárból álló utolsó (9-es) exonja nem kódoló szekvenciát tartalmaz, melynek szerepe és jelentősége egyelőre nem ismert [105]

Napjainkig a TNNI1-gén esetében nem ismertek betegség kialakulásához köthető mutációk, azonban a humán fsTnI-t és a cTnI-t kódoló génekben bekövetkező mutációk miopátiához vezethetnek. A familiáris hipertrófiás kardiomiopátia eseteinek mintegy 5%-a hibás TNNI3-génhez köthető. Idáig legalább húszféle, örökletes restriktív kardiomiopátiával összefüggésbe hozható mutációt írtak le, továbbá a TNNI3 mutációinak szerepét dilatatív kardiomiopátiában is igazolták [109-110]. Általánosságban kijelenthető, hogy a TNNI3 gén kardiomiopátiát okozó mutációi – összevetve a miofilamentum más fehérjéinek patogén mutációival – súlyosabb klinikai tüneteket eredményeznek [111, 112]. A betegséget okozó egypontos mutációk többsége

a polipeptidlánc C-terminális részén fordul elő, ezzel is bizonyítva a domén kritikusan fonotos szerepét a szívizom kontrakciójában [113]. Ez a megfigyelés azt is jelezheti, hogy ebben a régióban a fehérje többi szakaszával összehasonlítva, sokkal szorosabb a szerkezet és funkció közti kapcsolat. Ugyanakkor az a hipotézis sem elvethető, miszerint ez a szakasz nagyfokú toleranciával bír a szerkezeti variációkkal szemben, így az embrionális letalitást elkerülve a mutációk a populációban fennmaradhatnak.

#### 1.8.2. A troponin I-fehérje funkcionális egységei

A troponin I-fehérjék 21-24 kDa méretűek, izoelektromos pontjuk a bázikus tartományba esik. A harántcsíkolt izmok kontrakciójának szabályozásában betöltött szerepükből adódóan a troponinkomplex többi tagján kívül a tropomiozinnal és az aktinnal is képesek kölcsönhatást kialakítani. A szerkezetük és funkciójuk közti kapcsolatot vizsgáló *in vitro* tanulmányok eredménye alapján a fehérje az alábbi 6 funkcionális szegmensre osztható (8. ábra):

- 1. szívizom-specifikus N-terminális extenzió (1-30 AS)
- 2. N-terminális konzervált régió (42–79 AS)
- 3. TnT kötő régió (80–136 AS)
- 4. inhibitor régió (128–147 AS)
- 5. kapcsoló régió (148–163 AS)
- 6. mobilis C-terminális domén (164–210 AS).

A troponin I egyes peptidszakaszai közül az inhibitor régió a TnC-vel, aktinnal, tropomiozinnal kerül kölcsönhatásba, a kapcsoló régió pedig a TnC N-terminálisát köti. Az izoformák közül leginkább hasonló és a fajok közt leginkább konzervált C-terminális szegmens az aktinnal, tropomiozinnal lép interakcióba [114]. A legújabb eredmények szerint a C-terminális régió 8-as exon által kódolt utolsó 20 aminosava  $Ca^{2+}$  által regulált allosztérikus szerkezetet alakít ki [115].



8. ábra: A kardiális troponin I-fehérje szerkezeti és funkcionális egységei [113]. A cTnI polipeptidlánc aminosav szekvenciája alatt az ismert betegségokozó egypontos nukleotid polimorfizmusok pozícióit színes négyzetek jelölik: hipertrófiás kardiomiopátia (zöld), recesszív dilatatív kardiomiopátia (kék), autoszomális domináns dilatatív kardiomiopátia (barna), restriktív kardiomiopátia (piros)

#### 1.8.3. A troponin I-fehérje poszttranszlációs módosulásai

A troponin I-gének transzkripciója során alternatív RNS-érési folyamatok nem jellemzőek, ezért a fehérje működésének és szerkezetének modulálásáért leginkább a poszttranszlációs modifikációk felelősek (9. ábra). Az izomkontrakció finomhangolásában kiemelkedő szerep jut a polipeptidlánc hasítása és az aminosavoldalláncok módosítása által előidézett konformációs változásoknak. Az ssTnI és fsTnI fehérjék foszforilációjáról kevés információ áll rendelkezésünkre, ugyanakkor ismert, hogy a cTnI foszforilációja jelentős szerepet tölt be az izomfunkció szabályozásában [116]. A humán cTnI polipeptidlánc 12 szerint, 8 treonint és 3 tirozint tartalmaz, és a valószínűsített 18 foszforilációs hely többségénél kísérletes eredmények is alátámasztják az aminosavak foszforilációját. A fehérje N-terminálisán egy konzervált protein-kináz A-szubsztrátmotívum (RRRSS) található, melyben a Ser23 és Ser24 aminosavak adrenerg jelátviteli kaszkád szabályozása alatt álló foszforilációja a szívizom diasztolés funkciójának fokozásához vezet [98]. Ezzel ellentétben a Ser42 és Ser44 aminosavak PKC általi foszforilációja ellentétes hatást vált ki. In vitro kísérletek eredményei alapján a 23. és 24. szerint a PKA-n kívül egyéb kinázok, PKC-β, PKC-ε, PKD és PKG is foszforilálhatják [117–119]. A cTnI foszforilációja a fehérje proteázok általi degradálására is hatással lehet, hiszen a PKA által bekövetkező foszforiláció csökkenti, a PKC kiváltott foszforiláció viszont növeli a molekula érzékenységét a μ-calpain által katalizált proteolízissel szemben [120].

A peptidlánc N és C-terminális vége extrém instabilitást mutat, könnyen lehasítható, míg a középső régió stabilabb. A TnI C-terminálisán patológiás körülmények közt végbemenő degradációjával kapcsolatos eredmények meglehetősen ellentmondásosak, azonban az N-terminális végen történő szelektív proteolízis a sejtek normál és patológiás stresszhatásra bekövetkező adaptációja szempontjából kulcsfontosságú. Az N-terminális hasítása kis mértékben normál körülmények közt is előfordul, de jelentősen fokozódik hemodinámiás stressz hatására [120, 121].



**9. ábra: A troponin I jellemző poszttranszlációs módosításai.** A normál betűtípussal jelölt enzimek lassítják a relaxációt vagy növelik a Ca<sup>2+</sup> -érzékenységet, a dőlt betűvel jelölt kinázok hatására gyorsul a relaxáció vagy csökken a Ca<sup>2+-</sup> érzékenység, míg a keretezett foszforilációk funkciója nem ismert [98]

#### 1.9. Az akut miokardiális infarktus diagnosztikája

A középkorú és idősebb populációban a szív- és érrendszeri betegségek szerte a világon vezető szerepet játszanak a halálozásban. A szívet és a koszorúereket érintő betegségek számos fajtája ismert, ide sorolható többek között a magas vérnyomás, a koszorúér-megbetegedés, a szívelégtelenség és az akut miokardiális infarktus (AMI). Ez utóbbi olyan jellegzetes klinikai tünetekkel és egyéb elváltozásokkal járó állapot, amit a szívizom vér- és oxigénellátásának hirtelen csökkenése következtében fellépő izomsejtkárosodás okoz. Az iszkémia hátterében elsődlegesen a koszorúér jelentős szűkülete, illetve a szűkülethez társuló plakkruptúra és trombus kialakulása áll, de a koszorúérkeringés zavarát az artériafalban zajló gyulladásos folyamatok is előidézhetik. Mindezek mellett a miokardiális iszkémia az oxigénigény tartós növekedését okozó folyamatokra, például hipertrófiás kardiomiopátiára, hipertireózisra is kóros visszavezethető. Hajlamosító tényezői között az érelmeszesedés, magas vérnyomás, 2es típusú cukorbetegség és magas életkor mellett az egészségtelen életmód szerepel. Amennyiben több rizikófaktor együttesen fordul elő, az esemény bekövetkeztének valószínűsége igen jelentős mértékben megemelkedik [123]. Az AMI klinikai megjelenési formája rendkívül változatos lehet, és nagymértékben függ a beteg korától, nemétől és az érintett szívizomterület nagyságától, valamint egyéb társbetegségektől is, emiatt a helyes diagnózis felállítása napjainkban is igen nagy kihívást jelent.

A WHO által az 1970-es években elfogadott AMI diagnosztikai kritériumok a súlyos és tartós mellkasi fájdalom és a jellegzetes EKG-eltérések mellett harmadikként a biokémiai markerek emelkedett szintjét tartalmazzák. A definíció szerint a három feltételből kettő jelenléte szükséges és elégséges feltétele az AMI diagnózisának [124]. A mellkasi fájdalom gyakran nem jár együtt egyértelmű EKG-elváltozásokkal, ilyenkor a negatív eredmény nem zárja ki a miokardiális infarktus lehetőségét. Ezeknél az eseteknél a biomarkereknek döntő szerepük van a döntéshozatalban, ugyanis a szívizomsejtek sérülése, tartós pusztulása esetén a keringésbe jutó molekulák koncentrációja jellegzetes időbeli változást mutat. Az emelkedés, majd az azt követő csökkenés nyomon követése, illetve azok elmaradásának igazolása is diagnosztikai értékkel bír.

Az úgynevezett korai markerek nem, vagy kevésbé szívizom-specifikusak, viszont mennyiségük az infarktus bekövetkezte után legtöbbször 1-2 órán belül

megemelkedik. Szintjük a kezdeti gyors emelkedést követően gyorsan csökkenni kezd, és 24 órán belül visszaáll az eredeti értékre. Ilyen korai markernek tekinthetők a harántcsíkolt és szívizomszövetben jelenlévő mioglobin (MB) és a kreatin-kináz (CK) szívizomra specifikus CK-MB izoformája. Habár az utóbbi szelektívebb a mioglobinnál, mérésekor figyelembe kell venni, hogy a CK-MB vázizom károsodással járó kórképekben is megemelkedhet [125]. 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.

Ezen szívspecifikus markerek nagy érzékenységű mérése több szempontból is elavulttá tette a WHO eredeti meghatározását, ezáltal egyértelműen szükségessé vált a korábbi biokémiai markerekre vonatkozó kritériumok felülvizsgálata. A miokardiális infarktus egységes definiálásának érdekében tett erőfeszítések eredményeképp 2000-ben mind az Amerikai, mind az Európai Kardiológiai Társaság a kardiális troponinokat nevezte meg a diagnosztikában javasolt biomarkerekként [126]. A klinikumban "aranystandard"-ként elfogadott két szívmarker, a troponin T és troponin I nagy érzékenységgel detektálhatók a vérben, de szintjük csak később, az AMI bekövetkezte után 3-6 óra között emelkedik jelentősen, viszont több napig is emelkedett maradhat (10. ábra). A molekulák fokozott kijutása a keringésbe tartósan fennálló, súlyos miofilamentum-szétesés nyomán jön létre. Koncentrációjuk a vérben erősen korrelál az irreverzibilisen sérült szövet méretével, így meghatározásuk lehetővé teszi a miokardiális károsodás jelenlétének és mértékének megítélését, a betegség lefolyásának monitorozását, esetleges újbóli infarktus detektálását valamint a trombolitikus terápia eredményességének ellenőrzését is [127].



**10. ábra: Markerfehérjék koncentrációjának változása a vérben akut miokardiális infarktust követően.** Az ábra a tünetek jelentkezését követően a szív markerek megjelenését mutatja be az idő függvényében. Az értékek ábrázolása relatív skálán történt, amelyen az 1,0 az AMI küszöbértékét jelenti [128]

A 2012-ben kiadott legújabb, a WHO által is elfogadott irányelvek szerint a miokardiális infarktus diagnózisának felállítása a miocitanekrózis és a kardiális troponin plazmakoncentráció-növekedésének és/vagy csökkenésének detektálásán alapszik. A meghatározás szerint miokardiális infarktusra utal, ha a kardiális troponin szintje legalább egy mérés során a normál referenciahatár 99 percentilis értékét meghaladja, továbbá az alábbi kritériumok közül legalább még egy teljesül [129]:

- (1) a betegnél miokardiális iszkémia tünetei jelentkeznek;
- (2) új szignifikáns ST-szegmens és/vagy T-hullám eltérések azonosíthatók az EKG-n;
- (3) patológiás Q-hullámok észlehetők az EKG-n;
- (4) képalkotó eljárással elváltozás, a falmozgás zavara detektálható a miokardiumban;
- (5) angiográfiás vizsgálat vagy autopszia során trombus azonosítható.

Fontos megjegyezni, hogy a biomarkerek kimutatásának gyors fejlődése nyomán ma már a legújabb nagy érzékenységű (high-sensitivity, hs) módszerekkel olyan kisfokú miokardiális szöveti elhalás is észlelhető, ami a korábbi definíció alapján nem éri el a miokardiális infarktusra jellemző mértéket. Ennek megfelelően a hs-troponin kimutatások esetén az AMI mellett az egyéb, életet veszélyeztető koszorúérbetegségeket is magába foglaló, "akut koronária-szindróma (ACS) laboratóriumi diagnosztika" elnevezés is elterjedt [130].
#### 1.9.1. Troponinok az AMI diagnosztikájában

A TnI- és a TnT-izoformák többsége strukturális, miofilamentumhoz kötött formában fordul elő, de kis mennyiségben szabad állapotban is jelen van a citoszólban. A cTnT esetében a szabad forma az összes troponin mennyiségnek 6–8%-át teszi ki, míg a cTnI-nél 2,8–4,1%-ra becsülik ezt az arányt [131]. A szívizom sérülése a TnT viszonylag magas citoszólikus koncentrációja miatt kétfázisú kiáramlási görbét eredményezhet, mivel a strukturálisan kötött troponinok lassabban jutnak a vérbe, mint a szabad fehérjék. Ennek megfelelően a troponinok koncentrációja a vérben hosszabb időn keresztül emelkedett maradhat, így a betegfelvételt követően a mintavételt 3-6 óra múlva javasolt megismételni, de további vérvétel is szükséges lehet újabb iszkémiás epizód megjelenésekor. A miokardiális iszkémia fennállása ellenére is lehet negatív a kezdeti érték, így a miokardiális infarktus csak többszöri – legalább két egymást követő időpontban végzett – negatív eredménnyel járó marker vizsgálattal zárható ki [132].

A troponin-koncentráció időbeli változásának nyomon követése rendkívül fontos a hirtelen megemelkedett vagy krónikusan magas koncentrációk közti különbség megállapításához is. Utóbbi a szív struktúráját érintő kórképekkel, például szívelégtelenséggel és bal kamrai hipertrófiával is összefüggésbe hozható. A kardiális troponin szintjének emelkedését az iszkémiás szívbetegségen kívül egyéb kórállapot is okozhatja. Emelkedett troponinszint előfordulhat a szívizomsejtek sérülése nélkül is, például veseelégtelenség, gyulladásos kórképek, nagy testfelületet érintő égési sérülések, tüdőembólia esetén, toxinok hatására és számos más állapotban [133].

Az ép kardiomiocitákból történő "troponinszivárgás" mechanizmusával kapcsolatban egységesen elfogadott elmélet egyelőre nem áll rendelkezésre. Hickman és munkatársainak eredményei szerint a troponinok a sejtek nekrózisa nélkül, csupán az iszkémia hatására is kijuthatnak a keringésbe [134]. Más szerzők a keringésben detektálható alacsony cTnI szintet a miociták folyamatos fiziológiás megújulását kísérő miocita-pusztulással magyarázzák [135]. A veseműködés kulcsszerepét több tanulmány is alátámasztja, Wiessner és munkatársai 50%-kal hosszabb cTnI-féléletidőről számoltak be csökkent vesefunkcióval rendelkező betegeknél, de még ennél is jelentősebb a hatás troponin T esetén [136].

A kiáramlott fehérjék kimutathatóságát a keringő plazmában több tényező eredője határozza meg, úgymint a molekula féléletideje, proteázok hatására történő

37

lebomlása, illetve antigén-specificitásának elvesztése denaturáció, a keringésben előforduló egyéb fehérjékhez történő kötődés vagy poszttranszlációs módosítások következtében. A kutatások során kiderült, hogy a troponinfehérjéket az elhalt izomszövetben rövid idő alatt proteázok hasítják el, ami rövid lebomlási termékek feldúsulásához vezet. A szívizom nekrózisa után a vérben a troponinok intakt formái és proteolítikus fragmensei szabad formában vagy a másik két troponin alegységgel komplexet alkotva fordulnak elő. Legnagyobb mennyiségben cTnT és cTnI-cTnC-komplex, valamint a cTnT-cTnI-cTnC hármas komplex és szabad cTnI detektálható [135, 136]. Kijutásuk után a szabad és komplex formában kötött troponinok egyaránt degradálódnak, végül kiürülnek a vérből. A különböző diagnosztikai módszerekkel eltérő troponinfragmentumok detektálhatók, melyek stabilitása és féléletideje is különbözik, így az egyes molekulák kiürülésének sebessége csak nehezen határozható meg [139].

A klinikai gyakorlatban a troponin I- és T-fehérjék meghatározása iszkémiás tünetek esetén egyformán elterjedt, diagnosztikai és prognosztikus értéküket tekintve nincs szignifikáns különbség. A korábbi tanulmányokban a módszerek érzékenységével és specifikusságával kapcsolatos eredmények kismértékű eltérései valószínűleg a betegpopulációk, analitikai módszerek és a mintakezelés különbségeiből fakadhattak [140, 141]. Rittoo és munkatársai azonban megállapították, hogy a troponin T a szívizmon kívül regenerálódó vázizmokban is kifejeződhet, emiatt a neuromuszkuláris betegségben szenvedőknél normál troponin I-értékek mellett gyakran emelkedett troponin T-szint mérhető. Ezzel szemben a troponin I kizárólag a szívizomban expresszálódik, így a troponin I az AMI diagnosztikában specifikusabb markernek tekinthető [142].

#### 1.9.2. Troponinok detektálási módszerei

Az első specifikus cTnI detektálási módszert Cummins írta le 1987-ben. Ez a RIA-technikán alapuló eljárás az optimalizálást követően 2 napot vett igénybe és 10 ng/ml-es kimutatási határral rendelkezett. Ezt követően Katus és munkatársai cTnT kimutatására alkalmas ELISA-eljárást fejlesztettek ki [143, 144]. A fehérje detektálását a műanyag hordozóhoz rögzített poliklonális anti-troponin-T antitest és a HRP

konjugált, folyadékfázisban lévő monoklonális anti-troponin-T antitest tette lehetővé. Ezzel a módszerrel a 0,5–25 ng/ml tartományban sikerült troponin T-t detektálni, és a kimutatáshoz szükséges időt az eljárás automatizálásával 90 percre sikerült leszorítani. A kardiális troponinok mennyiségi meghatározása a diagnosztikai laborokban jelenleg is "szendvics" típusú immunanalitikai eljárással történik. Több antitest felhasználásával a fehérje-kimutatás érzékenysége és szelektivitása rendszerint növelhető, ezért a hagyományos, két antitest alkalmazásán alapuló mérési módszerek mellett ma már egyre inkább előtérbe kerültek a három vagy akár négy különböző monoklonális antitesttel működő eljárások. Az ellenanyagok előállítása érdekében az állatokat gyakran szintetikus peptidekkel immunizálják, emiatt az epitópok elhelyezkedése a felismerő antitestek többségénél jól ismert. Abban az esetben, ha a teljes hosszúságú fehérjével vagy a komplexszel történt az immunizálás, jó közelítéssel utólag is feltérképezhetők az epitópok.

A legelterjedtebb, szilárd fázisú heterogén típusú metodikáknál a fehérjét egy befogó antitest rögzíti az adott felülethez, míg egy második antitest a detektálást teszi lehetővé. A detektáló antitestek jelölésétől függően radioaktív, kemilumineszcens, fluoreszcens, paramágneses vagy akár elektrokémiai jel is mérhető [145]. A heterogén módszerek mellett homogén immunoassayben is megvalósítható a cTnI kimutatása. A Siemens Diagnostics "Dimension" elnevezésű készülékei a korábban már bemutatott ALPHA-technika elvén működnek [146]. Az egylépéses homogén szendvics típusú mérést két speciális latexgyöngy és a biotinilált troponinspecifikus antitest teszi lehetővé. Az első gyöngy (Chemibead) kemilumineszcens festéket tartalmaz, melynek felületére analitspecifikus antitestet rögzítenek, míg a második gyöngy (Sensibead) fotoszenzitív molekulát tartalmaz, felszíne sztreptavidinnel borított. Az antigén szabad biotinilált antitesthez és a Chemibead-hez kapcsolt antitesthez történő egyidejű kötődése immunokomplex kialakulásához vezet, melyhez a biotin-sztreptavidin közti erős kölcsönhatás miatt a második gyöngy is hozzákapcsolódik. Fény hatására a fotoszenzitív gyöngyből szinglet oxigén diffundál az oldatba, amely végeredményben a másik gyöngy megfelelő közelsége esetén spektrofotometriával detektálható kemilumineszcens reakciót vált ki.

Szabadalmi okok miatt a troponin T automatizált mérése kizárólag egyetlen gyártó, a Roche eszközeivel valósítható meg, ugyanakkor troponin I esetében az évek

39

során több gyártó készüléke is forgalomba került. Emiatt a troponin I diagnosztika területén jelenleg az egyik legnagyobb kihívást az egyes módszerek standardizálása jelenti. A laboratóriumokban használt különféle immunanalitikai rendszerek más-más antitestet alkalmaznak a troponin I detektálására, így az azonos vérmintából eltérő módszerekkel mért troponin I-értékek gyakran egymással nem összevethetők. Egy 2004-ben készített tanulmány szerint a különböző eljárásokkal meghatározott értékek közt több mint hússzoros míg egy korábbi elemzés szerint azonos minták eltérő módszerrel történő meghatározása esetén akár százszoros eltérés is adódhat. Ennek legfőbb oka, hogy eltérő epitóp-specificitásuk miatt a meghatározást jelentősen befolyásoló tényezők – mint például a fehérje kölcsönhatása más fehérjékkel, vagy autoantitestek, heparin jelenléte a vérben – eltérő mértékben hatnak az antitestekre. A különböző eljárásokkal mért troponin I-koncentrációk közti eltérésekért a fehérje extrém instabilitása is felelőssé tehető, mivel a troponin szabad formája a vérben és a nekrotizáló szövetekben rövid idő alatt degradálódik. A vizsgálatok szerint a molekula legstabilabb részének a 28. és 110. aminosav közti régió tekinthető. Azok az antitestek, melyek a stabilis részt ismerik fel, az ép és degradálódott troponin I-hez egyaránt képesek kapcsolódni, ellentétben az instabil régióhoz kötődő antitestekkel. Utóbbiak ezért nem alkalmasak a proteolízis során keletkező troponin fragmentumok detektálására [147]. Mindezeken túl a különbségekhez a diagnosztikai eszközök egyedi inkubálási körülményei, detektálási módszerei és a felhasznált blokkoló reagensek típusai is hozzájárulhatnak.

Az első generációs diagnosztikai készülékek piacra kerülése óta a gyártók az antitest-koncentráció és mintatérfogat növelésével, a megfelelő antitestpárok kiválasztásával, blokkoló reagensek alkalmazásával és további fejlesztésekkel jelentős eredményeket értek el a módszerek érzékenységének növelése terén (11. ábra).



11. ábra: A troponin detektálási eljárások fejlődése [148]

A korábbi módszereknek a kimutatási határa a ng/ml-es tartományba esett, így a mellkasi fájdalom jelentkezése után csak 3-6 órával később tudták az emelkedett troponin-koncentrációt megbízhatóan detektálni, míg a ma használatos rendszerek százszor- vagy akár ezerszer érzékenyebb kimutatást tesznek lehetővé. A detektálási eljárások pontatlansága esetén azonban az alacsony koncentráció tartományban a szignifikáns változások detektálása jóval nehezebb, ezért a nemzetközi ajánlások szerint a troponin detektálási eljárásoknak optimális esetben 10% alatti variációs koefficienssel kell rendelkezniük. A laboratóriumi gyakorlatban leginkább elterjedt, közepes érzékenységű tesztek megbízhatóan detektálják az egészséges referenciapopuláció 99. percentilise feletti troponin-koncentrációt, de a 99. percentilis értéknél a 10%-os variációs koefficienst (CV) csak egy részük éri el [149] (4. táblázat).

A fejlesztéseknek köszönhetően ma már a laboratóriumokban megjelentek az alacsony troponinszintek detektálását lehetővé tevő hs-troponin eszközök is. Az IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) által javasolt definíció szerint a nagy érzékenységű troponin kimutatási módszerek az egészséges populáció több mint 50%ánál, de lehetőleg inkább 95%-ánál is képesek a troponin detektálására [150]. A modern hs-TnI mérési módszerek pg/ml-es kimutatási határral rendelkeznek, vagyis akár a tünetek megjelenése után 1-3 órán belül is felállítható az AMI diagnózisa [151]. Több kutatási fázisban lévő mérési módszerrel a troponinok ultraszenzitív kimutatása is megvalósítható, habár kétséges, hogy bevezetésük a nagy érzékenységű mérésekhez képest további előnyökkel járna-e. A klinikai diagnosztikában a legújabb irányt a betegágy melletti, a direkt ellátási helyre kihelyezhető úgynevezett Point-Of-Care (POC) laboratóriumi vizsgálatokra alkalmas eszközök fejlesztése jelenti. Habár a jelenleg elérhető POC-troponintesztek érzékenysége alacsonyabb a központi laboratóriumban végzett mérésekénél, a további fejlesztések hozzájárulhatnak az akut koronária-szindróma diagnosztikájának korszerűsítéséhez [152].

### 4. táblázat: Troponin I automatizált meghatározására alkalmas rendszerek analitikai jellemzői

C: befogó, D: detektáló antitest (Forrás: http://www.ifcc.org)

Kereskedelmi forgalomban elérhető rendszerek	LOD (ng/l)	99. percentilis (ng/l)	% CV a 99.%- nél	Antitestek által felismert epitópok	Jelölés a detektáló antitesten
Abott Architect	-	28	14	C: 87-91, 24-40 D: 41-49	akridinium
Abott Architect STAT hs-cTnI	1,1- 1,9	26,2	4,0	C: 24-40 D: 41-49	akridinium
Abott i-STAT	20	80	16,5	C: 41-49, 88-91 D:28-39, 62-78	ALP
Alere Triage Cardio 3	10	22	17,0	C: 27-39 D: 83-93, 190-196	fluorofór
Beckman Coulter Access Accu	-	40	14	C: 41-49 D: 24-40	ALP
bioMerieux Vidas Ultra	<10	10	27,7	C: 41-49, 22-29, D: 81-89,	ALP
Mitsubishi PATHFAST cTnI	1	20	5,2	C: 41-49, D: 71-116, 163-209	ALP
Mitsubishi PATHFAST cTnI-II	8	29	5,0	C: 41-49, D: 71-116, 163-209	ALP
Ortho VITROS Troponin I ES	12	34	10,0	C: 24-40, 41-49 D: 87-91	HRP
Radiometer AQT90 FLEX TnI	9,5	23	12,3	C: 41-49, 190-196 D:137-149	európium
Roche cTnI	160	160	-	C: 87-91, 190-196 D: 23-29, 27-43	ruténium
Siemens ADVIA Centaur TnI-Ultra	-	40	8,8	C: 41-49, 87-91 D: 27-40	akridinium
Siemens Dimenson VISTA	-	45	10,0	C: 27-32 D: 41-56	kemilumineszcens
Siemens Stratus CCS cTnI	-	70	10,0	C: 27-32 D: 41-56	ALP

# 2. Célkitűzések

Előnyös tulajdonságaiknak köszönhetően az aptamerek számos területen megfelelő alternatívái lehetnek az antitesteknek, és várhatóan az elkövetkező években egyre nagyobb szerepet kapnak a diagnosztikai eljárásokban is. Munkánk fő célkitűzése az volt, hogy az akut miokardiális infarktus laboratóriumi diagnosztikájában kiemelt fontosságú biomarkert, a kardiális troponin I-t szelektíven felismerő, nukleázrezisztens aptamert, ún. Spiegelmert azonosítsunk, valamint az alkalmazhatóságát megvizsgáljuk komplex biológiai közegben.

PhD-munkám során megvalósítandó feladataim az alábbiak voltak:

- 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;
- SELEX eljárással azonosított szekvenciák előszűrésére alkalmas, nagy áteresztő képességű jelölésmentes módszer fejlesztése
- kardiális troponin I szendvics típusú meghatározásra alkalmas eljárás kidolgozása;
- 6. a kiválasztott Spiegelmer gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata humán szérumban antitest helyettesítő molekulaként.

# 3. Módszerek

A kísérletek során alkalmazott oldatokat az 5. táblázat, az alkalmazott táptalajokat, tápoldatokat a 6. táblázat foglalja össze.

Oldat típusa	Összetétele
DEC DCD Clear Un muffer	26% PEG 8000, 6,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,6 M nátrium-acetát
PEG PCK CleanOp puller	рН 6-7
Laemmli elválasztógél-	1,5 M Tris, 0,4% SDS
puffer	рН 8,8
	1 M Tris, 0,8% SDS
Laemmi tomoritogei-puller	рН 6,8
	0,312 M Tris, 10% SDS, 250 mM DTT, 50% glicerol,
5x Laemmli mintapuffer	0,01% brómfenolkék
	рН 6,8
Blokkoló oldat	5% sovány tejpor, 0,05% Tween-20 1x PBS-ben
A má dana ffa a T	0,3 M Tris, 10% metanol
Anodpuller I.	рН 10,4
A nó deuffor II	25 mM Tris; 10% metanol
Alloupuller II.	pH 10,4
Katádpuffar	25 mM Tris, 40 mM glicin, 10% metanol
Kaloupullel	pH 9,4
	80 g NaCl, 2 g KCl, 15,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12 H <sub>2</sub> O, 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10x PBS	1 liter desztillált vízben
	рН 7,5
	242 g TRIS, 57,1 ml ecetsav, 100 ml 0,5 M EDTA
50x TAE	1 liter desztillált vízben
	рН 8
Borátpuffer	0,1 M bórsav, 0,05 M NaOH
	рН 9,1
Kancsolónuffer	50 mM Tris, 5 mM EDTA
Kapesolopunei	pH 8,5
10x ALPHALisa	250 mM HEPES, 1% kazein, 10 mg/ml Dextrán-500, 5% Triton X-100
Razonios purior	pH 7,4
10x ALPHALisa	250 mM HEPES, 5 M NaCl, 10 mg/ml Dextrán-500, 5% Triton X-100, 5% zselatin
Zociaunos punci	рН 7,4

### 6. táblázat: Táptalajok, tápoldatok

Oldat típusa	Összetétele
LB-tápoldat	1% pankreász emésztett kazein, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, desztillált víz
S.O.C-tápoldat	0.5% élesztőkivonat, 2% tripton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM glükóz ( <b>pH=6,8-7,0</b> )
LB-táptalaj	1% pankreász emésztett kazein, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 2% agar, desztillált víz

Kísérleteink során az alábbi, a 7. és 8. táblázatban feltüntetett oligonukleotidokat használtuk fel.

### 7. táblázat: Felhasznált primerek (Sigma Aldrich)

Primer	PCR-primer szekvenciája (5'-3')
TNNI1 forward	TACTTCCAATCCAATGCAATGCCGGAAGTCGAGAGA
TNNI1 reverse	TTATCC ACTTCCAATGCTATTGTGAGG TCGGAGA
TNNI3 forward	TACTTCCAATCCAATGCAATGGCGGATGGGAGCAGC
TNNI3 reverse	TTATCCACTTCCAATGTCAGCTCTCAAACTTTTTCT
Peu3-NII forward	CACTATAGGGTACACGGAATTCGC
Peu3-reverse	TATAGGAAGGCCGGATAAGACG
SEL2 forward	AGTCTCCGCTGTCCTCCC
SEL2-biotin forward	Biotin-TEG-AGTCTCCGCTGTCCTCCC
SEL2r-biotin reverse	Biotin-TEG-CAGTCACGGCGTCATCCC
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

8. táblázat: Felhasznált oligonukleotidok.

Oligo	Oligonukleotid szekvenciája (5'-3')	Gyártó
DNS-könyvtár	5'-AGTCTCCGCTGTCCTCCC-N <sub>40</sub> -GGGATGACGCCGTGACTG – 3'	IDT
Spiegelmer B10- Biotin	5'-Biotin-TEG- AGTCTCCGCTGTCCTCCCGATGCACTTGACGTATGTCTCACTTT CTTTTCATTGACATGGGATGACGCCGTGACTG – 3'	IBA
Spiegelmer B10- Tiol	5'-Tiol-TEG- AGTCTCCGCTGTCCTCCCGATGCACTTGACGTATGTCTCACTTT CTTTTCATTGACATGGGATGACGCCGTGACTG – 3'	IBA
Spiegelmer A4-Tiol	5'-Tiol-TEG- AGTCTCCGCTGTCCTCCCAGTGCAGGCTGAGTGGGTGGG TGGTGTGGCCACGTTGGGATGACGCCGTGACTG – 3'	IBA
Blokkoló oligo	5' -AGTCTCCGCTGTCCTCCCGAACCAATGCCATGCTATTACGCA ACTACACAACTGCACTGGGATGACGCCGTGACTG – 3'	Sigma- Aldrich
Oligo T	5'-Biotin-TEG-40T – 3'	Sigma- Aldrich

## 3.1. Troponin I-fehérjék előállítása

## 3.1.1. Troponin-gének amplifikációja

A TNNI1-es gént kódoló nukleotid-szekvenciákat kollégám, Dr. Wunderlich Lívius által készített humán vázizom cDNS-könyvtárból (9. táblázat), míg a TNNI3-at régiót szívizom cDNS-könyvtárból kódoló humán polimeráz-láncreakcióval amplifikáltuk (10. táblázat). A kapott termékeket az alábbi eljárással tisztítottuk meg. A PCR-termékekhez azonos térfogatú PCR CleanUp puffert adtunk, a viszkózus oldatot homogenizáltuk, majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően az elegyet 10 percig 13000-es fordulatszámon centrifugáltuk, majd kétszer 95-100%-os etanolt rétegeztünk a csapadékra mosás céljából, és ezután 5 percig ismét a fenti fordulatszámon centrifugáltuk. A centrifugálásokat követően óvatosan leszívtuk a csapadékról az etanolt. A második mosás után a csapadékot levegőn megszárítottuk, majd 20 µl desztillált vízben feloldottuk. Végül 2 µl DNS-oldatot agarózgélben elválasztva ellenőriztük a PCR-termékek jelenlétét.

,	TNNI1 PCR	
Ciklusszám	PCR-program	Reakcióelegy
1	95 °C 2 min	5 µl Pfu-polimeráz puffer (Thermo Fisher Scientific)
	95 °C 10 sec	36,5 µl ultratiszta víz
35	50 °C 20 sec	1 µl 10 mM dNTP-mix (Thermo Fisher Scientific)
	72 °C 1 min 40 sec	2,5 µl 10 µM TNNI1 reverse primer
1	72 °C 5 min	2,5 µl 10 µM TNNI1 forward primer
		0,5 µl 2,5 U/µl koncentrációjú Pfu-polimeráz enzim
		(Thermo Fisher Scientific)
		Templát: 2 µl 50x-re hígított vázizom cDNS-könyvtár
		Végtérfogat: 50 μl

9. táblázat: A TNNI1-gén amplifikációjának körülméi	ıyei
---	------

	TNNI3 PCR	
Ciklusszám	PCR-program	Reakcióelegy
1	95 °C 2 min	5 µl Pf-polimeráz puffer (Thermo Fisher Scientific)
	95 °C 10 sec	36,5 µl ultratiszta víz
35	46 °C 20 sec	1 μl 10 mM dNTP-mix (Thermo Fisher Scientific)
	72 °C 1 min 40 sec	2,5 µl 10 µM TNNI3 reverse primer
1	72 °C 5 min	2,5 µl 10 µM TNNI3 forward primer
		0,5 µl 2,5 U/µl koncentrációjú Pfu-polimeráz enzim
		(Thermo Fisher Scientific)
		Templát: 2 µl 50x-re hígított szívizom cDNS-könyvtár
		Végtérfogat: 50 µl

#### 10. táblázat: A TNNI3 gén amplifikációjának körülményei

## 3.1.2. Agaróz gélelektroforézis

Kísérleteink során nukleinsav-fragmensek elválasztására a agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk. A 0,8%-os agarózgél készítéséhez egy üvegedénybe 0,12 g agarózt és 15 ml 1×TAE oldatot mértünk be, majd az edényt mikrohullámú sütőbe helyeztük, forralásig melegítettük, és a viszkózus oldatot az agaróz feloldódásáig kevertük. Az elektroforézis készülék géltartó tálkájába beleállítottuk a minta felvitelére szolgáló zsebek kialakításához szükséges fésűt. Ezt követően az agarózt a tálkába öntöttük, majd a gél megszilárdulása után a tálkát az elektroforézis tankba helyeztük. A mintákhoz 6x-os töménységű mintapuffert adtunk, ezután a zsebekbe mértük a mintákat, és az elektroforézist TAE-pufferben 100 Volt egyenfeszültség mellett mintegy 30 percig végeztük. A gélben méret szerint elválasztott DNS-t GelGreen DNSinterkalálódó festékkel (Biotium) tettük láthatóvá.

#### 3.1.3. Vektorkonstrukciók létrehozása ligálásfüggetlen klónozással

A TEV proteáz hasítóhelyet tartalmazó, glutation-S-transzferázzal fúzionáltatott rekombináns fehérjék termeltetésére használható pEU3GLIC transzlációs vektorok (12. ábra) 5 µg-ját FastDigest Ssp1 restrikciós enzimmel 30 percig 37 °C-on FastDigest pufferben inkubáltuk. Az emésztést követőn a felhasított és kis mennyiségben még cirkuláris plazmidot is tartalmazó reakcióelegyet mintegy 4 órán keresztül 50 Volt feszültség mellett 0,8%-os agarózgélen választottuk el, majd a gél festése után a gélből kivágott linearizált plazmidot tartalmazó darabból gélextrakciós készlet (Thermo Fisher Scientific) segítségével a gyártó által javasolt protokoll szerint DNS-t izoláltunk. Ezt követően a linearizált vektorból 1 µg-ot és mindegyik tisztított PCR-termékből 500 ng-ot kezeltünk 1 U T4 DNS-polimerázzal a vektorok esetén 1 mM dGTP, a PCR fragmens esetén 1 mM dCTP-t tartalmazó T4 DNS-polimeráz pufferben. 37 °C-on 10 percig történő inkubálást követően a reakcióelegyet 20 percig 75 °C-on tartva inaktiváltuk az enzimet. A T4-kezelt vektorokat -20 °C-on fagyasztva tároltuk a további felhasználásig. A ligálásfüggetlen klónozás során a T4-kezeléssel előkészített pEU3GLIC vektort és a klónozandó TNNI1- valamint TNNI3-fragmenseket 1:3 moláris arányban összemértük, 5 mM EDTA-val 12,5 µl végtérfogatra egészítettük ki, és 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezután az eleggyel laboratóriumunkban készített E. coli XL10-Gold kompetens sejteket transzformáltunk.



12. ábra: GST-jelöléssel ellátott fehérjék előállítására alkalmas pEU3GLIC plazmid

#### 3.1.4. Kompetens sejtek transzformálása

A -80 °C-on tárolt kémiai kompetens baktériumsejteket tartalmazó szuszpenziót jégen felolvasztottuk, 50 µl-éhez 6 µl transzformációs elegyet adtunk, és 20 percen keresztül jégen tartottuk, majd 1 percre 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük. Ezután steril fülke alatt hozzáadtunk 500 µl S.O.C. tápoldatot, és 60 percig 37 °C-on intenzíven rázatva növesztettük a sejteket. Az inkubáció után 5000 *g*-vel lecentrifugáltuk a szuszpenziót, és 350 µl-t leszívtunk a felülúszóból. A sejteket végül óvatosan felszuszpendáltuk a maradék médiumban, majd 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó LB-táptalaj felszínére szélesztettük, és 37 °C-on egy éjszakán keresztül növesztettük.

#### 3.1.5. Pozitív kolóniák kiválasztása és a plazmidok előkészítése

Az egy éjszakán át tartó 37 °C-os inkubálás után a kinőtt telepekről kolónia-PCR segítségével igazoltuk, hogy tartalmazzák-e a megfelelő plazmidokat. Az egyes telepekből kis mennyiséget közvetlenül a vektorspecifikus primereket tartalmazó PCR elegybe szuszpendáltunk (11. táblázat), majd az amplifikáció után a termékeket 0,8%-os agaróz gélen választottuk el. A termék mérete alapján pozitívnak bizonyuló kolóniákat 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó LB-médiumba inokuláltuk, és 37 °C-on rázatva egy éjszakán át növesztettük, majd ezt követően *MiniPrep* készlet (*Thermo Fisher Scientific*) segítségével plazmidot izoláltunk. Ellenőrzés céljából a plazmidokat megfelelő restrikciós enzimekkel emésztettük, és a keletkező DNS-fragmenseket agaróz gélen választottuk el. A restrikciós emésztések során felhasznált enzimeket és azok hasítási helyeit a 12. táblázat foglalja össze. A kiválasztott klónokból *MidiPrep* készlettel (*Quiagen*) a gyártó utasításainak megfelelően nagyobb mennyiségű plazmidot izoláltunk és a továbbiakban azokat használtuk fel templátként az mRNS *in vitro* transzkripcióval történő előállításához. Az elkészített plazmidpreparátumok nukleinsav-tartalmát *NanoDrop* spektrofotometriás készülékkel határoztuk meg.

#### 11. táblázat: Kolónia-PCR körülményei

]	Kolónia PCR	
Ciklusszám	PCR program	Reakcióelegy
1	98 °C 5 min	10 µl 2x PCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific)
	98 °C 10 sec	8 μl ultratiszta víz
30	50 °C 10 sec	1 μl 10 μM <i>peu3 forward</i> primer
	72 °C 1 min 20 sec	1 μl 10 μM <i>peu reverse</i> primer
1	72 °C 3 min	Templát: a konstrukciót tartalmazó mikrobatelep
		a reakcióelegybe szuszpendálva
		Végtérfogat: 20 µl

#### 12. táblázat: Felhasznált FastDigest restrikciós enzimek (Thermo Fisher Scientific)

Enzim	Specifikus felismerési és hasítási hely
SanI	5'A A T^A T T3'
Sspi	3'T T A^T A A5'
Cogl	5'A G T^A C T3'
Scal	3'T C A^T G A5'
Angl	5'G G G C C^C3'
Арат	3'C^C C G G G5'
EccDI	5'G^A A T T C3'
ECORI	3'C T T A A^G5'

#### 3.1.6. mRNS előállítása in vitro transzkripcióval

Előzetes kísérleteink azt bizonyították, hogy a laboratóriumunkban használt *in vitro* transzkripciós rendszerben az mRNS-szintézis eredményesebb, ha a templátként szolgáló cirkuláris plazmidokat előzőleg restrikciós enzimmel linearizáljuk. Ennek megfelelően a plazmidpreparátumok mindegyikéből 5-5 µg-ot 20 µl végtérfogatban *ScaI* restrikciós enzimmel FastDigest pufferben 37 °C-on mintegy 10 percig emésztettük. Az emésztés eredményességét 200 ng-nyi plazmidot tartalmazó oldat 0,8%-os agarózgélen történő futtatásával ellenőriztük.

Az mRNS-ek szintéziséhez az *AmpliScribe T7 Flash (Epicentre)* transzkripciós készletet használtuk. A reakcióelegyet a 13. táblázatnak megfelelően állítottuk össze, majd 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáltuk, végül az átírt RNS minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az mRNS tisztítása során 20 µl transzkripciós oldathoz 330 µl steril desztillált vizet, 55 µl 7,5 M ammónium-acetátot, 875 µl hideg absz. etanolt adtunk, és az elegyet kevertetés után 15 percig jégen tartottuk. Ezután 4 °C-on, 13000 rpm fordulatszámon, 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A csapadékot 1 ml hideg absz. etanollal, az Eppendorf-csövet néhányszor megforgatva mostuk, és az előzőekkel egyező módon ismét lecentrifugáltuk. A mosási lépést megismételtük, és a centrifugálás után a maradék etanolt eltávolítottuk. Végül a csapadékot steril fülke alatt 5 percig szárítottuk, ezt követően 20 µl *Sub-Amix (CFScience)* oldatban felszuszpendáltuk.

Komponens	Mennyiség
Nukleázmentes víz	x µl
Linearizált templát-DNS	1 μg
10X AmpliScribe T7 reakciópuffer	2 µl
100 mM ATP	1,8 µl
100 mM CTP	1,8 µl
100 mM GTP	1,8 µl
100 mM UTP	1,8 µl
100 mM DTT	2 µl
RNáz-inhibitor	0,5 µl
AmpliScribe T7 enzimoldat	2 µl
Végtérfogat	20 µl

#### 13. táblázat: Az in vitro transzkripciós elegy komponensei

#### 3.1.7. Fehérjék előállítása in vitro transzlációval

A célfehérjék előállítása búzacsíra alapú, kétrétegű *in vitro* transzlációs rendszerrel történt (*ENDEXT Wheat Germ Expression Kit, CFScience*). Elsőként a tisztított mRNS-oldatból 5 µl-t felhasználva elkészítettük a búzacsíra-kivonatot tartalmazó WEPRO Mixet (14. táblázat). A transzlációs reakció kivitelezéséhez 206 µl 1xSub-Amix tápláló oldatot pipettáztunk a mikrotiter tálca egyik kamrájának aljára, ezután óvatosan alárétegeztük a WEPRO Mixet (13. ábra). Ezt követően a lemezt lefedve 20 órán keresztül 20 °C-on inkubáltuk, majd az inkubációs idő letelte után a homogénné váló elegyet Eppendorf-csőbe pipettáztuk, és a további felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A transzláció hatékonyságát SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük, amelynek során 5 µl transzlációs mintát akrilamid gélen választottunk el, végül Coomassie kék festéssel tettük láthatóvá a fehérjék sávjait. A GST-vel jelölt troponin I-fehérjék termelődését immunoblot-technikával is igazoltuk.

Komponens	Mennyiség
Sub-Amix aminosav keverék	5 µl
mRNS	~15 µg (5µl)
Kreatin-kináz (1 mg/ml)	0,8 µl
WEPRO búzacsíra-kivonat alapú transzlációs elegy	10 µl
Végtérfogat	<b>20,8 μl</b>

#### 14. táblázat: A transzlációs WEPRO MIX összeállítása



**13. ábra: A kétrétegű transzlációs reakció kivitelezése.** A narancssárga szín a transzlációs elegyet, a kék szín a tápláló oldatot jelöli

#### 3.1.8. Fehérjék detektálása Coomassie festéssel

Munkám során a szétválasztandó fehérjék molekulatömegének megfelelően a gélelektroforézis során 10% illetve 12%-os poliakrilamid gélt használtunk fel (15. táblázat). Az elkészített elegyet az előzőleg alkohollal zsírtalanított kerámia és üveglap közé pipettáztuk, pár csepp butanol-víz elegyet rétegeztünk rá, majd szobahőmérsékleten hagytuk megszilárdulni. A polimerizáció után a butanolt desztillált vízzel mostuk ki, majd elkészítettük a tömörítő gél oldatot, amit aztán a szeparáló gélre rétegeztünk (16. táblázat). Miután a gél megdermedt, a fésűt eltávolítottuk, és a zsebeket óvatosan kimostuk desztillált vízzel. A futtatás előtt a mintákhoz 5x töménységű Laemmli mintapuffert adtunk, majd 5 percig, 95 °C-os vízfürdőben denaturáltuk őket. A gélelektroforézishez 1x SDS Laemmli futtatópuffert (*Serva*) használtunk fel, és az elválasztást 20 mA áramerősséggel, 200 V maximális feszültségen végeztük addig, amíg a festékfront ki nem futott a gélből a pufferoldatba. Ezután a gélt desztillált vízzel öblítettük le, végül pedig *PageBlue* festékoldatba (*Thermo Fisher Scientific*) helyeztük, és mikrohullámú sütőben 30 mp-ig forraltuk. A 20 percig szobahőmérsékleten történő festődés után a háttérben kötődő festéket desztillált vízzel mostuk ki.

	15.	táblázat:	Az elválasztó	gél	összetétele	eltérő	akrilamid	koncentrációk	esetén
--	-----	-----------	---------------	-----	-------------	--------	-----------	---------------	--------

Komponensek	10%-os gél	12%-os gél
ultratiszta víz	2,45 ml	2,15 ml
40% Akrilamid mix	1,3 ml	1,5 ml
Laemmli elválasztó gél puffer	1,3 ml	1,3 ml
10%-os ammónium-perszulfát	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Komponensek	
ultratiszta víz	1,44 ml
40% -os akrilamid mix	260 µl
Laemmli tömörítő gél puffer	280 µl
10%-os ammónium-perszulfát	20 µl
TEMED	2 µl

### 16. táblázat: A tömörítő gél összetétele

#### 3.1.9. Fehérjék detektálása Western blot módszerrel

A transzferálás előtt elkészítettük a szükséges oldatokat, és a géllel megegyező nagyságú szűrőpapírdarabokat itattunk át velük. A blottoláshoz PVDF-membránt használtunk, amelyet előzőleg metanollal nedvesítettünk meg. A fehérjék 1,5 mm vastagságú akrilamid gélen való elektroforetikus elválasztása után a blot komponenseit a 14. ábrán feltüntetett sorrendben egymásra rétegeztük, és a félszáraz blottoló készüléket óvatosan összeillesztettük, úgy, hogy az egyes rétegek ne mozduljanak el. A transzferálást fél órán keresztül végeztük, az áramerősséget a membrán alapterületének négyszeresével megegyező mA értékűre állítottuk. A blottolást követően a membránt 5%-os tejpor tartalmú PBS-oldatban blokkoltuk 1 órán keresztül.



14. ábra: A félszáraz blottoláshoz szükséges komponensek elrendezése

A GST-vel jelölt fehérjéket rögzítő membránt az első, nyúlban termeltetett anti-06-332) GST ellenanyaggal (Upstate *Biotechnology:* 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, enyhe rázatás mellett. Ezt követően háromszor 10 percig mostuk 0,2% Tween 20-at tartalmazó PBS-oldattal, majd a másodlagos, HRPkonjugált anti-nyúl ellenanyaggal (Santa Cruz Biotechnology: sc-2030) is 1 órát inkubáltuk, és ismét 3x10 perces mosás következett. Az elsődleges ellenanyagot 2000szeres, míg a másodlagos ellenanyagot 5000-szeres hígításban alkalmaztuk. Végül PBSoldattal leöblítettük a membránokat, a SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) két reagenséből 1-1 ml-t pipettáztunk rájuk, és 5 percnyi várakozás után áttetsző műanyag fóliába csomagoltuk őket. Az enzimatikus reakció lejátszódására utaló kemilumineszcens fényt néhány perces exponálási idő után röntgenfilmen detektáltuk.

## 3.2. cTnI-specifikus Spiegelmerek szelekciója és vizsgálata

### 3.2.1. A D-peptid kovalens kapcsolása

A ciszteint tartalmazó peptid tárolás közben könnyen oxidálódhat, így elsőként a peptid redukálását végeztük el. 500 µg CdAdYdAdTdEdPdHdAdK szekvenciájú D-peptidet (*Bio Basic Inc.*) 100 µl 0,1 M borátpufferben oldottuk fel, majd frissen készített 0,1 M-os nátrium-borohidrid-oldatból 100 µl-nyit adtunk a peptidoldathoz. Az elegyet 5 percig jégen inkubáltuk, majd újabb 100 µl borohidrid-oldatot adtunk az elegyhez. A nátrium-borohidrid feleslegét HCl hozzáadásával elimináltuk, melynek során az elegy pH-ját 1,0 N sósav segítségével 2-3 körülire állítottuk, majd végül a kapcsolási reakciót megelőzően a pH-t NaOH-dal neutrális értékre állítottuk. Közvetlenül ezután a peptidet a

redukált ciszteinen keresztül autoreaktív SiMAG-Bromoacetil paramágneses gyöngyhöz *(Chemicell)* kovalensen kapcsoltuk. 100 µl gyöngyöt 3x1 ml kapcsolópufferben mostunk, majd mágneses állvány segítségével elválasztottuk a gyöngyöket, a felülúszót leszívtuk, hozzáadtuk a redukált tiol-csoportot tartalmazó oldatot és 15 percig szobahőmérsékleten kevertettük. A módosított gyöngyöket 2×1 ml kapcsolópufferrel mostunk, majd mágneses állványon szeparáltuk, és 500 µl 50 mM-os ciszteinoldatot hozzáadva újra 15 percig szobahőmérsékleten kevertettük. A ciszteines blokkolási lépést követően a felülúszót leszívtuk, és a gyöngyöket 1 ml 0,02% nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk fel, majd felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A kapcsolás hatásfokát Ellmann-reagenssel ellenőriztük [153].

#### 3.2.2. Spiegelmerek szelekciója

A Spiegelmerek szelekciójához a mintegy 10<sup>14</sup>-féle nukleotid-szekvenciát (IDT) oligonukleotid-könyvtárat használtuk fel. А könyvtár tartalmazó oligonukleotidjainak 40 random nukleotidból álló középső szakaszát 18 nukleotid hosszúságú, rögzített szekvenciájú primerrégiók határolják. A DNS-szekvenciákban kialakult másodlagos struktúrák megszüntetésének érdekében a szelekciót megelőzően a könyvtárat 95 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd jégen lehűtöttük. Ezután 10 µl 1 nmol DNS-t tartalmazó oligonukleotid-könyvtárhoz EDTA-t, valamint annyi BSA-t adtunk, hogy végkoncentrációjuk 10 mM illetve 10 mg/ml legyen, és PBS-oldattal 2 ml végtérfogatra hígítottuk. A peptidet hordozó mátrixhoz vagy a ciszteinhez kötődő szekvenciák eltávolítása céljából az elegyet elsőként peptid nélküli, ciszteinnel blokkolt gyönggyel 1 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük, majd a felülúszót leszívtuk, és a bromoacetiles gyöngyhöz kapcsolt 5 µg-nyi peptiddel további 1 órát termosztáltuk. Az inkubációs idő leteltével a gyengén vagy egyáltalán nem kötődött DNS-szekvenciákat 3x100 µl PBS-oldattal történő mosással távolítottuk el. Ezt követően a gyöngyöket 65 µl desztillált vízben felszuszpendáltuk és 95 °C-on 5 perc forralással eluáltuk a peptidhez specifikusan kötődő oligonukleotidokat. A Spiegelmerek enantiomerjeit tartalmazó felülúszót a továbbiakban a PCR-reakció összeállításához templátként használtuk fel. Az első polimeráz-láncreakció során 15 ciklust alkalmaztunk a 17. táblázatban feltüntetett körülményeknek megfelelően.

	SELEX PCR	
Ciklusszám	PCR-program	Reakcióelegy
1	95 °C 5 min	20 µl 5x HF puffer ( <i>BioRad</i> )
	95 °C 10 sec	65 μl templát
15	63 °C 10 sec	4 μl 10 mM CleanAmp dNTP- mix (TriLink)
	72 °C 10 sec	5 μl 10 μM SEL2-biotin <i>reverse</i> primer
1	72 °C 2 min	5 μl 10 μM SEL2 <i>forward</i> primer
		1 µl 2 U/µl koncentrációjú iProof polimeráz enzim (BioRad)
		Végtérfogat: 100 µl

17. táblázat: Az aptamer-szelekció során alkalmazott PCR-reakció körülményei

A PCR-reakció eredményességét a korábban már ismertetett módon gélelektroforézissel ellenőriztük, amelynek során az elegyből 10 µl-t 2 µl 6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) mintafelvivő pufferrel kiegészítve 3%-os agaróz gélen választottunk el. A PCR-termékek méretének becsléséhez Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) molekulatömeg-markert alkalmaztunk. Ezután a PCRtermékből 5 µl-t félretettünk, amit a továbbiakban -20 °C-on tároltunk, és a maradék terméket sztreptavidin mágneses ágyon NaOH-dal egyszálúsítottuk. A folyamat során a kétszálú terméket SiMAG–Streptavidin (Chemicell) mágneses gyöngyre immobilizáltuk, a kapcsolás után a felülúszót eltávolítottuk, és a gyöngyöket háromszor 150 µl PBS-oldattal mostuk. A biotint nem tartalmazó komplementer DNS-szálakat ezután 100 µl frissen készített 100 mM-os NaOH oldattal 5 percig eluáltuk. Az eluált egyszálú DNS-t tartalmazó oldat pH-ját 15 µl 1 M-os NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oldattal állítottuk vissza 7-esre, és a SELEX következő ciklusához használtuk fel.

A feldúsított könyvtárat ismét a célmolekulával inkubáltuk, majd megismételtük a mosási, amplifikációs és egyszálúsítási lépéseket. Az 5. ciklusban a peptid nélküli, ciszteinnel blokkolt gyönggyel ismét negatív szelekciót alkalmaztunk. Az összesen 9 ciklusból álló Spiegelmer SELEX során a fehérje mennyiségét és az inkubálási időt fokozatosan csökkentettük, továbbá egyre intenzívebb mosással próbáltuk a szelektált oligonukleotidok affinitását növelni. Ennek megfelelően az utolsó ciklusban 1 µg-nyi peptidet 15 percig termosztáltunk a könyvtárral és háromszor 5 percen keresztül PBS- sel mostuk. A PCR-hez biotin jelölés nélküli reverz primert alkalmaztunk, és az amplifikált DNS-t 3%-os agarózgélen futtattuk meg, majd a megfelelő méretű terméket gélextrakciós készlet segítségével izoláltuk, majd a kitisztított terméket pCR-Blunt-II TOPO vektorba ligáltuk. A ligálási reakcióhoz a Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit-et (*Thermo Fisher Scientific*) használtuk, és 4 µl friss PCR termék, 1 µl sóoldat (NaCl, MgCl<sub>2</sub>), 1 µl vektor (15. ábra) összemérése után az elegyet 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a ligálási elegyet OneShot Top10 (*Thermo Fisher Scientific*) kompetens sejtekbe transzformáltuk, végül a sejteket 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB-agarra szélesztettük. Éjszakán át tartó 37 °C-os inkubálás után a kinőtt telepek esetében kolónia-PCR segítségével igazoltuk, hogy a plazmidok tartalmazzák-e a megfelelő méretű inszertet. Az egyes telepekből kis mennyiséget közvetlenül a vektorspecifikus M13 forward és reverse primereket tartalmazó PCR-elegybe szuszpendáltunk (18. táblázat), majd az amplifikáció után a termékeket 2%-os agarózgélen választottuk el. A PCR termékből 10 µl-t futtattunk meg, majd a gélképek kiértékelése után 85 kolóniát választottunk ki és küldtünk el szekvenálásra.



15. ábra: A szelekciót követő TOPO klónozáshoz felhasznált plazmid

TOPO-Kolónia PCR				
Ciklusszám	PCR-program	Reakcióelegy		
1	98 °C 5 min	10 µl 2x PCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific)		
	∫ <sup>98</sup> °C 10 sec	$8 \ \mu l \ dH_2O$		
30	50 °C 10 sec	1 µl 10 µM M13 <i>forward</i> primer		
	72 °C 1 min 20 sec	1 µl 10 µM M13 reverse primer		
1	72 °C 3 min	templát: a konstrukciót tartalmazó mikrobatelep		
		a reakcióelegybe szuszpendálva		
		Végtérfogat: 20 μl		

	18.	táblázat:	Aptamer	szelekciót	követő	kolónia	PCR	paraméterei
--	-----	-----------	---------	------------	--------	---------	-----	-------------

## 3.2.3. D-oligomerek amplifikálása

A szelektált D-oligomerek és a D-peptid kölcsönhatásának vizsgálatához az egyes kolónia-PCR-eket templátként használva amplifikáltuk fel az oligomereket (19. táblázat). Az SPRi (*HORIBA Jobin Yvon*) méréseket és az eredmények kiértékelését Dr. Lautner Gergely a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékének munkatársa végezte el.

19. táblázat: D-oligomerek PCR amplifikációjának körüln	nényei
---	--------

D-oligomerek amplifikálása				
Ciklusszám	PCR-program	Reakcióelegy		
1	98 °C 5 min	100 µl 2x PCR MasterMix (Thermo Fisher Scientific)		
	98 °C 10 sec	76 μl ultratiszta víz		
25	58 °C 10 sec	10 µl 10 µM SEL2-biotin forward primer		
	72 °C 1 min	10 μl 10 μM SEL2 reverse primer		
1	72 °C 3 min	templát: 4 µl 20x-ra hígított kolónia PCR termék		
		Végtérfogat: 200 μl		

#### 3.2.4. Antitest konjugálása Protein A akceptor gyöngyhöz

A 250  $\mu$ g Protein A akceptorgyöngyöt (*Perkin Elmer*) tartalmazó szuszpenzióhoz 50  $\mu$ l PBS-t adtunk, majd 16000 × g-n 4 °C-on 15 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a gyöngyöt 200  $\mu$ L PBS-sel megmostuk és ismét lecentrifugáltuk. A felülúszó leszívása után 10  $\mu$ g monoklonális cTnI antitestet (*Hytest:4T21/Mab 267*) adtunk hozzá, majd az elegy térfogatát ezután PBS-sel 100  $\mu$ l-re egészítettük ki. 2 órás szobahőmérsékleten történő inkubálás után a gyöngyöt ismét lecentrifugáltuk és 200  $\mu$ l 0,2 M trietanolamin-oldattal (pH 8,2) mostuk. A mosóoldat eltávolítása után a gyöngyöt 200  $\mu$ l frissen készített 20 mM DMP-t (dimetil-pimelimidát dihidroklorid) tartalmazó kapcsolópufferben 30 percig 20 °C-on enyhén rázattuk. Az inkubálás után a gyöngyöt lecentrifugáltuk, a DMP-t tartalmazó felülúszót eltávolítottuk, majd a reakciót 200  $\mu$ l 50 mM Tris (pH 7,5) hozzáadásával állítottuk le. 15 perc után a keresztkötött antitest-Protein A-akceptorgyöngy komplexet kétszer PBS-sel mostuk, és végül 50  $\mu$ l PBS-ben feloldottuk. A gyöngyök aggregálódásának elkerülése érdekében a szuszpenziót alacsony teljesítménnyel rövid ideig néhányszor szonikáltuk, majd felhasználásig 4 °C-on sötétben tároltuk.

## 3.2.5. ALPHA-mérések

Az oligonukleotid-fehérje kölcsönhatást laboratóriumunkban ALPHAmódszerrel vizsgáltuk, melynek során a fluoreszcens jelet Perkin Elmer Enspire 2300 készülék segítségével detektáltuk. A mérésekhez fehér színű, 96 lyukú ALPHAPlate mikrotitrációs lemezt használtunk, amelyet az inkubációs idő és a mérés alatt öntapadós fóliával fedtünk le, hogy megakadályozzuk az oldatok párolgását. A reagensek összemérését, inkubációját és a mérést sötétszobában, maximum 40 lux erősségű zöld fénynél végeztük. A mérések során a lemezek kamráiba 40 µl össztérfogatban mértük össze a különböző komponenseket. Elsőként az oligonukleotidokat és a fehérjéket a megfelelő akceptorgyönggyel 1 órán keresztül sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk. A következő lépés során sztreptavidinnel borított donor gyöngyöt adtunk az elegyhez, majd 50 percig inkubáltuk. Végül a mérést megelőzően a lemezt még újabb 10 percig 27 °C-on a készülékben termosztáltuk. Az ALPHA-méréseknél alapesetben 20 μg/ml koncentrációban adtuk az elegyhez a gyöngyöket. Az antitesttel konjugált akceptorgyöngyből körülbelül 30 μg/ml-es koncentrációt alkalmaztunk. A szérumban történő mérésekhez humán troponinmentes szérumot (*Hytest:8TFS*) használtunk 10x-es hígításban, melyet az adott kísérletnek megfelelően humán Troponin I-T-C komplexszel (*Hytest: 8T62*), humán vázizom eredetű Troponin I-vel (*Hytest: 8T25*) vagy rekombináns cTnI-vel (*Abcam: AB50803*) egészítettünk ki.

## 4. Eredmények

#### 4.1. Vektorkonstrukciók létrehozása ligálásfüggetlen klónozással

A laboratóriumunkban szelektált Spiegelmerek vizsgálatához a troponin fehérjéket sejtmentes, *in vitro* transzlációs módszerrel kívántuk előállítani, amelynek előfeltétele volt a vektorkonstrukciók létrehozása. A vázizom eredetű troponin I fehérjét kódoló TNNI1-gén amplifikációjához humán vázizom cDNS-könyvtárat, míg a szívizom troponin I-t kódoló TNNI3-gén amplifikációjához humán szívizom cDNSkönyvtárat használtunk templátként. A sikeres polimeráz-láncreakció kivitelezéséhez szükség volt néhány paraméter optimalizálására, köztük a templát és a primerek koncentrációjának, a primerek tapadási hőmérsékletének változtatására. Ezek eredményeképp az "Anyagok és módszerek" fejezetben ismertetett körülményeknek megfelelően Pfu-polimerázzal sikerült a célgéneket megfelelő hatékonysággal, aspecifikus termékek nélkül felszaporítani (16. ábra).



**16. ábra: A célgének amplifikációja PCR-technikával.** A PCR termékek tisztítása után az oldatok 2 μl-ét 0,8%-os agarózgélen TAE-pufferben megfuttattuk. A gélt ezután GelGreen festékkel festettük, és GelDoc készülékkel fotóztuk. M: 1 kbp-os DNS létra; 1: sTnI-t kódoló fragmentum; 2: cTnI-t kódoló fragmentum

A szív és vázizom eredetű troponin I-fehérjéket kódoló régiókat ligálásfüggetlen klónozással illesztettük a laboratóriumunkban kifejlesztett és rutinszerűen használt, pEU3GLIC *in vitro* transzlációs vektorba. A fragmensek jelenlétének ellenőrzésére *pEU reverse* és *pEU3—NII forward* primerek alkalmazásával kolónia-PCR-t hajtottunk végre. Az sTnI gént hordozó plazmidok esetében a PCR-reakció eredményeképp 1526

bp-nyi, cTnI-nél 1595 bp hosszúságú termékeket vártunk. Az ellenőrzött kolóniák többségében a megfelelő méretű terméket detektáltuk. A kolónia PCR alapján pozitívnak bizonyuló kolóniák közül egyet-egyet kiválasztottunk, és antibiotikumot tartalmazó LB-tápoldatba inokuláltuk. A sejtkultúrákat éjszakán át növesztettük, majd plazmidpreparátumokat készítettünk. A plazmidkonstrukciókat restrikciós endonukleáz kezeléssel ellenőriztük. A pEU3GLIC\_sTnI plazmidot *ApaI*, a pEU3GLIC\_cTnI plazmidot *EcoRI* enzimmel emésztettük. A plazmidok agaróz-gélelektroforézisét követően sTnI esetében 220, 575 és 4213, míg cTnI-nél 2025 és 3052 bázispár méretű termékeket vártunk. A restrikciós emésztéssel nyert fragmentumok nagysága mindkét esetben megegyezett a *CloneManager sz*ámítógépes szoftverrel számított értékekkel (17. ábra). A restrikciós emésztéseket követően szekvenálással is megerősítettük a létrehozott konstrukciók helyességét, amelyeket a továbbiakban az *in vitro* transzkripció templátjaiként alkalmaztunk.



17. ábra: A cTnI fehérjéket kódoló, emésztett plazmidok agarózgélelektroforézise. A restrikciós emésztés után 200 ng-nyi DNS-t tartalmazó elegyet, valamint 200 ng-nyi emésztetlen plazmidot minta pufferrel egészítettünk ki, és 0,8%-os agarózgélen TAE-pufferben megfuttattunk. A pEU3GLIC\_sTnI konstrukció emésztésénél 3 fragmentum keletkezett, melyek közül a legkisebb (220 bp-os) már nem látszik a gélben. M: 1 kbp-os DNS létra; 1: pEU3GLIC\_cTnI cirkuláris plazmid; 2: pEU3GLIC\_cTnI *EcoRI* enzimmel emésztve; 3: pEU3GLIC\_sTnI cirkuláris plazmid; 4: pEU3GLIC\_sTnI *ApaI* enzimmel emésztve

#### 4.2. mRNS előállítása *in vitro* transzkripcióval

Előzetes kísérleteink azt mutatták, hogy az in vitro transzkripció hatékonysága fokozható az inszertet tartalmazó cirkuláris vektorok linearizálásával. Ennek megfelelően olyan restrikciós enzimet választottunk, amely a konstrukciókat a troponint kódoló géneken kívül, egy helyen hasítja el. Az Scal-endonukleázzal történő linearizálás eredményességét agaróz-gélelektroforézissel igazoltuk, a kezelt vektor mindkét esetben a várakozásoknak megfelelően lassabban vándorolt a gélben, mint a kezeletlen cirkuláris. A sikeres vektorhasítást követően a linearizált konstrukciókkal végrehajtottuk a transzkripciót. A reakcióelegyet az AmpliScribe T7 Flash transzkripciós készlet leírását követve, az anyagok és módszerek fejezetben részletezett módon állítottuk össze. Az ellenőrzés során azt vizsgáltuk, hogy a transzkripciós elegyben nincs-e RNS-degradációra utaló RNS-termék (18. ábra). Az ábrán látható, hogy a nagy mennyiségben keletkezett mRNS egyik esetben sem degradálódott, mert nem látható 1 kbp-nál kisebb termék, így a reakció termékei alkalmasak voltak az in vitro transzlációra. Az mRNS-t a már ismertetett módon tisztítottuk, hogy megszabaduljunk az elegyben jelenlévő egyéb komponensektől. Az eljárás eredményességét szintén gélelektroforézises módszerrel követtük nyomon.



18. ábra: Vektorkonstrukciók és az átírt mRNS agaróz-gélelektroforézise. A restrikciós emésztés után 1 μl-t a transzkripciós elegyből és 200 ng-nyi plazmid DNS-t tartalmazó elegyet mintapufferrel egészítettünk ki, és 0,8%-os agaróz gélen TAE-pufferben szeparáltunk. M: 1 kbp-os DNS létra; 1: pEU3GLIC\_cTnI plazmidról átírt mRNS; 2: pEU3GLIC\_sTnI plazmidról átírt mRNS; 3: pEU3GLIC\_cTnI cirkuláris plazmid; 4: pEU3GLIC\_sTnI cirkuláris plazmid; 5: pEU3GLIC\_cTnI emésztett plazmid; 6: pEU3GLIC\_sTnI emésztett plazmid

#### 4.3. Troponinfehérjék termeltetése és analízise

Az mRNS-ek átírása után a fehérjék szintézisére alkalmas reakcióelegyet a leírásnak megfelelően állítottuk össze, és az egyes transzlációs reakciókhoz az előállított mRNS <sup>1</sup>/<sub>4</sub> részét használtuk fel. A fehérjék termelődését SDS-PAGE-módszerrel ellenőriztük. A GST-vel jelölt cTnI-fehérje (~52 kDa) a búzacsíra kontrollban is megtalálható fehérjéktől jól megkülönböztethetően detektálható a Coomassie kékkel festett gélen. Habár a 48 kDa-os GST-vel jelölt sTnI azonosítását megnehezítik az adott molekulasúly tartományában nagy mennyiségben jelenlévő endogén fehérjék, ebben az esetben is látható a transzláció sikeressége (19. ábra).



**19. ábra: Troponin I-fehérjék PAGE-analízise.** Az SDS-Laemmli-mintapufferben előkészített, 5-5 μl transzlációs elegyet tartalmazó mintákat 12%-os poliakrilamid gélen választottuk el és Coomassie-festéssel tettük láthatóvá. A megfelelő magasságban nyilakkal is jelzett intenzívebb sávok a szintetizálódott troponin I-fehérjéket jelzik a gélen. M: festetlen molekulatömeg-marker; 1: GST-vel jelölt cTnI-t tartalmazó transzlációs elegy; 2: GST-vel jelölt sTnI-t tartalmazó transzlációs elegy

A célfehérjék jelenlétét a transzlációs elegyben Coomassie-festés mellett Western blot módszerrel is igazoltuk. Az immunoblot-analízishez SDS-Laemmli-mintapufferben előkészített, 2 μl transzlációs elegyet tartalmazó mintát poliakrilamid-gélen szeparáltuk. Az elektroforetikus elválasztás után a fehérjéket PVDF-membránra blottoltuk, amit azután tejporos blokkoló oldattal inkubáltunk. Ezt követően a glutation-S-transzferázzal jelölt troponinok kimutatására anti-GST, majd peroxidázzal konjugált anti-nyúl ellenanyagot alkalmaztunk. A vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy a Coomassiefestéssel detektált, az *in vitro* transzláció során szintetizálódott fehérjék az általunk klónozott GST-hez fúzionált cTnI és sTnI fehérjék (20. ábra).



**20. ábra: GST jelölt troponinok immunoblot-analízise.** A PAGE-módszerrel elválasztott, transzlálódott fehérjék detektálása során pozitív kontrollként *in vitro* transzlációval előállított GST-t használtunk fel. A különböző troponin I-fehérjék a GST tömegével megnövelt mérettartományban láthatóak.

#### 4.4. Az eljárás során felhasznált D-peptid szekvenciájának meghatározása

A Spiegelmer SELEX-technika sajátosságaiból adódóan a szelekció során valójában a célmolekula tükörképi párja kerül felhasználásra. Fehérjék esetében ez a teljes hosszúságú fehérje D-aminosavakból történő előállítását feltételezné, ez azonban a kémiai szintézis korlátai miatt csak 10 kDa-nál kisebb fehérjék esetében megvalósítható. Emiatt a cTnI-t szelektíven felismerő Spiegelmerek szelekcióját megelőzően a célfehérjét reprezentáló rövid peptid szakasz kiválasztása alapvető fontossággal bírt.

A miokardiális infarktus nyomán vérkeringésbe jutó cTnI detektálhatóságát számos körülmény, többek közt a fehérje stabilitása is befolyásolhatja, mivel az irodalmi adatok alapján a fehérje N- és C-terminálisa rendkívül érzékeny a proteolítikus degradációra. Ezen kívül a fehérje protein-kináz A általi foszforilációja és kölcsönhatása más molekulákkal, például a troponin C-vel, vagy akár a cTnI specifikus antitestek termelődése is meghatározó tényező lehet. További kihívást jelenthet, hogy a troponin I-fehérje izoformái közül a szívizom eredetű és a lassú vázizom eredetű

troponin I nagyfokú homológiát mutatnak, emiatt a cTnI specifikus receptor molekulák keresztreakcióba léphetnek a vázizom eredetű troponin I-vel.

Annak érdekében, hogy az általunk előállítani kívánt Spiegelmerek szelektivitását biztosítsuk, a két fehérje szekvenciáját összehasonlító analízisnek vetettük alá (21. ábra). Az eredmények illusztrálják, hogy a két troponin I-izoforma-aminosav szekvenciája mintegy 53%-ban azonos, azonban a szívizom eredetű troponin I N-terminális végén jellegzetes, egyedi szekvencia található. Vagyis várhatóan azok a molekulák, amelyek ezt a régiót ismerik fel a cTnI fehérjén, nem kötődnek a vázizom eredetű troponin I-hez. Ezeket a szempontokat figyelembe véve a cTnI szekvenciájában a 28-36-os pozíciók közt egy 9 aminosavnyi szakaszt jelöltünk ki, majd a peptidet megszintetizáltattuk D-aminosavakból. Az aminosav-szekvencia alapján jósoltaknak megfelelően a peptid vízoldhatónak bizonyult, alátámasztva feltételezésünket, hogy az epitóp valószínűleg a fehérje háromdimenziós szerkezetének felületén helyezkedhet el, így a szintetikus D-peptid megfelelő célmolekula lehet a cTnI-specifikus Spiegelmerek szelekciója során.



**21. ábra: Troponin I-szekvenciák összehasonlító elemzésének eredménye.** A színes kiemelés a két fehérje hasonló aminosavait jelöli a rendezett szekvenciákban. A szürke nyíl a Spiegelmer-szelekció célpontjaként kijelölt régiót jelöli

#### 4.5. cTnI specifikus Spiegelmerek szelekciója

A kiindulási oligonukleotid könyvtárakban átlagosan 10<sup>14</sup> különböző szekvencia található, emiatt az amplifikáció során gyakran aspecifikus PCR-termékek képződése figyelhető meg. A konvencionális PCR-reakciók kivitelezésekor a melléktermékek keletkezésének legfőbb forrása a primer-primer hibridizáció, ami többnyire a kívánt terméknél kisebb méretű, kétszálú DNS keletkezéséhez vezet. Ezzel ellentétben a komplex könyvtárak amplifikációja alatt fokozottan fennáll annak a lehetősége, hogy az egyszálú DNS-ek komplementer bázisokhoz kapcsolódnak a randomizált régióban, és primerként funkcionálva hosszabb, egyszálú vagy kétszálú DNS-termékek szintézisét teszik lehetővé. Ez a jelenség még a specifikus primerek felhasználása előtt az úgynevezett parazita-szekvenciák feldúsulását eredményezi, és az *in vitro* evolúciós kísérleteknél gyakori problémát jelent.

Annak érdekében, hogy a szelekció közben elkerüljük a PCR-műtermékek megjelenését, kísérletet tettünk a reakció körülményeinek optimalizálására. Az amplifikációt követően agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük a PCR-reakció eredményességét. A gélképen megfigyelhető, hogy a várt 76 bázispár nagyságú termék mellett egy nagyobb méretű, aspecifikus termék is keletkezett (22. ábra). Megállapítottuk, hogy az amplifikációhoz használt enzim típusa jelentősen befolyásolja a reakció sikerességét, ezért a továbbiakban a Taq polimeráz helyett a nagyobb másolási hűségű Iproof polimerázt használtuk.



**22. ábra: Oligonukleotid könyvtár amplifikációja különböző enzimekkel.** A PCR-reakciót követően 5 µl elegyet mintapufferrel egészítettünk ki, és 3%-os agarózgélen TAE-pufferben megfuttattunk. M: low-range DNS-létra; 1: Taq-polimerázzal amplifikált oligonukleotid-könyvtár; 2: Iproof polimerázzal amplifikált oligonukleotid-könyvtár; 2: Iproof polimerázzal amplifikált

A cTnI-re specifikus Spiegelmerek előállításának első feltétele a fehérje tükörképi párját reprezentáló D-peptidre történő aptamer-szelekció volt. Annak érdekében, hogy megszabaduljunk a peptid immobilizálása céljából felhasznált paramágneses gyöngyhöz aspecifikusan kötődő szekvenciáktól, negatív szelekciót alkalmaztunk. Vagyis a random DNS-könyvtárat elsőként módosítatlan mágneses gyönggyel inkubáltuk, majd ezt követően az "Anyagok és módszerek" fejezetben ismertetett körülmények szerint a paramágneses gyöngyhöz kapcsolt peptiddel folytattuk a szelekciót. A 9-szer megismételt szelekciós ciklus során a paramágneses gyöngyhöz kapcsolt peptid mennyiségét és az inkubálási időt fokozatosan csökkentve, valamint egyre intenzívebb mosási lépéseket alkalmazva növeltük a szelekciós nyomást. Az utolsó ciklust követően a feldúsított könyvtárat módosítás nélküli primerekkel amplifikáltuk, majd a PCR-terméket TOPO klónozó vektorba inszertáltuk, és a vektorokat kompetens sejtbe transzformáltuk. A felnőtt telepekből vektorspecifikus primerekkel kolónia-PCR-t készítettünk, hogy igazoljuk az inszerció sikerességét. Várakozásainkkal ellentétben az ellenőrzés során több kolóniánál nem megfelelő méretű terméket kaptuk. A felmerült problémát egy tisztítási lépés közbeiktatásával sikerült kiküszöbölnünk, melynek során az utolsó szelekciós ciklust követően előállított feldúsított könyvtárat agarózgélen elválasztottuk, majd a 76 bázis hosszúságú fragmentumot a gélből izoláltuk. Végül a tisztított terméket TOPO vektorba klónoztuk, és az így nyert kolóniák döntő többségéből már a várt méretű termék amplifikálódott a kolónia-PCR során (23. ábra). A PCR-termékekből 85-öt választottunk ki, majd Sangerszekvenálással meghatároztuk az inszertek bázissorrendjét.



23. ábra: Kolónia-PCR-ek agaróz-gélelektroforézise. A PCR-reakciót követően
5 μl elegyet mintapufferrel egészítettünk ki, és 2,5%-os agaróz gélen TAE-pufferben megfuttattunk. A megfelelő méretű termékek pozícióját nyíl jelöli. M: low-range DNS létra; (A) transzformálás PCR-termék tisztítása nélkül;
(B) transzformálás PCR-termék tisztítását követően

### 4.6. Oligomerek vizsgálata képalkotó felületi plazmonrezonanciával

#### 4.6.1. Szelektált oligonukleotidok vizsgálata D-peptiddel

A szekvenálást követően az azonos szekvenciák és a hasonló mintázatok megtalálásához a szekvenciák többszörös összerendezését kellett elvégeznünk. A peptidre szelektált oligonukleotidok variábilis régióinak bázissorrendjét a ClustalX2 nevű szoftverrel összehasonlító analízisnek vetettük alá, melynek eredménye megerősítette adott szekvenciák feldúsulását, hiszen a 85-ből 32 azonos szekvenciával rendelkezett, 6 két kópiában, a többi pedig egy kópiában fordult elő (Függelék: 1. ábra).

A SELEX eljárás elmélete alapján a szelekciós nyomás hatására az oligonukleotid-könyvtárban a célmolekulához legnagyobb affinitással kötődő szekvenciák dúsulnak fel legnagyobb számban. A publikált eredmények alapján azonban kijelenthető, hogy gyakran nem a legtöbb kópiában előforduló oligonukleotid kötődik a legerősebben a célmolekulához. A jelenség a különböző szekvenciák eltérő amplifikációs hatékonyságára vezethető vissza. Az egyes szelekciós ciklusok közt a könyvtár amplifikálása PCR-reakcióval történik, ami eltorzíthatja a szelekciót.

72
Következésképpen a legígéretesebb jelöltek kiválasztásához nélkülözhetetlen a szelektált oligonukleotidok kötőképességének meghatározása.

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.

Annak érdekében, hogy elkerüljük az oligomerek időigényes kémiai szintézisét, a D-oligonukleotidokat polimeráz-láncreakcióval amplifikáltuk. Módszerünk tesztelése érdekében négy különböző szekvenciát választottunk ki a további vizsgálatokhoz. Közülük a legnagyobb számban az A4-es fordult elő a szelektált könyvtárban, a C11-es két kópiában volt jelen és nagyfokú hasonlóságot mutatott az A4-hez, továbbá a D12 és B10-es szekvenciákat véletlenszerűen választottuk ki. Az amplifikációhoz a kolónia-PCR-ek termékeit használtuk templátként és a könyvtár biotinilált forward és módosítatlan reverse primereivel kétszálú terméket állítottunk elő, amelyet ezután extravidinnel borított SPR-chipen immobilizáltunk. A PCR-termékek kapcsolását követően a chip felületén közvetlenül történő NaOH-os denaturálással a fragmentumokat egyszálú DNS-sé alakítottuk. Első méréseink ugyan nem jártak sikerrel, de miután a nukleinsavak kicseppentésének optimális körülményeit megtaláltuk, sikerült a D-cTnI peptid és a szelektált oligomerek kölcsönhatását detektálnunk. A kezdeti sikertelenséget feltehetőleg a nukleinsav-minták alacsony koncentrációja okozta, ugyanis tapasztalataink szerint a megfelelő receptorsűrűség biztosítása a chip felületén kritikus tényező a molekuláris interakciók vizsgálata során.

Eredményeink szerint mindegyik vizsgált oligonukleotid kötődött a D-peptid célmolekulához. A kolóniák közt legnagyobb számban előforduló oligonukleotid (A4) azonban csak a második legkisebb affinitással kapcsolódott ligandjához, alátámasztva azt az elméletet, miszerint a legalkalmasabb aptamerjelölt nem szükségszerűen a leggyakrabban reprezentált szekvenciával rendelkezik (24. ábra).



24. ábra: D–cTnI-peptid és a szelektált D-oligonukleotidok kölcsönhatásának vizsgálata SPRi-módszerrel. A szelektált, biotinilált oligonukleotidokat 10  $\mu$ M koncentrációban cseppentettük az extravidinnel módosított chipre, ezt követően a köcsönhatást különböző peptidkoncentrációk esetén vizsgáltuk. \* (P < 0,05) és \*\* (P < 0,01) a vizsgált oligomerek és a kontroll közti szignifikáns különbséget jelölik

### 4.6.2. Spiegelmerek karakterizálása

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 (A4) és a szekvenciák előszűrésénél legígéretesebbnek bizonyuló (B10) szekvenciát megszintetizáltattuk L-nukleotidokból, majd az 5' vég tiolcsoportján keresztül a felületi plazmonrezonanciás szenzorchip arany felületére immobilizáltuk, és a cTnI fehérjével vizsgáltuk a kölcsönhatás kinetikáját.

Mindkét 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, míg az A4-es Spiegelmerre 10,7 nM értéket állapítottunk meg, ami összhangban állt az előző vizsgálatunknál tett megfigyelésünkkel, a

legnagyobb mértékben feldúsult oligonukleotidnak megfeleltethető Spiegelmer kisebb affinitással kötődött a cTnI fehérjéhez. Továbbá eredményeink megerősítették, hogy a szekvenciák előszűrésére kidolgozott módszerünkkel a nagyszámú L-oligonukleotid költséges kémiai szintézise nélkül is kiválaszthatók a legígéretesebb Spiegelmerjelöltek.

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 (25. ábra).

A cTnI humán vérmintából történő kimutatására alkalmas receptor-molekulákkal szemben az affinitásuk mellett fontos követelmény, hogy megfelelő szelektivitással szelekcióhoz rendelkezzenek. Habár а felhasznált peptid szekvenciájának kiválasztásakor ezt a szempontot figyelembevettük, SPR-méréssel is igazoltuk, hogy a Spiegelmerek képesek a troponin I-izoformák megkülönböztetésére. A szívizomsejtek nekrózisát követően a cTnI nem csak szabad állapotban, hanem a troponin T- és Cfehérjékkel alkotott komplex formájában is a keringésbe 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 hármas-komplex formáját egyaránt felismerik.

Ezt követően az oligomerek szelektivitását 10x-re hígított humán szérumban is megvizsgáltuk. Előző eredményeinkkel összhangban a B10-es Spiegelmer komplex közegben is nagyobb affinitással kötődött a cTnI-hez (26. ábra). 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 NaOH-dal végzett regenerálási eljárással szemben is ellenállónak bizonyultak.



25. ábra: B10-es (a) és A4-es (b) Spiegelmerek szelektivitásának vizsgálata SPRi-vel. A Spiegelmerrel módosított felületre 1  $\mu$ g/ml koncentrációban cTnI monomert és troponin I-T-C komplexet, valamint kontrollként vázizom eredetű troponin I-t és lizozimet injektáltunk. \* (P < 0,05), \*\* (P < 0,01), \*\*\* (P < 0,0005)



**26.** ábra: B10-es (a) és A4-es (b) Spiegelmerek kalibrációs görbéi humán szérumban mérve. Referenciaként HS-TEG módosított felületet használtunk, és az értékeket a háttérrel (10x-re higított humán cTnI-mentes szérum) korrigáltuk. 1:1 kölcsönhatást feltételezve az illesztéshez a Hill-egyenletet alkalmaztuk

#### 4.7. Spiegelmerek vizsgálata ALPHA-módszerrel

#### 4.7.1. ALPHAScreen mérések in vitro transzlációval előállított fehérjékkel

Napjainkban a biomarkerek detektálása döntő részben immunanalitikai eljárásokkal történik, melyeknél a célmolekulát felismerő receptormolekulák szerepét az antitestek töltik be. A leggyakrabban alkalmazott cTnI-diagnosztikai módszerek többsége a célfehérje két vagy akár több kötőhelyen történő felismerésén alapszik, mivel a receptorok ún. szendvics típusú elrendezésével jelentősen növelhető a mérés érzékenysége és a szelektivitása. Ezekben az eljárásokban az egyik antitest a célmolekula oldatból történő megkötéséért, a másik pedig általában valamilyen jelölőmolekulán keresztül a detektálásért felelős.

Az oligomerek kémiai tulajdonságaikat tekintve jelentősen különböznek az ellenanyagoktól, ugyanakkor diagnosztikai rendszerekben az antitestekhez hasonlóan képesek lehetnek célmolekuláik felismerésére. Kísérleteinkkel azt kívántuk igazolni, hogy az általunk szelektált Spiegelmer szendvics típusú elrendezésben is alkalmazhatóe a cTnI-t szelektíven felismerő receptorként. Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy az oligonukleotid–fehérje kölcsönhatás a nagy jelerősítésű ALPHA-módszerrel eredményesen detektálható. Ez az eljárás a hagyományos, heterogén fázisú ELISA típusú mérésekhez képest számos előnnyel rendelkezik, ezért a szelektált cTnI specifikus oligomer funkcionalitását a továbbiakban egyszerű kivitelezhetősége miatt az ALPHA-módszerrel kívántuk vizsgálni.

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 használtuk. Ennek megfelelően a méréshez Sztreptavidin donor és Protein A ALPHAScreen akceptorgyöngyöket választottunk. A mérés során a GST-címkével ellátott szív- illetve a vázizom troponin I-t tartalmazó *in vitro* transzlációs elegyeket két 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 (27. ábra). Annak érdekében, hogy meggyőződjünk az oligomer szelektivitásáról, *in vitro* transzlációs eleggyel is

megismételtük méréseinket. A GST-t tartalmazó transzlációs eleggyel végzett mérésünk igazolta, hogy a transzlált cTnI-nél detektált magas ALPHA-jel nem a GST-címke vagy a búzacsíra kivonatban jelenlévő fehérjék aspecifikus kötődésének következménye (28. ábra).



**27. ábra:** A B10-es Spiegelmer és a troponin I-fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata komplex fehérjemátrixban. A humán GST-vel jelölt troponin fehérjéket tartalmazó transzlációs elegyekhez 10 nM biotinilált Spiegelmert és 10 nM monoklonális cTnI-specifikus antitestet adtunk. A méréshez a Sztreptavidin donorgyöngyöt és az ALPHAScreen Protein-A akceptorgyöngyöt 20 μg/ml végkoncentrációban használtuk fel



**28. ábra:** A Spiegelmer szelektivitásának vizsgálata. A 100x-os hígításban felhasznált transzlációs elegyekhez 10 nM biotinilált Spiegelmert és 10 nM monoklonális cTnI-specifikus antitestet adtunk. A méréshez a Sztreptavidin donorgyöngyöt és az ALPHAScreen Protein-A akceptorgyöngyöt 20 μg/ml végkoncentrációban használtuk fel.

Miután előkísérleteink a Spiegelmer szendvics típusú elrendezésben való alkalmazhatóságával kapcsolatban pozitív eredménnyel szolgáltak, a továbbiakban a Spiegelmer és a szívizom eredetű troponin I kölcsönhatás vizsgálatát humán szérumban is megismételtük. Várakozásainknak megfelelően szérum hatására a kemilumineszcens jel drasztikus csökkenését tapasztaltuk (29/A. ábra). Valószínűsíthetően a humán szérumban több nagyságrenddel nagyobb mennyiségben jelenlévő antitestek és a hozzáadott cTnI specifikus monoklonális antitest közt fellépő kompetíció miatt a Protein A akceptorgyöngy elhanyagolható mértékben köti a szelektív ellenanyagot. Mivel a hozzáadott szérum gyakorlatilag a háttérrel megegyező értékre csökkentette a fluoreszcens jelet, a probléma kiküszöbölése érdekében egy általánosan alkalmazható eljárást dolgoztunk ki, és az ALPHA-méréseket megelőzően kovalensen kötöttük ki a cTnI specifikus antitesteket az akceptor gyöngy felületére.

Elsőként konjugálatlan, dextrán-aldehiddel borított gyöngyöt használtunk, amely az ellenanyag kovalens kapcsolását teszi lehetővé. Az így módosított akceptorgyöngy azonban nem volt alkalmas a troponin I detektálására az ALPHA-mérés során. (Ezek az eredmények a dolgozatban nem kerülnek bemutatásra). A jelenség hátterében valószínűleg az állhatott, hogy az aminocsoportokon keresztül véletlenszerű orientációban keresztkötött antitestek esetében az antigénkötés mértéke csökkenhetett, ezért laboratóriumunkban újfajta konjugálási protokollt dolgoztunk ki. A troponin I antitestek Fc régión keresztüli rögzítése biztosíthatja az ellenanyagok megfelelő orientációját, ezért az ellenanyagot elsőként Protein A-val borított ALPHA gyönggyel inkubáltuk, majd az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtaknak megfelelően dimetil-pimelimidáttal hoztunk létre keresztkötést az antitest Fc-régiója és a Protein A molekulák közt. Az antitest-konjugálás eredményességét az ALPHA-mérések eredményei is megerősítették (29/B. ábra).



29. ábra: Kölcsönhatás vizsgálata humán szérumban az antitestek konjugálása nélkül (A) és az antitest Protein A gyöngyhöz történő kovalens kapcsolása esetén (B). A mérésekhez a transzlációs elegyeket 100x-os hígításban használtuk fel. A reagensek összemérése után a reakcióelegy 10%-nyi humán cTnI-mentes szérumot tartalmazott. Kontrollként cTnI-t nem tartalmazó transzlációs elegyet alkalmaztunk

#### 4.7.2. ALPHAScreen és ALPHALisa gyöngyök összehasonlítása

A szívizom eredetű troponin I a szérumos és szérumot nem tartalmazó mintákban egyaránt kimutatható volt, azonban a detektált jel intenzitása a szérum hozzáadásának hatására továbbra is jelentős csökkenést mutatott. A tapasztalt jelenség az assay homogén természetére vezethető vissza, ugyanis a donorgyöngy gerjesztésének hatására keletkező szinglet oxigén egy része a szérumban jelenlévő hemoglobinhoz kötődve visszaalakulhat, így nem jut el az akceptorgyöngyig. A mérhető jel intenzitását tovább csökkenti, hogy az ALPHAScreen akceptorgyöngyökben a végső fluorofór rubrén 520-620 nm hullámhosszú fényt emittál, ami nagymértékben átfed a hemoglobin abszorpciós spektrumával (függelék 2-3. ábra). Az ALPHAScreen típusú gyöngy kiváltására a költségesebb ALPHALisa gyöngy alkalmazása jelentheti a megoldást, ugyanis az európium fluorofórnak köszönhetően szűkebb emissziós spektrummal rendelkezik, emiatt várhatóan kevésbé interferál szérum és plazma mintákkal.

Az előzőekben bemutatott, ALPHAScreen Protein A gyöngyökkel végzett kísérletek eredményei szerint a vérszérum hozzáadása drasztikusan lecsökkenti a detektálható jelet, ezért megvizsgáltuk, hogy ALPHALisa gyöngyök alkalmazásával nagyobb érzékenység érhető-e el. A kérdés megválaszolása érdekében előkísérleteket végeztünk laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott 6xHis jelölt fehérjék detektálására alkalmas ALPHAScreen és ALPHALisa gyöngyökkel. A mérés során a két különböző akceptorgyöngy működését sztreptavidin borított donor gyönggyel párban vizsgáltuk, és a gyártó által kontrollként biztosított, biotinnal jelölt 6 db hisztidinből álló peptidet két különböző koncentrációban adtuk a szérumhoz. Eredményeink alapján megállapítható, hogy ALPHAScreen gyöngyök esetében a fluoreszcens jel intenzitása a háttérrel egyezett meg. Az adott koncentrációtartományban – 10x szérumhígítás mellett – az ALPHAScreen gyöngy tehát nem alkalmas az analát kimutatására (30. ábra). Ezzel ellentétben az ALPHALisa gyönggyel mind az 5 és 0,5 nM-os peptid koncentráció mellett detektálható volt az akceptor és donor gyöngyök kölcsönhatása, ezért a továbbiakban a cTnI szérumban történő méréséhez ALPHALisa típusú Protein A gyöngyöt használtunk, melyre a korábban ismertetett módon cTnIspecifikus antitestet kapcsoltunk.



**30. ábra: ALPHA-gyöngyök alkalmazhatóságának vizsgálata humán szérumban.** Kísérletünk során hisztidin jelöléssel ellátott molekulák detektálására alkalmas ALPHAScreen és ALPHALisa típusú akceptor gyöngyöket használtunk fel sztreptavidin donorral párban, melyekhez különböző koncentrációban biotinilált peptidet és 10x-es hígításban humán szérumot adtunk

### 4.7.3. ALPHALisa reakcióelegy optimalizálása

Az ALPHALisa-mérések optimális körülményeinek meghatározásához előkísérleteket végeztünk. Homogén típusú mérési rendszerekben az alkalmazott pufferek típusa, a komponensek koncentrációja, egyéb anyagok jelenléte vagy akár az inkubálás sorrendje is drasztikus hatással lehet a detektálás sikerére. Általánosan alkalmazott elv, hogy a szendvics típusú rendszerekben gyakran tapasztalható "hook effektus" miatt az egyes komponensek koncentrációját a felhasznált gyöngyök kötőképességét figyelembe véve választjuk ki. A maximális nagyságú jelet a kioltási ponton érhetjük el, amikor mind az akceptor, mind a donorgyöngy a célmolekulával telített. Mivel a sztreptavidingyöngy kötőképessége 30 nM körüli értékre tehető, a Spiegelmer koncentrációját 15 nM-nak választottuk. Irodalmi adatok alapján a komplex biológiai minták mérésénél a kazeint vagy zselatint tartalmazó pufferekkel a homogén rendszerben eredményesen csökkenthető az aspecifikus kölcsönhatás, ezért a PBS mellett ezekben az oldatokban is végeztünk méréseket. A függelék 4. ábráján látható, hogy a zselatinos pufferben az ALPHA-jel a háttérértékre csökkent és a kölcsönhatás egyáltalán nem volt detektálható. Ezzel ellentétben a kazeines oldatban mért magas jelek a gyöngyök nem-specifikus interakciójára utaltak. További méréseink során mindezeket figyelembe véve a legáltalánosabban használt 1 mg/ml koncentrációjú BSA-val kiegészített foszfátpuffert használtuk a reakcióelegy komponenseinek hígítására. Az ily módon optimalizált puffer összetétele az anyagok és módszerek fejezetben került ismertetésre.

#### 4.7.4. ALPHALisa-mérések humán szérumban

A cTnI mérésére alkalmas receptorok ideális esetben a fehérje különböző formáihoz is képesek kötődni. Annak bizonyítására, hogy ALPHALisa rendszerben a cTnI monomer és az I-T-C hármas komplex is detektálható, a méréshez használt puffer optimális összetételének meghatározását követően kísérleteinket a kétféle troponinnal kiegészített humán szérummal is elvégeztük. A troponin I fehérjék esetében jól ismert jelenség, hogy szérumban könnyen degradálódhatnak, valamint hajlamosak műanyag és üveg felületekhez kitapadni [154,155]. Annak érdekében, hogy információt nyerjünk a szérumban detektálható troponin I valós koncentrációjáról, a laboratóriumi

diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott immunanalitikai eljárással ellenőriztük az elkészített szérumminták troponin I-tartalmát. A méréseket a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinika laboratóriumának munkatársai ARCHITECT Stat automata készülékkel végezték el számunkra, hogy meggyőződhessünk a hígítások megfelelő linearitásáról (31. ábra). Míg a humán szívizomból tisztított ITC-komplex esetében az ismert fehérjekoncentráció alapján számított (névleges) és a mért cTnItartalom jó egyezést mutatott, a rekombináns monomer forma esetében a mért koncentráció a számítottnál egy nagyságrenddel alcsonyabb volt, így nem zárható ki a fehérje monomer tárolása és mérése közbeni fokozott degradációja.



**31. ábra: Szérumminták cTnI koncentrációjának meghatározása.** A humán szívizom eredetű I-T-C-komplexszel kiegészített szérumminták (**A**) és rekombináns cTnI monomerrel kiegészített szérumminták (**B**) troponin I koncentrációját ARCHITECT Stat automatával ellenőriztük

Az ALPHALisa méréseket változó troponinkomplex- és állandó biotinilált Spiegelmer-koncentráció mellett végeztük el. Annak érdekében, hogy kizárjuk a troponin I fehérje és a Spiegelmer közt kialakuló nem specifikus, csupán elektrosztatikus vonzáson alapuló kölcsönhatás kialakulásának lehetőségét, a reakcióelegyhez nM koncentrációban egy másik fehérjére szelektált, módosítatlan oligomert adtunk. Az így detektált lumineszcens jel a szérumhoz adott cTnI monomer és az ITC-komplex esetén egyaránt jól korrelált a troponin I mennyiségével (32. ábra). Az ábrázolt jelintenzitás a telítési görbén a troponin I ng/ml-es koncentrációtartományában megfelelő linearitást mutatott, regressziós egyenesek illesztése esetén az R-négyzet értéke 0,994-nek illetve 0,985-nek adódott.

Annak a kérdésnek 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 gyakorlatilag a háttérértékkel egyezett meg, ami módszerünk nagyfokú szelektivitását igazolta. Szintén ezt erősítette meg egy másik oligomerrel végzett mérésünk eredménye. A szendvics rendszerben a cTnI-re szelektált Spiegelmert OligoT-vel helyettesítve szignifikánsan kisebb jelet detektáltunk. (Ez a mérési eredmény a dolgozatban nem kerül bemutatásra.)



**32. ábra: ALPHALisa mérés humán szívizomból tisztított troponin I-T-Ckomplexszel (A) és rekombináns cTnI-monomerrel (B).** A troponin I fehérje humán szérumban történő detektálása során a reakcióelegyhez 10 nM biotinilált Spiegelmert és 20 nM blokkoló oligót adtunk és az előzőleg antitesttel konjugált Protein A akceptorgyöngyöt sztreptavidin donorral párban használtuk fel

ALPHALisa méréseinket megismételtük az ARCHITECT automata készülék kalibrálásához használt rekombináns troponin I-C-komplexszel is. Az alkalmazott koncentrációkban nem volt detektálható a fehérjének ezen formája. A kalibrátor fehérje komplex szerkezetéről nem állt rendelkezésünkre információ, ezért megvizsgáltuk, hogy az ALPHA-mérések során használt antitest felismeri-e az I-C-komplexet. Western blot segítségével igazoltuk, hogy az általunk használt Mab 267 antitest az I-T-C-komplexet és a monomer troponin I-t felismeri, azonban nem képes a kalibrátor I-C kimutatására (33. ábra). Mivel az antitestünk a 169-178-as aminosavak közti epitópot ismeri fel, az automata kalibrálásához használt minta valószínűleg nem a teljes hosszúságú troponin I-t tartalmazza, hanem annak csak egy rövidebb változatát. Ezt támasztja alá az is, hogy az ARCHITECT assayben alkalmazott két befogó (melyek felismerési helyei: 87-91, 24-40) és detektáló antitest (41-49 aminosavak) egyike sincs átfedésben ezzel a régióval. Következésképp az I-C komplex sikertelen detektálása a homogén rendszerben nem a szelektált Spiegelmer kisebb affinitásának következménye.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a laboratóriumunkban kidolgozott, Spiegelmer-antitest párral működő szendvics eljárás kimutatási határa magasabb a diagnosztikában jelenleg használt hs-troponin meghatározást lehetővé tevő módszerekénél, ugyanakkor alkalmas volt annak demonstrálására, hogy a kiválasztott Spiegelmer megfelelő szelektivitással képes a cTnI-t detektálni humán szérumban.



**33. ábra: A szendvicsrendszerben felhasznált antitest vizsgálata.** A különböző troponin I fehérjék 1 ng-jának elektroforetikus elválasztását követően Western blot technika segítségével győződtünk meg a felhasznált monoklonális cTnI antitest szelektivitásáról.

## 5. Megbeszélés

#### 5.1. cTnI specifikus Spiegelmerek szelekciója

Az 1990-es évek elején publikált SELEX eljárás lehetővé tette a célmolekuláikhoz nagy affinitással, specifikusan kötődő egyszálú oligonukleotidok hatékony szelekcióját. Az azóta eltelt idő alatt az aptamerek számos területen bizonyították alkalmazhatóságukat. Előnyös tulajdonságaik ellenére az RNS és DNS oligomerek felhasználását sok esetben korlátozza, hogy a biológiai környezetben és mintákban általánosan előforduló nukleázok hatására könnyen degradálódhatnak. Ennek következtében az enzimatikus hasítással szemben ellenálló oligonukleotidok szintézisével kapcsolatos fejlesztések napjainkban kiemelkedő jelentőségre tettek szert.

A nukleázrezisztens oligonukleotidok előállításának egyik alternatívája a tükörképi RNS- és DNS-aptamerek, az ún. Spiegelmerek szintézise. Ezek az L-2' ribózt vagy L-2' dezoxi-ribózt tartalmazó molekulák az azonos szekvenciájú D-nukleotidokból felépülő aptamerek tökéletes tükörképi párjának tekinthetők. Szerkezetüknek köszönhetően kiemelkedő stabilitással rendelkeznek, és а nukleázok sztereoszelektivitása miatt a D-enantiomereknél több nagyságrenddel ellenállóbbak a nukleolitikus hasítással szemben. Következésképpen a Spiegelmerek alkalmazása a gyógyászatban és a diagnosztika területén is egyaránt ígéretes lehet. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy jelenleg már több terápiás Spiegelmer a klinikai kísérletek fázisában van. A természetben előforduló enzimek sztereoszelektivitása azonban a Spiegelmerek azonosításakor egyúttal hátrányt is jelent, ugyanis a szelekciós eljárás közben alkalmazott polimerázok sem képesek a tükörképi nukleotidok felismerésére. Emellett az utolsó szelekciós lépést követően a könyvtár szekvenálásához baktériumokba történő klónozásra és további amplifikálási lépésre van szükség, így a Spiegelmerek szelekciója nem valósítható meg a konvencionális SELEX módszer adaptálásával. Valójában a szelekció során nem a célmolekula, hanem annak tükörképi párja kerül felhasználásra.

A nagyméretű fehérjéknél a teljes hosszúságú polipeptid lánc D-aminosavakból történő kémiai szintézise nehezen kivitelezhető, ennek megfelelően a Spiegelmerek többségét kezdetben kisebb molekulákra, például citokinekre, peptidhormonokra szelektálták. Elsőként Klussman és munkatársai igazolták, hogy a fehérjespecifikus Spiegelmerek szelekciója a teljes hosszúságú polipeptidlánc szintézise nélkül is megvalósítható. Laboratóriumunkban ennek a módszernek a továbbfejlesztését tűztük ki célul annak érdekében, hogy a humán cTnI fehérjét specifikusan felismerő Spiegelmereket azonosítsuk. Az akut koronária szindróma rutin diagnosztikájában fontos szerepet betöltő biomarkerek, a szívizom eredetű troponinok mennyiségi meghatározása jelenleg a klinikumban automatizált, szendvics típusú immunanalitikai módszerekkel történik, ahol a felismerő molekulák szerepét kizárólag antitestek töltik be. Filatov és munkatársai eredményei alapján a vizsgált, cTnI-vel vagy a troponinkomplex felhasználásával előállított monoklonális antitestek mintegy 90%-a rövid – a fehérje elsődleges szekvenciája által meghatározott –, egymást követő aminosavakból álló peptidek felismerésére képes, így a teljes molekula konformációjától kevésbé függ az affinitásuk [147]. Ennek ismeretében munkánkkal azt kívántuk demonstrálni, hogy a megfelelő peptidszakasz kiválasztása nukleázrezisztens, cTnI-re specifikus oligomerek előállítását teszi lehetővé, amelyek megfelelő alternatívái lehetnek a diagnosztikai rendszerekben receptorként alkalmazott ellenanyagoknak.

Troponin I fehérjére specifikus oligomereket elsőként Ban és munkatársai állítottak elő. A kutatók 2012-ben humán troponin I-hez kötődő DNS-aptamereket szabadalmaztattak, amelyek affinitását SPR-rel vizsgálták. Eredményeik szerint a 6 aptamer nagy affinitással kötődik a cTnI monomer valamint komplex formájához, és K<sub>D</sub>-értékük pM-tól nM értékig terjed [156]. Ezeknek az aptamereknek a diagnosztikai alkalmazhatósága azonban megkérdőjelezhető, mivel a szintetikus receptor-molekuláknak a nagy affinitásuk mellett megfelelő szelektivitással is rendelkezniük kell. A kutatók a cTnI–vel nagyfokú homológiát mutató sTnI-vel nem vizsgálták a szelektált oligonukleotidok kölcsönhatását, valamint egyéb fehérjéket tartalmazó, komplex közegben sem végeztek méréseket. Mindezeken túl a diagnosztikában történő felhasználás szempontjából a hagyományos aptamerekhez képest a nukleázrezisztens Spiegelmerek alkalmazása mindenképp előnyösebb lehet.

Az RNS- és DNS-oligomerek mindegyike nagy affinitással képes ligandjához kötődni, azonban az RNS-sel ellentétben a DNS-oligomerek szelektálása során nincs szükség reverz transzkripciós lépésre, így a DNS-aptamerek előállítása gyorsabban és egyszerűbben kivitelezhető folyamat. Ennek megfelelően 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.

követően a szelekcióhoz felhasználandó Ezt peptid szekvenciájának meghatározása érdekében elvégeztük a nagyfokú homológiát mutató szívizom és lassú vázizom eredetű troponin-szekvenciák összehasonlító elemzését. A peptid racionális tervezése során egyéb szempontokat, például vízoldhatóságát, a troponinkomplex szerkezetét, a fehérjére jellemző degradációs és más molekulákkal való komplexet képző sajátosságait is figyelembe vettük. A cTnI fehérje N-terminálisa közelében elhelyezkedő, 9 aminosavból álló domén kiválasztását követően a megszintetizált Dpeptidet paramágneses gyöngyhöz kapcsoltuk, majd 9 ciklus alatt, a szelekciós nyomást fokozatosan növelve végrehajtottuk a D-oligomerek szelektálását. A klónozást követően Sanger-szekvenáltatással határoztuk meg az aptamerek randomizált szakaszának bázissorrendjét. Az inszerteket összehasonlítva megállapítottuk, hogy a vizsgált 85 klónból 32 azonos szekvenciával rendelkezett, 6 pedig két kópiában, míg a többi egyedi szekvenciaként volt jelen a feldúsított könyvtárban. Ez az eredmény az in vitro evolúciós eljárásunk sikerességére utalt, ezért a legalkalmasabb aptamer-jelöltek kiválasztásához további kísérleteket végeztünk.

### 5.2. Spiegelmer-jelöltek kiválasztása és karakterizálása

Napjainkban a szekvenciák közül az aptamer-jelöltek kiválasztását bioinformatikai elemzések is segíthetik. A rohamos fejlődésnek köszönhetően akár már az új generációs szekvenálással nyert nagyszámú aptamer szekvencia összehasonlítása is megvalósítható, továbbá a különböző algoritmusok a szekvenciák közös motívumainak keresése mellett a másodlagos szerkezet predikciójára is lehetőséget adnak. Széles körű felhasználásuk ellenére ezeknek a programoknak a gyakorlati jelentősége viszonylag csekély, hiszen a valós szerkezetek meghatározása túlmutat a rendelkezésre álló programokkal végezhető számítások bonyolultságán. Az egyik leggyakrabban alkalmazott, mintegy 20 éve működő MFold webszerver a szabadenergia-változás minimumának számítása alapján képes az aptamerszerkezet jóslására. A kapott eredményeket azonban érdemes fenntartással kezelni, mivel több tanulmány is igazolta, hogy az aptamerek a legkisebb szabad energiával rendelkező

struktúrán kívül más szerkezetet is felvehetnek, ráadásul a program a célmolekula nélküli lehetséges szerkezetre tesz jóslást [156]. Vagyis az aptamer-ligand-kölcsönhatás kísérletes módon történő vizsgálata napjainkban sem vesztett jelentőségéből, ma is fontos szereppel bír a legalkalmasabb oligomerek azonosítása során.

A heterogén fázisú biomolekuláris kölcsönhatások megfigyelésére a képalkotó felületi plazmonrezonancia az egyik legalkalmasabb módszer, amellyel valós időben, jelölésmentesen követhető nyomon a molekulák asszociációja és disszociációja. Azért, hogy elkerüljük a nagyszámú Spiegelmer-jelölt költséges és időigényes szintézisét, a szekvenciák előszűrésére egy általánosan alkalmazható SPRi-n alapuló eljárást dolgoztunk ki. Fordított megközelítést alkalmazva elsőként a D-peptid-ligand és a D-oligonukleotidok kölcsönhatását vizsgáltuk, melyhez az oligonukleotidokat laboratóriumunkban PCR-rel amplifikáltuk fel. Az így nyert kétszálú, biotinilált DNS termékeket az eljárás egyszerűsítése érdekében a kicseppentés után közvetlenül az SPRchip felületén NaOH-dal egyszálúsítottuk. Mérési eredményeink szerint a legnagyobb mértékben feldúsult szekvencia a vizsgált oligomerek közül a második legkisebb affinitással rendelkezett, míg a legerősebben egy olyan oligonukleotid kötődött a D-peptidhez, amelyik a megszekvenáltatott kolóniák közt csak egy példányban volt jelen. Módszerünk alkalmazhatóságának bizonyítására további kísérleteket végeztünk, és arra kerestük a választ, hogy a tükörképi peptid és a D-DNS-ek kölcsönhatásának vizsgálatával előrejelezhető-e a Spigelmer-cTnI fehérje-kölcsönhatás erőssége.

A D-oligomerrel és D-peptiddel végzett kísérleteink eredményei alapján megállapítottuk, hogy a két vizsgált Spiegelmer közül a 32 kópiában előforduló szekvenciával rendelkező Spiegelmer kisebb affinitással kötődött a cTnI fehérjéhez, mint a másik, egyedi szekvenciával rendelkező Spiegelmer-jelölt. Ezek az eredmények összhangban állnak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint gyakran nem a legnagyobb mértékben feldúsult oligomerek rendelkeznek a legnagyobb affinitással. Mindezek alapján a legígéretesebb aptamerek kiválasztása érdekében a legnagyobb kópiaszámban előforduló oligomer mellett a többi aptamer jelölt kötőképességét is mindenképp érdemes kísérletes módon megvizsgálni. A laboratóriumunkban kidolgozott eljárás a legjobb Spiegelmerek kiválasztásához kínál optimális megoldást, mivel a nagyszámú szekvencia előszűrését az L-oligomerek költséges kémiai szintézise nélkül is lehetővé teszi.

Méréseinkkel bizonyítottuk, hogy a legnagyobb kópiaszámban előforduló, valamint a legnagyobb affinitású oligonukleotid enantiomer párja egyaránt képes a cTnI fehérjével nagy affinitású kölcsönhatást létrehozni, és disszociációs konstansuk az alacsony nanomólos tartományba esik. Szelekciós módszerünk eredményességét bizonyítja, hogy a disszociációs konstansok értéke alapján sikerült nagy affinitású nukleázrezisztens molekulákat előállítanunk, amelyek ideális receptor molekulák lehetnek a modern troponin I diagnosztikai eljárásokban. A NIST (National Institute of Standards and Technology) nemzetközi szervezet elemzése szerint a laboratóriumi diagnosztikában elterjedt nagy érzékenységű cTnI-méréseknél a felhasznált monoklonális antitestek 74 nM–2,6 mM közti K<sub>D</sub> értékkel rendelkeznek [157]. Vagyis feltételezhetően az általunk fejlesztett receptorokkal is megvalósítható a klinikailag releváns koncentrációtartományban történő troponin-meghatározás.

Az aptamerek diagnosztikai rendszerekben történő alkalmazásának feltétele, hogy specifikusan kötődjenek célmolekuláikhoz. Nagyszámú publikációt megvizsgálva azonban kijelenthető, hogy az aptamer-jelöltek karakterizálása a legtöbb esetben csak a kötőképesség meghatározására korlátozódik, és sajnálatos módon nem kerül sor az oligomerek szelektivitásának alapos vizsgálatára. A jelenség magyarázatot adhat arra, hogy az aptamereket előnyös tulajdonságaik ellenére a gyakorlatban kevés esetben hasznosítják. Az elmúlt években ugyanis rengeteg, nem megfelelően tesztelt aptamerről jelent meg publikáció, ami feltehetően kedvezőtlenül hatott az aptamer alapú diagnosztikai rendszerek elterjedésére. Mindezeket figyelembe véve a nukleázrezisztens receptorfejlesztés során laboratóriumunkban olyan Spiegelmerek előállítását tűztük ki célul, amelyek nem csak az ideális közegnek tekinthető szelekciós pufferben, hanem biológiai mintákban is szelektíven kötődnek a cTnI fehérjéhez. Eredményeink igazolták, hogy a kiválasztott Spiegelmerek mindegyike megfelelő szelektivitással rendelkezik, hiszen sem a kontrollként használt vázizom troponinnal, sem pedig egy hasonlóan magas pI-vel rendelkező fehérjével, a lizozimmel nem hatottak kölcsön. Méréseinket cTnI-vel kiegészített humán szérummal is megismételtük. Eredményeink szerint a szelektált Spiegelmerek az egyik legkomplexebb diagnosztikai mátrixban is képesek a troponin I-t felismerni, ezzel szemben a korábban már megemlített hagyományos cTnI aptamerek szelekciójának szabadalmi leírásában nem található információ a molekulák szelektivitására vonatkozóan.

#### 5.3. Troponin I detektálása szendvics típusú rendszerben

Jelenleg a rutin diagnosztikában alkalmazott immunanalitikai mérések során 2 vagy akár több monoklonális antitesttel, szendvics típusú rendszerben történik a troponin I detektálása. Ezzel a megközelítéssel a mérés érzékenysége, specificitása robosztussága jelentős mértékben növelhető. azonban valamint а а receptormolekulákkal szemben fontos követelmény, hogy a fehérjemolekula eltérő epitópjait ismerjék fel. Mivel a Spiegelmer-szelekciót a 28-36-as aminosavak közti а szendvics cTnI szakaszra végeztük, típusú detektálásához második receptormolekulaként olyan antitestet választottunk, amelynek felismerési helye ettől a régiótól távolabb helyezkedik el. Annak bizonyítására, hogy az általunk szelektált Spiegelmer alkalmas lehet az antitestek helyettesítésére, és a szendvicsmódszerrel történő troponin I meghatározást is lehetővé teszi, ALPHA-méréseket végeztünk.

Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy az oligomerek és ligandjaik kölcsönhatása homogén rendszerben ALPHA-módszerrel is eredményesen vizsgálható. Homogén típusú mérési eljárásra a kardiális troponinok klinikai diagnosztikájában is találhatunk példát, ugyanis az automata rendszerek közül a Siemens Dimension készülékek is ezt a technológiát hasznosítják [146]. Fontos kiemelni azonban, hogy az ALPHA-eljárás a heterogén típusú méréshez képest kevésbé robosztus, ugyanis a detektált jel nagysága jelentős idő- és hőmérsékletfüggést mutat, és speciális műszerigénye miatt alkalmazása laboratóriumhoz kötött, így nem alkalmas a betegágy mellett történő diagnosztikára. További hátrányt jelent a donorgyöngyök fényérzékenysége, és a felhasznált gyöngyök magas költsége. Ezek alapján kijelenthető, hogy a módszer nem felel meg a modern klinikai diagnosztikai módszerekkel szemben támasztott követelményeknek. Ugyanakkor az általunk alkalmazott eljárás egyszerűen, mosási lépések nélkül kivitelezhető mérést tett lehetővé, és laboratóriumi körülmények közt ideális megoldást jelentett a Spiegelmerek funkcionalitásának vizsgálatára.

Első kísérleteinket laboratóriumunkban előállított rekombináns cTnI és sTnI fehérjékkel végeztük el. A publikált eredmények szerint a teljes hosszúságú troponin I fehérje túltermeltetése bakteriális rendszerben igen alacsony hatásfokkal működik, ezért úgy döntöttünk, hogy a fehérjéket búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszerben állítjuk elő [158]. A vektorkonstrukciók létrehozását követően a humán fehérjék sikeres termeltetését a Coomassie-festés és az immunoblot eredménye is igazolta. Mivel a szelektált Spiegelmereknek komplex közegben is alkalmasnak kell lenniük a cTnI detektálására, az ALPHAScreen méréseinkhez a rekombináns fehérjét tartalmazó transzlációs elegyet használtuk fel. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a legnagyobb affinitású Spiegelmer a 169-178 aminosavak közti epitópra specifikus antitesttel párban a komplex mátrixban is képes a cTnI-t felismerni. 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 [159]. A homogén mérési rendszerekben fokozottan érvényesülő mátrixhatás miatt azonban szükségünk volt az eljárás további optimalizálására és az antitestek ALPHA-gyöngyökhöz történő immobilizálására. Mivel a gyakorlatban elterjedt dextrán-aldehiddel borított gyöngy alkalmazása nem vezetett eredményre, laboratóriumunkban új, általánosan alkalmazható módszert dolgoztunk ki. Az eljárás során az antitesteket Protein A-n keresztül DMP-vel kapcsoltuk kovalensen a gyöngyökhöz, így biztosítva a cTnI-antitestek megfelelő orientációját. A továbbiakban az ALPHAScreen gyöngyök ALPHALisa típusú gyöngyökkel való helyettesítésével és a méréshez felhasznált puffer optimális összetételének meghatározását követően rendszerünket alkalmassá tettük arra, hogy humán szérummal is elvégezzük a kísérleteket. Az ALPHA-mérések eredményei megerősítették, hogy a cTnI fehérje N-terminálisához közeli régiójára szelektált Spiegelmerünkkel a troponin I specifikus, szendvics elrendezésben történő detektálása is megvalósítható.

Eredményeink szerint a kiválasztott Spiegelmerrel a cTnI monomer és az I-T-C komplex egyaránt detektálható komplex biológia közegben. A troponin I fehérje különböző formáinak mérésekor tapasztalt eltérések rávilágítanak az egységesen, referenciamintaként alkalmazható troponin I standard hiányára és ebből fakadóan a troponin I detektálási eljárások standardizálásának nehézségeire. A jelenleg forgalmazott, troponin I meghatározására alkalmas diagnosztikai rendszerekben ugyanis eltérő epitópokra specifikus antitesteket és különböző típusú troponin standard-eket használnak. Következésképp a meghatározás módjától és a készülék típusától függően az eredmények interpretálásához szükséges küszöbértékek közt is eltérés tapasztalható, ami az eredmények félreértelmezéséhez vezethet, és megnehezíti a klinikusok döntéshozatalát. Ezt kiküszöbölendő néhány évvel ezelőtt több nemzetközi szervezet

együttesen olyan referenciaanyag létrehozását tűzte ki célul, melynek alkalmazása lehetőséget teremtene a mérések egységesítésére. A troponin I standard kiválasztása ugyanakkor a fehérje heterogenitásából adódóan igen nagy kihívást jelent. Christenson és munkatársai 10 különböző referencia-jelöltet vizsgáltak, melyek közül a troponin I-T-C-komplex formái bizonyultak a legmegfelelőbbnek, míg a monomer és az IC komplex a rangsor végén helyezkedett el [160]. Az összehasonlító tanulmány eredményei alapján kiválasztott SRM2921 elnevezésű troponinkomplex később mégsem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, a forgalomban lévő rendszerek mintegy felével nem volt kompatibilis, így a laboratóriumi diagnosztikában alkalmazott cTnI mérések harmonizálására még napjainkig sem került sor. A troponin I standard hiányában az eljárások egységesítésével kapcsolatos problémák megoldására az oligonukleotidreceptorok fejlesztése jelenthet alternatívát, mivel a megfelelő epitópok kiválasztása, az interferáló molekulákra történő kontraszelekció és a szelekció körülményeinek megválasztása egyaránt jól definiált tulajdonságokkal rendelkező felismerő molekulák előállítására ad lehetőséget. Nem elhanyagolható szempont az sem, hogy az antitestekkel ellentétben az oligonukleotidok mindig azonos minőségben, költséghatékonyabban szintetizálhatók, és kiemelkedő stabilitással rendelkeznek. Ezért várhatóan a megfelelő érzékenységű, aptameralapú detektálási eljárások fejlesztése lehetőséget teremt az oligonukleotidok széles körű alkalmazására.

Laboratóriumunk hosszútávú célkitűzései közt egy kizárólag oligonukleotid receptorokon alapuló diagnosztikai eljárás kidolgozása szerepel, ezért a későbbiekben az alkalmazott antitest felismerőhelyével átfedő doménre tervezünk újabb Spiegelmereket szelektálni. További munkánk során ezeket a fehérje C-terminálisához közeli régiójára szelektált Spiegelmereket a már rendelkezésünkre álló, karakterizált Spiegelmerekkel párban a cTnI gyors és érzékeny meghatározását lehetővé tevő mikrofluidikai rendszerben szeretnénk felhasználni.

# 6. 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:

- 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.
- 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.
- 6. 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.

# 7. Összefoglalás

A szívmarkerek kimutatása és mennyiségi meghatározása a szívet illetve a keringést érintő kórképek diagnosztikája során kiemelkedő fontossággal bír. A troponin I és T fehérjék megemelkedett szintje a vérben a szívizom-károsodás rendkívül specifikus indikátora, ezért koncentrációjuk immunanalitikai módszerekkel történő meghatározása napjainkban a miokardiális infarktus gyors és érzékeny diagnosztizálását lehetővé. Az elmúlt években bebizonyosodott, hogy rövid, egyszálú teszi oligonukleotidok is képesek szelektíven, nagy affinitással célmolekuláikhoz kötődni, így megfelelő alternatívái lehetnek az antitesteknek. Számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, többek közt in vitro módszerekkel szelektálhatók, kémiai úton előállíthatók, mindemellett fizikai illetve kémiai hatásokkal szemben rendkívül ellenállóak. Enzimatikus hatásra azonban könnyen degradálódhatnak, ami jelentősen korlátozhatja alkalmazhatóságukat biológiai közegekben. A nukleázrezisztens oligonukleotidok előállítására az ún. Spiegelmerek szintézise jelenthet alternatívát. Ezek az L-nukleotidokból felépülő oligomerek szerkezetüknek köszönhetően kiemelkedő stabilitással rendelkeznek, és ellenállóak a nukleolitikus hasítással szemben. Jelenleg több ígéretes Spiegelmer típusú gyógyszerjelölt a klinikai kísérletek fázisában van. Figyelembe véve ezen molekulatípusok kedvező tulajdonságait, munkánk során kardiális troponin I-t specifikusan felismerő Spiegelmerek előállítását tűztük ki célul. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a peptidepitópok racionális kiválasztásával és a Spiegelmer-jelöltek nagy áteresztőképességű tesztelésével humán fehérjéhez szelektíven kötődő L-oligomerek azonosíthatók. Annak érdekében, hogy elkerüljük a nagyszámú jelölt költséges kémiai szintézisét, egy előszűrési lépést iktattunk be, amelynek során a D-peptid és a D-oligomerek kölcsönhatását vizsgáltuk. Annak bizonyítására, hogy a Spiegelmer szendvics típusú rendszerben, egy másik receptor molekulával párban is felismeri a cTnI-t, homogén típusú mérési eljárást fejlesztettünk. Eredményeink igazolták, hogy a kiválasztott Spiegelmer komplex mátrixban, a vérszérumban is képes a pM-os koncentrációban jelenlévő cTnI-fehérje különböző formáihoz szelektíven kötődni, így ideális receptormolekula lehet a diagnosztikai rendszerekben.

## 8. Summary

The determination and quantification of cardiac biomarkers in blood are crucial in the triage and management of a range of heart and circulation related conditions. The elevated troponin levels are highly specific for cardiac injury thus various antibody based systems have been developed for fast and sensitive detection of myocardial infarction. In the recent years, antibodies have been rivalled by appearance of short single-stranded oligonucleotides with highly discriminative molecular recognition and binding capacity. These relatively small molecules are superior to antibodies in many ways; they are in vitro selected, chemically synthesized and insensitive to chemical and physical agents. However, their application is hampered by their susceptibility to enzymatic degradation. Spiegelmers are artificial oligonucleotides named for being a mirror image of natural D-oligonucleotides. Due to their L-nucleotides, they are highly resistant to nuclease degradation and currently being tested in clinical trials as potential drugs. Considering their advantages, we aimed at producing the first human cardiac troponin I (cTnI) specific Spiegelmers to provide alternative receptors for biosensor development. Our results suggest that protein selective L-oligonucleotides can be effectively selected by rational identification of protein epitopes and high-throughput screening of isolated candidates. To avoid the synthesis of each Spiegelmer candidate, we introduced a prescreening step with a reverse approach to identify the most promising Spiegelmers. The obtained results demonstrate that the Spiegelmer can ensure the required selectivity and can detect various forms of cTnI at physiologically relevant low pM concentrations even in such a complex protein matrix as blood serum. In order to test applicability of the selected Spiegelmer in sandwich ELISA based assays, we developed an Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay (ALPHA) using our receptor and a commercial cTnI selective antibody. The presented results underscore the applicability of Spiegelmers as diagnostic receptors; hence, it could pave the way for the development of oligonucleotide-based, biomarker detecting devices.

## 9. Irodalomjegyzék

- C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell, 35: 849–57.
- K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, T.R. Cech. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. Cell, 31: 147–57.
- C. Tuerk, L. Gold. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science, 249: 505–10.
- 4. A.D. Ellington, J.W. Szostak. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature, 346: 818–22.
- A.D. Ellington, J.W. Szostak. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. Nature, 355: 850–852.
- 6. R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz. (2007) SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomol Eng, 24: 381–403.
- K.L. Hong, L.J. Sooter. (2015) Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications. Biomed Res Int, 2015: 419318.
- J.C. Cox, A. Hayhurst, J. Hesselberth, T.S. Bayer, G. Georgiou, A.D. Ellington. (2002) Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. Nucleic Acids Res, 30: e108.
- A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington. (2010) Aptamers as therapeutics. Nat Rev Drug Discov, 9: 537–550.

- N. Jing, R.F. Rando, Y. Pommier, M.E. Hogan. (1997) Ion Selective Folding of Loop Domains in a Potent Anti-HIV Oligonucleotide. Biochemistry, 36: 12498– 12505.
- 11. M.L. Bochman, K. Paeschke, V.A. Zakian. (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. Nat Rev Genet, 13: 770–80.
- S.C.B. Gopinath. (2009) Mapping of RNA–protein interactions. Anal Chim Acta, 636: 117–128.
- S.B. Long, M.B. Long, R.R. White, B.A. Sullenger. (2008) Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. RNA, 14: 2504–12.
- T. Hayashi, H. Oshima, T. Mashima, T. Nagata, M. Katahira, M. Kinoshita. (2014) Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition. Nucleic Acids Res, 42: 6861–6875.
- N.J. Reiter, L.J. Maher, S.E. Butcher. (2008) DNA mimicry by a high-affinity anti-NF-κB RNA aptamer. Nucleic Acids Res, 36: 1227–1236.
- M. Jing, M.T. Bowser. (2011) Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review. Anal Chim Acta, 686: 9–18.
- R. Huang, Z. Xi, Y. Deng, N. He. (2016) Fluorescence based Aptasensors for the determination of hepatitis B virus e antigen. Sci Rep, 6: 31103.
- Y. Liu, Q. Zhao. (2017) Direct fluorescence anisotropy assay for cocaine using tetramethylrhodamine-labeled aptamer. Anal Bioanal Chem, 409: 3993–4000.
- A.S.R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang, G.W. Jackson, X. Zhang, G.B. Legge, R.C. Willson. (2009) Biophysical characterization of DNA aptamer interactions with vascular endothelial growth factor. Biopolymers, 91: 145–156.

- A.L. Chang, M. McKeague, J.C. Liang, C.D. Smolke. (2014) Kinetic and equilibrium binding characterization of aptamers to small molecules using a label-free, sensitive, and scalable platform. Anal Chem, 86: 3273–8.
- E.F. Ullman, H. Kirakossian, A.C. Switchenko, J. Ishkanian, M. Ericson, C.A. Wartchow, M. Pirio, J. Pease, B.R. Irvin, S. Singh, R. Singh, R. Patel, A. Dafforn, D. Davalian, C. Skold, N. Kurn, D.B. Wagner. (1996) Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. Clin Chem, 42: 1518–26.
- R.M. Eglen, T. Reisine, P. Roby, N. Rouleau, C. Illy, R. Bossé, M. Bielefeld.
  (2008) The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. Curr Chem Genomics, 1: 2–10.
- M. Arcand, P. Roby, R. Bossé, F. Lipari, J. Padrós, L. Beaudet, A. Marcil, S. Dahan. (2010) Single-Well Monitoring of Protein–Protein Interaction and Phosphorylation–Dephosphorylation Events. Biochemistry, 49: 3213–3215.
- M. Bouchecareilh, M.E. Caruso, P. Roby, S. Parent, N. Rouleau, S. Taouji, O. Pluquet, R. Bosse, M. Moenner, E. Chevet. (2010) AlphaScreen(R)-Based Characterization of the Bifunctional Kinase/RNase IRE1 : A Novel and Atypical Drug Target. J Biomol Screen, 15: 406–417.
- N.L. Mills, A.A. Shelat, R.K. Guy. (2007) Assay Optimization and Screening of RNA-Protein Interactions by AlphaScreen. J Biomol Screen, 12: 946–955.
- E. Dausse, S. Taouji, L. Evadé, C. Di Primo, E. Chevet, J.-J. Toulmé, G. Mayer,
  J. Rual, D. Hill, M. Vidal. (2011) HAPIscreen, a method for high-throughput aptamer identification. J Nanobiotechnology 2011 91, 12: 279–284.
- G. Lautner, Z. Balogh, A. Gyurkovics, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros. (2012) Homogeneous assay for evaluation of aptamer–protein interaction. Analyst, 137: 3929.

- 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. (2011) Probing the
  SELEX Process with Next-Generation Sequencing. PLoS One, 6: e29604.
- G. V Kupakuwana, J.E. Crill, M.P. McPike, P.N. Borer, P.N. Borer. (2011) Acyclic identification of aptamers for human alpha-thrombin using overrepresented libraries and deep sequencing. PLoS One, 6: e19395.
- 30. M.A. Ditzler, M.J. Lange, D. Bose, C.A. Bottoms, K.F. Virkler, A.W. Sawyer, A.S. Whatley, W. Spollen, S.A. Givan, D.H. Burke. (2013) High-throughput sequence analysis reveals structural diversity and improved potency among RNA inhibitors of HIV reverse transcriptase. Nucleic Acids Res, 41: 1873–84.
- R. Wilson, C. Bourne, R.R. Chaudhuri, R. Gregory, J. Kenny, A. Cossins. (2014) Single-Step Selection of Bivalent Aptamers Validated by Comparison with SELEX Using High-Throughput Sequencing. PLoS One, 9: e100572.
- L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature, 355: 564–566.
- A. Vater, F. Jarosch, K. Buchner, S. Klussmann. (2003) Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: Tailored-SELEX. Nucleic Acids Res, 31: 130e– 130.
- F. Jarosch, K. Buchner, S. Klussmann. (2006) In vitro selection using a dual RNA library that allows primerless selection. Nucleic Acids Res, 34: e86.
- W. Pan, P. Xin, G. Clawson. (2008) Minimal primer and primer-free SELEX protocols for selection of aptamers from random DNA libraries. Biotechniques, 44: 351–360.
- Y.-T. Lai, J.J. DeStefano. (2011) A primer-free method that selects high-affinity single-stranded DNA aptamers using thermostable RNA ligase. Anal Biochem, 414: 246–53.

- S.C.B. Gopinath. (2006) Methods developed for SELEX. Anal Bioanal Chem, 387: 171–182.
- G. Aquino-Jarquin, J.D. Toscano-Garibay. (2011) RNA aptamer evolution: two decades of SELEction. Int J Mol Sci, 12: 9155–71.
- R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, B. Polisky. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. Science, 263: 1425–9.
- 40. A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, M. Famulok. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. Nucleic Acids Res, 24: 1029–36.
- 41. S. Ohuchi. (2012) Cell-SELEX Technology. Biores Open Access, 1: 265–72.
- 42. W. Kusser. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. J Biotechnol, 74: 27–38.
- P.S. Eder, R.J. DeVine, J.M. Dagle, J.A. Walder. (1991) Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. Antisense Res Dev, 1: 141–51.
- 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. (2013) Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation. Sensors (Basel), 13: 13624–37.
- 45. A. V Lakhin, V.Z. Tarantul, L. V Gening. (2013) Aptamers: problems, solutions and prospects. Acta Naturae, 5: 34–43.
- T. Mairal, V. Cengiz Özalp, P. Lozano Sánchez, M. Mir, I. Katakis, C.K. O'Sullivan. (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. Anal Bioanal Chem, 390: 989–1007.

- R. Padilla, R. Sousa. (1999) Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with non- canonical ribose 2'-groups using a mutantT7 RNA polymerase (RNAP). Nucleic Acids Res, 27: 1561–1563.
- F. Lipi, S. Chen, M. Chakravarthy, S. Rakesh, R.N. Veedu. (2016) In vitro evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies. RNA Biol, 13: 1232–1245.
- M. Kuwahara, Y. Takahata, A. Shoji, A.N. Ozaki, H. Ozaki, H. Sawai. (2003) Substrate properties of C5-substituted pyrimidine 2'-deoxynucleoside 5'triphosphates for thermostable DNA polymerases during PCR. Bioorg Med Chem Lett, 13: 3735–8.
- Y. Lin, Q. Qiu, S.C. Gill, S.D. Jayasena. (1994) Modified RNA sequence pools for in vitro selection. Nucleic Acids Res, 22: 5229–34.
- T. Ohbayashi, M. Kuwahara, M. Hasegawa, T. Kasamatsu, T. Tamura, H. Sawai, Y. Kai, T. Imanaka, J.A. Grasby, D.M. Williams. (2005) Expansion of repertoire of modified DNAs prepared by PCR using KOD Dash DNA polymerase. Org Biomol Chem, 3: 2463.
- D.J. King, D.A. Ventura, A.R. Brasier, D.G. Gorenstein. (1998) Novel Combinatorial Selection of Phosphorothioate Oligonucleotide Aptamers <sup>†</sup>. Biochemistry, 37: 16489–16493.
- 53. M.L. Andreola, C. Calmels, J. Michel, J.J. Toulmé, S. Litvak. (2000) Towards the selection of phosphorothioate aptamers optimizing in vitro selection steps with phosphorothioate nucleotides. Eur J Biochem, 267: 5032–40.
- 54. A.A. Koshkin, S.K. Singh, P. Nielsen, V.K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C.E. Olsen, J. Wengel. (1998) LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. Tetrahedron, 54: 3607–3630.

- 55. S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J.-I. Andoh, K.-I. Morio, T. Doi, T. Imanishi. (1998) Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-Cmethyleneribonucleosides. Pergamon Tetrahedron Lett, 39: 5401–5404.
- R.N. Veedu, B. Vester, J. Wengel. (2007) Enzymatic Incorporation of LNA Nucleotides into DNA Strands. ChemBioChem, 8: 490–492.
- 57. M. Kuwahara, S. Obika, J. Nagashima, Y. Ohta, Y. Suto, H. Ozaki, H. Sawai, T. Imanishi. (2008) Systematic analysis of enzymatic DNA polymerization using oligo-DNA templates and triphosphate analogs involving 2',4'-bridged nucleosides. Nucleic Acids Res, 36: 4257–65.
- H. Doessing, L. Hansen, R. Veedu, J. Wengel, B. Vester. (2012) Amplification and Re-Generation of LNA-Modified Libraries. Molecules, 17: 13087–13097.
- 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. (2013) Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation. Sensors (Basel), 13: 13624–37.
- 60. F. Tolle, G. Mayer. (2013) Dressed for success applying chemistry to modulate aptamer functionality. Chem Sci, 4: 60–67.
- S. Klußmann, A. Nolte, R. Bald, V.A. Erdmann, J.P. Fürste. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. Nat Biotechnol Publ Online 01 Sept 1996; |
- K.P. Williams, X.H. Liu, T.N. Schumacher, H.Y. Lin, D.A. Ausiello, P.S. Kim,
  D.P. Bartel. (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. Proc Natl Acad Sci U S A, 94: 11285–90.
- R.C. deL. Milton, S.C.F. Milton, S.B.H. Kent. (n.d.) Total Chemical Synthesis of a D-Enzyme: The Enantiomers of HIV-1 Protease Show Demonstration of Reciprocal Chiral Substrate Specificity. Science (80-), 256: 1445–1448.

- A. Vater, S. Klussmann. (2015) Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer(®) therapeutics. Drug Discov Today, 20: 147–55.
- 65. N.H. Trier, P.R. Hansen, G. Houen. (2012) Production and characterization of peptide antibodies. Methods, 56: 136–144.
- 66. W.G. Purschke, F. Radtke, F. Kleinjung, S. Klussmann. (2003) A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B. Nucleic Acids Res, 31: 3027–32.
- 67. C. Olea, J. Weidmann, P.E. Dawson, G.F. Joyce. (2015) An L-RNA Aptamer that Binds and Inhibits RNase. Chem Biol, 22: 1437–1441.
- A. Vater, S. Klussmann. (2015) Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer therapeutics. Drug Discov Today, 20: 147– 155.
- A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington. (2010) Aptamers as therapeutics. Nat Rev Drug Discov, 9: 537–550.
- D. Jellinek, L.S. Green, C. Bell, N. Janjic. (1994) Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. Biochemistry, 33: 10450–10456.
- L.S. Green, D. Jellinek, C. Bell, L.A. Beebe, B.D. Feistner, S.C. Gill, F.M. Jucker, N. Janjić. (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. Chem Biol, 2: 683–95.
- 72. J. Ruckman, L.S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W.L. Gillette, D.D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjić. (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. J Biol Chem, 273: 20556–67.

- J.M. Healy, S.D. Lewis, M. Kurz, R.M. Boomer, K.M. Thompson, C. Wilson, T.G. McCauley. (2004) Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. Pharm Res, 21: 2234–46.
- J. Zhou, J. Rossi. (2016) Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. Nat Rev Drug Discov, 16: 181–202.
- 75. H. Jo, C. Ban. (2016) Aptamer–nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools. Exp Mol Med, 48: e230.
- N.S. Que-Gewirth, B.A. Sullenger. (2007) Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. Gene Ther, 14: 283–291.
- 77. K.W. Thiel, L.I. Hernandez, J.P. Dassie, W.H. Thiel, X. Liu, K.R. Stockdale, A.M. Rothman, F.J. Hernandez, J.O. McNamara, P.H. Giangrande, P.H. Giangrande. (2012) Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers. Nucleic Acids Res, 40: 6319–37.
- 78. W.H. Thiel, T. Bair, A.S. Peek, X. Liu, J. Dassie, K.R. Stockdale, M.A. Behlke, F.J. Miller, P.H. Giangrande, P.H. Giangrande. (2012) Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cellbased aptamer selection. PLoS One, 7: e43836.
- Y.Z. Huang, F.J. Hernandez, B. Gu, K.R. Stockdale, K. Nanapaneni, T.E. Scheetz, M.A. Behlke, A.S. Peek, T. Bair, P.H. Giangrande, J.O. McNamara, II. (2012) RNA aptamer-based functional ligands of the neurotrophin receptor, TrkB. Mol Pharmacol, 82: 623–35.
- J.O. McNamara, E.R. Andrechek, Y. Wang, K.D. Viles, R.E. Rempel, E. Gilboa,
  B.A. Sullenger, P.H. Giangrande. (2006) Cell type–specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. Nat Biotechnol, 24: 1005–1015.
- J.P. Dassie, X. Liu, G.S. Thomas, R.M. Whitaker, K.W. Thiel, K.R. Stockdale, D.K. Meyerholz, A.P. McCaffrey, J.O. McNamara, P.H. Giangrande. (2009) Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. Nat Biotechnol, 27: 839–846.

- J. Wu, Y. Zhu, F. Xue, Z. Mei, L. Yao, X. Wang, L. Zheng, J. Liu, G. Liu, C. Peng, W. Chen. (2014) Recent trends in SELEX technique and its application to food safety monitoring. Mikrochim Acta, 181: 479–491.
- Q. Zhu, G. Liu, M. Kai. (2015) DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. Molecules, 20: 20979–20997.
- 84. M. U, Cencic A, Gorenjak M, P. S. (2012) Clinical and Experimental Pharmacology Generating Aptamers for Cancer Diagnosis and Therapy. Clin Exp Pharmacol, 2:.
- C. Champanhac, I.-T. Teng, S. Cansiz, L. Zhang, X. Wu, Z. Zhoa, T. Fu, W. Tan. (2015) Development of a panel of DNA Aptamers with High Affinity for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Sci Rep, 5: 16788.
- X. Wu, H. Liang, Y. Tan, C. Yuan, S. Li, X. Li, G. Li, Y. Shi, X. Zhang. (2014) Cell-SELEX Aptamer for Highly Specific Radionuclide Molecular Imaging of Glioblastoma In Vivo. PLoS One, 9: e90752.
- 87. Q. Zhu, G. Liu, M. Kai. (2015) DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. Molecules, 20: 20979–20997.
- A.G. Szent-Györgyi. (2004) The early history of the biochemistry of muscle contraction. J Gen Physiol, 123: 631–41.
- J.D. Potter, J. Gergely. (1974) Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca<sup>2+</sup> regulation of muscle contraction. Biochemistry, 13: 2697–703.
- A.M. Gordon, E. Homsher, M. Regnier. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. Physiol Rev, 80: 853–924.
- P.M. Hwang, B.D. Sykes. (2015) Targeting the sarcomere to correct muscle function. Nat Rev Drug Discov, 14: 313–328.
- S. Ebashi, F. Ebashi. (1964) A New Protein Component Participating in the Superprecipitation of Myosin B. J Biochem, 55: 604–613.

- S. Ebashi, A. Kodama, F. Ebashi. (1968) Troponin. I. Preparation and physiological function. J Biochem, 64: 465–77.
- 94. C.S. Farah, F.C. Reinach. (1995) The troponin complex and regulation of muscle contraction. FASEB J, 9: 755–67.
- 95. P.F. Flicker, G.N. Phillips, C. Cohen. (1982) Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. J Mol Biol, 162: 495–501.
- 96. S.P. White, C. Cohen, G.N. Phillips Jr. (1987) Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. Nature, 325: 826–828.
- 97. S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda, Y. Maéda. (2003) Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca<sup>2+</sup>-saturated form. Nature, 424: 35–41.
- 98. J.-J. Sheng, J.-P. Jin. (2014) Gene regulation, alternative splicing, and posttranslational modification of troponin subunits in cardiac development and adaptation: a focused review. Front Physiol, 5: 165.
- 99. J.-J. Sheng, J.-P. Jin. (2016) TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure–function relationships. Gene, 576: 385–394.
- O. Herzberg, M.N.G. James. (1985) Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. Nature, 313: 653–659.
- H. Kawasaki, S. Nakayama, R.H. Kretsinger. (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. Biometals, 11: 277–95.
- 102. J.H. Collins. (1991) Myosin light chains and troponin C: structural and evolutionary relationships revealed by amino acid sequence comparisons. J Muscle Res Cell Motil, 12: 3–25.
- S. V Perry. (1998) Troponin T: genetics, properties and function. J Muscle Res Cell Motil, 19: 575–602.

- B. Wei, J.-P. Jin. (2011) Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. Arch Biochem Biophys, 505: 144–54.
- J.-P. Jin, Z. Zhang, J.A. Bautista. (2008) Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 18: 93–124.
- L. Saggin, L. Gorza, S. Ausoni, S. Schiaffino. (1989) Troponin I switching in the developing heart. J Biol Chem, 264: 16299–302.
- 107. B.M. Wolska, K. Vijayan, G.M. Arteaga, J.P. Konhilas, R.M. Phillips, R. Kim, T. Naya, J.M. Leiden, A.F. Martin, P.P. de Tombe, R.J. Solaro. (2001) Expression of slow skeletal troponin I in adult transgenic mouse heart muscle reduces the force decline observed during acidic conditions. J Physiol, 536: 863–70.
- 108. R.J. Solaro, J.A. Lee, J.C. Kentish, D.G. Allen. (1988) Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. Circ Res, 63: 779–87.
- R. Parvari, A. Levitas. (2012) The Mutations Associated with Dilated Cardiomyopathy. Biochem Res Int, 2012: 1–12.
- F. Yumoto, Q.-W. Lu, S. Morimoto, H. Tanaka, N. Kono, K. Nagata, T. Ojima, F. Takahashi-Yanaga, Y. Miwa, T. Sasaguri, K. Nishita, M. Tanokura, I. Ohtsuki. (2005) Drastic Ca<sup>2+</sup> sensitization of myofilament associated with a small structural change in troponin I in inherited restrictive cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun, 338: 1519–1526.
- J.G. Seidman, C. Seidman. (2001) The Genetic Basis for Cardiomyopathy. Cell, 104: 557–567.
- 112. K. Curila, L. Benesova, M. Penicka, M. Minarik, D. Zemanek, J. Veselka, P. Widimsky, P. Gregor. (2012) Spectrum and clinical manifestations of mutations in genes responsible for hypertrophic cardiomyopathy. Acta Cardiol, 67: 23–29.
- 113. N.J. Palpant, E.M. Houang, W. Delport, K.E.M. Hastings, A. V. Onufriev, Y.Y. Sham, J.M. Metzger. (2010) Pathogenic peptide deviations support a model of adaptive evolution of chordate cardiac performance by troponin mutations. Physiol Genomics, 42:.
- J.-P. Jin, Z. Zhang, J.A. Bautista. (2008) Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 18: 93–124.
- 115. Z. Zhang, S. Akhter, S. Mottl, J.-P. Jin. (2011) Calcium-regulated conformational change in the C-terminal end segment of troponin I and its binding to tropomyosin. FEBS J, 278: 3348–3359.
- 116. R.J. Solaro, T. Kobayashi. (2011) Protein Phosphorylation and Signal Transduction in Cardiac Thin Filaments. J Biol Chem, 286: 9935–9940.
- J. Layland, R. Solaro, A. SHAH. (2005) Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. Cardiovasc Res, 66: 12–21.
- 118. K. Nishikawa, A. Toker, F.J. Johannes, Z. Songyang, L.C. Cantley, D.L. Geenen, et al. (1997) Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. J Biol Chem, 272: 952–960.
- 119. P.J.M. Wijnker, A.M. Murphy, G.J.M. Stienen, J. van der Velden. (2014) Troponin I phosphorylation in human myocardium in health and disease. Netherlands Hear J, 22: 463–469.
- 120. F. Di Lisa, R. De Tullio, F. Salamino, R. Barbato, E. Melloni, N. Siliprandi, S. Schiaffino, S. Pontremoli. (1995) Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. Biochem J, 308: 57.
- 121. D.B. Foster. (2003) C-Terminal Truncation of Cardiac Troponin I Causes Divergent Effects on ATPase and Force: Implications for the Pathophysiology of Myocardial Stunning. Circ Res, 93: 917–924.

- 122. Z.-B. Yu, L.-F. Zhang, J.-P. Jin. (2001) A Proteolytic NH2-terminal Truncation of Cardiac Troponin I That Is Up-regulated in Simulated Microgravity. J Biol Chem, 276: 15753–15760.
- 123. A. Elsayed Azab. (2017) Acute Myocardial Infarction Risk Factors and Correlation of its Markers with Serum Lipids. J Appl Biotechnol Bioeng, 3:.
- 124. K.M. Eggers, L. Lind, P. Venge, B. Lindahl. (2009) Will the Universal Definition of Myocardial Infarction Criteria Result in an Overdiagnosis of Myocardial Infarction? AJC, 103: 588–591.
- P.O. Collinson, D.C. Gaze. (2007) Biomarkers of Cardiovascular Damage and Dysfunction?An Overview. Hear Lung Circ, 16: S71–S82.
- 126. P. P. (2000) Myocardial infarction redefined?A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. Eur Heart J, 21: 1502–1513.
- L. Babuin, A.S. Jaffe. (2005) Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. C Can Med Assoc J, 173: 1191–1202.
- 128. R.S. Wright, J.L. Anderson, C.D. Adams, C.R. Bridges, D.E. Casey, S.M. Ettinger, F.M. Fesmire, T.G. Ganiats, H. Jneid, A.M. Lincoff, E.D. Peterson, G.J. Philippides, P. Theroux, N.K. Wenger, J.P. Zidar, J.L. Anderson, C.D. Adams, E.M. Antman, C.R. Bridges, R.M. Califf, D.E. Casey, W.E. Chavey, F.M. Fesmire, J.S. Hochman, T.N. Levin, A.M. Lincoff, E.D. Peterson, P. Theroux, N.K. Wenger, J.P. Zidar, American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. (2011) 2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non–ST-Elevation Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol, 57: e215–e367.

- K. Thygesen, J.S. Alpert, A.S. Jaffe, M.L. Simoons, B.R. Chaitman, H.D. White, K. Thygesen, J.S. Alpert, H.D. White, A.S. Jaffe, H.A. Katus, F.S. Apple, B. Lindahl, D.A. Morrow, B.R. Chaitman, P.M. Clemmensen, P. Johanson, H. Hod, R. Underwood, J.J. Bax, R.O. Bonow, F. Pinto, R.J. Gibbons, K.A. Fox, D. Atar, L.K. Newby, M. Galvani, C.W. Hamm, B.F. Uretsky, P.G. Steg, W. Wijns, J.-P. Bassand, P. Menasche, J. Ravkilde, E.M. Ohman, E.M. Antman, L.C. Wallentin, P.W. Armstrong, M.L. Simoons, J.L. Januzzi, M.S. Nieminen, M. Gheorghiade, G. Filippatos, R. V Luepker, S.P. Fortmann, W.D. Rosamond, D. Levy, D. Wood, S.C. Smith, D. Hu, J.-L. Lopez-Sendon, R.M. Robertson, D. Weaver, M. Tendera, A.A. Bove, A.N. Parkhomenko, E.J. Vasilieva, S. Mendis. (2012) Third Universal Definition of Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol, 60: 1581–1598.
- 130. F. Ottani, M. Galvani, F.A. Nicolini, D. Ferrini, A. Pozzati, G. Di Pasquale, A.S. Jaffe. (2000) Elevated cardiac troponin levels predict the risk of adverse outcome in patients with acute coronary syndromes. Am Heart J, 140: 917–927.
- 131. A.H. Wu, Y.J. Feng. (1998) Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. Eur Hear J, 19 Suppl N: N25-9.
- 132. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja: Az acut coronaria szindróma (ACS) laboratóriumi diagnosztikája, http://www.kk.pte.hu/docs/protokollok/ORV.LABACS\_P.pdf
- 133. W.E. Kelley, J.L. Januzzi, R.H. Christenson. (2009) Increases of Cardiac Troponin in Conditions other than Acute Coronary Syndrome and Heart Failure. Clin Chem, 55: 2098–2112.
- 134. P.E. Hickman, J.M. Potter, C. Aroney, G. Koerbin, E. Southcott, A.H.B. Wu, M.S. Roberts. (2010) Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. Clin Chim Acta, 411: 318–323.

- O. Bergmann, R.D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabé-Heide, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B.A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge, J. Frisén. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science (80-), 324: 98–102.
- 136. R. Wießner, K. Hannemann-Pohl, R. Ziebig, H. Grubitzsch, B. Hocher, O. Vargas-Hein, A. Lun, I. Schimke, L. Liefeldt. (2008) Impact of kidney function on plasma troponin concentrations after coronary artery bypass grafting. Nephrol Dial Transplant, 23(1):231-8.
- A.G. Katrukha, A. V. Bereznikova, V.L. Filatov, T. V. Esakova, O. V. Kolosova, K. Pettersson, T. Lövgren, T. V. Bulargina, I.R. Trifonov, N.A. Gratsiansky, K. Pulkki, L.-M. Voipio-Pulkki, N.B. Gusev. (1998) Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. Clin Chem, 44:.
- I.A. Katrukha. (2013) Human cardiac troponin complex. Structure and functions. Biochem, 78: 1447–1465.
- G. Lippi, G. Cervellin. (2013) High-Sensitivity Troponin T is More Susceptible than High-Sensitivity Troponin I to Impaired Renal Function. Am J Cardiol, 112: 1985.
- 140. M.F. Fathil, M.K. Md Arshad, S.C. Gopinath, U. Hashim, R. Adzhri, R.M. Ayub, A.R. Ruslinda, M.N.M. Nuzaihan, A.H. Azman, M. Zaki, T.H. Tang. (2015) Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. Biosens Bioelectron, 70: 209–220.
- 141. S.J. Aldous, C.M. Florkowski, I.G. Crozier, J. Elliott, P. George, J.G. Lainchbury, R.J. Mackay, M. Than. (2011) Comparison of high sensitivity and contemporary troponin assays for the early detection of acute myocardial infarction in the emergency department. Ann Clin Biochem, 48: 241–248.
- 142. D. Rittoo, A. Jones, B. Lecky, D. Neithercut. (2014) Elevation of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, in patients with neuromuscular diseases. J Am Coll Cardiol, 63: 2411–2420.

- B. Cummins, M.L. Auckland, P. Cummins. (1987) Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. Am Heart J, 113: 1333–44.
- 144. H.A. Katus, A. Remppis, S. Looser, K. Hallermeier, T. Scheffold, W. Kübler. (1989) Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. J Mol Cell Cardiol, 21: 1349–53.
- 145. X. Han, S. Li, Z. Peng, A.M. Othman, R. Leblanc. (2016) Recent Development of Cardiac Troponin I Detection.
- 146. M.M. Arrebola, J.A. Lillo, M.J. Diez De Los Ríos, M. Rodríguez, A. Dayaldasani, R. Yahyaoui, V. Pérez. (2010) Analytical performance of a sensitive assay for cardiac troponin I with loci<sup>TM</sup> technology. Clin Biochem, 43: 998–1002.
- A.G. Katrukha, A. V Bereznikova, V.L. Filatov, T. V Esakova, O. V Kolosova,
  K. Pettersson, T. Lövgren, T. V Bulargina, I.R. Trifonov, N.A. Gratsiansky, K.
  Pulkki, L.M. Voipio-Pulkki, N.B. Gusev. (1998) Degradation of cardiac troponin
  I: implication for reliable immunodetection. Clin Chem, 44: 2433–40.
- V.S. Mahajan, P. Jarolim. (2011) How to interpret elevated cardiac troponin levels. Circulation, 124: 2350–2354.
- 149. J.R. Tate, W. Ferguson, R. Bais, K. Kostner, T. Marwick, A. Carter. (2008) The determination of the 99th centile level for troponin assays in an Australian reference population. Ann Clin Biochem, 45: 275–288.
- F.S. Apple, P.O. Collinson, IFCC Task Force on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. (2012) Analytical Characteristics of High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays. Clin Chem, 58: 54–61.
- P. Jarolim. (2015) High sensitivity cardiac troponin assays in the clinical laboratories. Clin Chem Lab Med, 53: 635–652.

- 152. R. Bingisser, C. Cairns, M. Christ, P. Hausfater, B. Lindahl, J. Mair, M. Panteghini, C. Price, P. Venge. (2012) Cardiac troponin: a critical review of the case for point-of-care testing in the ED. Am J Emerg Med, 30: 1639–49.
- 153. G.L. Ellman. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys, 82: 70–7.
- 154. N.A. Morjana. (1998) Degradation of human cardiac troponin I after myocardial infarction. Biotechnol Appl Biochem, 28 (Pt 2): 105–11.
- 155. D.C. Gaze, P.O. Collinson. (2014) Cardiac troponin I but not cardiac troponin T adheres to polysulfone dialyser membranes in an in vitro haemodialysis model: explanation for lower serum cTnI concentrations following dialysis. Open Hear, 1: e000108.
- 156. US 8404448 B2 Dna Aptamer Specifically Binding To Human Cardiac Troponin I - The Lens. https://www.lens.org/lens/patent/JP\_2012254075\_A
- 157. M.S. Lowenthal, H. Gasca-Aragon, J.E. Schiel, N.G. Dodder, D.M. Bunk. (2011) A quantitative LC–MS/MS method for comparative analysis of capture-antibody affinity toward protein antigens. J Chromatogr B, 879: 2726–2732.
- Z.-B. Yu, J.-P. Jin. (2007) Removing the regulatory N-terminal domain of cardiac troponin I diminishes incompatibility during bacterial expression. Arch Biochem Biophys, 461: 138–45.
- 159. Y. Mak, D.J. Skylas, R. Willows, A. Connolly, S.J. Cordwell, C.W. Wrigley, P.J. Sharp, L. Copeland. (2006) A proteomic approach to the identification and characterisation of protein composition in wheat germ. Funct Integr Genomics, 6: 322–337.
- 160. R.H. Christenson, Show Hong Duh, F.S. Apple, G.S. Bodor, D.M. Bunk, J. Dalluge, M. Panteghini, J.D. Potter, M.J. Welch, A.H.B. Wu, S.E. Kahn. (2001) Standardization of cardiac troponin I assays: Round robin of ten candidate reference materials. Clin Chem, 47: 431–437.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

#### Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

**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

**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

#### Egyéb közlemények:

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

### 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Mandl József Professzor Úrnak, hogy biomérnök hallgatóként lehetőséget kaptam az Orvosi Vegytani Intézetben TDK és PhD munkát végezni, továbbá köszönöm hasznos tanácsait, és hogy figyelemmel kísérte munkámat. Köszönöm Prof. Bánhegyi Gábor Igazgató Úrnak, hogy a PhD-képzést követően is helyet biztosított számomra az Intézetben.

A legnagyobb köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Mészáros Tamásnak, hálás vagyok, hogy a tanítványa lehetek. Köszönöm, hogy kérdéseimre mindig türelmesen válaszolt, és mindent elmagyarázott. Köszönöm, hogy irányította munkám, ugyanakkor lehetőséget adott az önálló gondolkodásra is. Köszönöm, hogy folyamatosan biztosította munkacsoportunk számára a munkához szükséges feltételeket, akkor is, ha ehhez pályázatok sokaságát kellett elkészítenie. Nagyon köszönöm, hogy bármikor számíthattam támogatására, tanácsaira és segítségére. Köszönöm, hogy mindig tudta, mikor van a legnagyobb szükség a csokira és a pöttyös Gurukra, és akkor is hitt a kísérletek eredményességében, amikor én már feladtam volna.

Köszönet illeti Dr. Balogh Zsófiát, aki a kezdetekben laboratóriumi munkámhoz nyújtott segítséget, és a dolgozatban bemutatott kísérleti technikák nagy részét megtanította.

Köszönöm Dr. Gyurcsányi Róbert Professzor Úrnak és Dr. Lautner Gergelynek, hogy munkájukkal, tanácsaikkal hozzájárultak a dolgozatban bemutatott munka eredményeihez.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani munkacsoportunk minden tagjának és többi kollégámnak segítségükért, a közösen eltöltött vidám percekért. Hálás vagyok, amiért mindenben számíthattam rájuk. Köszönettel tartozom Doleschall Anna TDK hallgatónknak kitartásáért és eredményes, lelkiismeretesen végzett munkájáért. Köszönöm Nagyné Dr. Scholz Évának a folyamatos biztatást, és a dolgozat szövegének gondos lektorálását, valamint a Csalamunkacsoportnak a technikai problémák megoldását és Mile Valériának mindenre kiterjedő segítségét. Hálásan köszönöm Dr. Rónai Zsoltnak, amiért mindig számíthattam segítségére. Továbbá köszönöm Dr. Szarka Andrásnak, amiért egyetemi tanulmányaim során érdekes előadásaival felkeltette figyelmem a klinikai kémia és a molekuláris biológia iránt.

Végül szeretnék köszönetet mondani Családomnak és Barátaimnak, nélkülük nem sikerült volna kitűzött céljaimat megvalósítani.

# 12. Függelék



1. ábra: A variábilis szakaszok összehasonlító analízisének eredménye.



2. ábra: Hemoglobin abszorpciós spektruma.



3. ábra: ALPHAScreen és ALPHALisa gyöngyök emissziós spektruma.



4. ábra: Pufferösszetétel hatásának vizsgálata az ALPHALisa rendszerben.