

Szelektív szintetikus receptorok fejlesztése és alkalmazása fehérjék meghatározására[§]

LAUTNER Gergely^{a,*} és GYURCSÁNYI E. Róbert^{a,b}

^aBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

^bMTA-BME „Lendület” Kémiai Nanoszenzorok Kutatócsoport, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A bioanalitikát forradalmasították a biológiai eredetű molekulák, pl. enzimek, nukleinsavak és ellenanyagok, szelektív molekuláris felismerésre történő alkalmazása. A rendkívül szelektív, esetenként specifikus, biomolekuláris kölcsönhatások (ellenanyag-antigén, enzim-szubsztrát, komplementer nukleinsav szálak hibridizációja) lehetővé tették a bioszenzorok, illetve a nagy áteresztőképességű biochip technológia kifejlesztését.

A biológiai eredetű receptorok (receptor alatt itt a szelektív felismerésért felelős molekulát értjük, amely nem-kovalens kötések kialakításán keresztül lép kölcsönhatásba a meghatározandó komponenssel) előnyös tulajdonságaik mellett jelentős hátrányokkal is bírnak. Így alkalmazásuk általában csak a természetes közegűeknek megfelelő körülményekre (pH, ionerősség, hőmérséklet, stb.) korlátozódik. Emellett sok esetben nem megoldott a költséghatékony, reprodukálható és nagy mennyiségben történő előállításuk sem. További problémát jelent a bioreceptorok stabilitása, tárolhatósága különböző hőmérséklet viszonyok között. Ennek megfelelően jelentős előrelépést jelenthet a robusztus, tetszőleges fizikai-kémiai tulajdonságokkal bíró, szintetikus úton előállított receptorok alkalmazása. Doktori munkám célkitűzése két különböző típusú szintetikus receptor fejlesztése és analitikai alkalmazása volt fehérjék meghatározására: *DNS aptamerek és molekuláris lenyomatú polimerek*.

1.1. Aptamerek

Az aptamerek tipikusan 40-80 bázisból álló egyszálú oligonukleotidok, amelyek megfelelő három-dimenziós szerkezet felvételén keresztül képesek szelektíven kötődni egy adott célmolekulához. Az aptamerek bázissorrendjének megállapítása és előállításuk tisztán szintetikus úton, *in vitro* eljárással történik. Ennek megfelelően alkalmazási körük is kiterjedtebb lehet, mint az antitesteké, ugyanis az aptamerek akár kismolekulákra, toxikus anyagokra is előállíthatók, és alkalmazásuk során nem szükséges fiziológiai körülményeket biztosítani. Az aptamerek szelektivitását lehetővé tevő SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) eljárás 1990-es kifejlesztése óta^{1,2} nagyon sok célmolekulára szelektáltak aptamereket.³ A módszer lényege, hogy egy rendkívül nagyszámú (10^{13} - 10^{15} féle) véletlenszerű oligonukleotid szekvenciát tartalmazó könyvtárból iteratív eljárással kiválasztják azokat a szekvenciákat, amelyek egy adott célvegyülethez kötődnek. A célvegyületet leggyakrabban egy szilárd hordozó

felületére immobilizálják (pl. mágneses részecske) és a nem-kötődő szekvenciákat mosási lépésekkel elválasztják, majd a célmolekulához kötődő oligonukleotidokat polimeráz láncreakcióval sokszorosítják. A folyamatot többször megismételve egy olyan oligonukleotid könyvtárhoz jutnak, amelyben feldúsulnak a célmolekulához kötődő szekvenciák, az aptamerek. Szekvenálás után, a szekvenciájuk ismeretében, az aptamereket szintetikus úton elő lehet állítani. Fontos kihangsúlyozni, hogy az eddig szelektált aptamerek döntően nem analitikai, hanem molekuláris biológiai, vagy éppen terápiás célra, biológusok által lettek kifejlesztve. Rendkívül kevés olyan tanulmány áll rendelkezésre, amelyekben az aptamer alapú szenzorok fejlesztése végig van vezetve a szelektiótól az analitikai alkalmazásig. A komplex mintákban történő mérésekhez azonban elengedhetetlen a megfelelő közegben való szelektálás és a mintában jelenlevő komponensek zavaró hatásának kiküszöbölése kontraszelekcióval. Kontraszelekcióval távolítjuk el a könyvtárból a zavaró komponensekhez kötődő oligonukleotidokat a szelektió előtt és közben.

Ennek megfelelően célunk originális aptamer szekvenciák szelektálásával és felhasználásával egy olyan aptamer szenzorchip fejlesztése volt, amellyel specifikusan detektálhatók akár homológ vírusfehérjék is. Modellként egy patogén növényi vírust, az alma törzsgöndörödés vírust (Apple Stem Pitting Virus – ASPV) választottuk, mely kétféle kapszid fehérjével (MT32 és PSA-H) fordul elő a természetben, és amelyek aminosav szekvenciája 81%-ban azonos.

A munka sarkalatos pontja volt az aptamerek és a fehérjék közötti kölcsönhatás jellemzése, amelyhez az esetek többségében a kölcsönhatások kinetikájának valós idejű, jelölés nélküli nyomon követését lehetővé tevő felületi plazmon rezonanciát (Surface Plasmon Resonance - SPR) alkalmaztunk. Emellett az aptamer-fehérje kölcsönhatások mérésére kidolgoztunk egy nagy jelerősítésű homogén távolság modulált lumineszcens módszert (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay - ALPHA). Ez alapot ad az aptamer szelektió során kapott oligonukleotid szálak közül a megfelelő analitikai tulajdonságokkal rendelkező aptamer gyors kiválasztására.

1.2. Felületi lenyomatú polimerek

A doktori munkám másik fő kutatási irányvonala fehérjék szelektív meghatározására alkalmas molekuláris lenyomatot

[§] PhD értekezés összefoglalója

* Főszerző. Tel.: +36 1 463 1598; fax: +36 1 463 1598; e-mail: glautner@mail.bme.hu

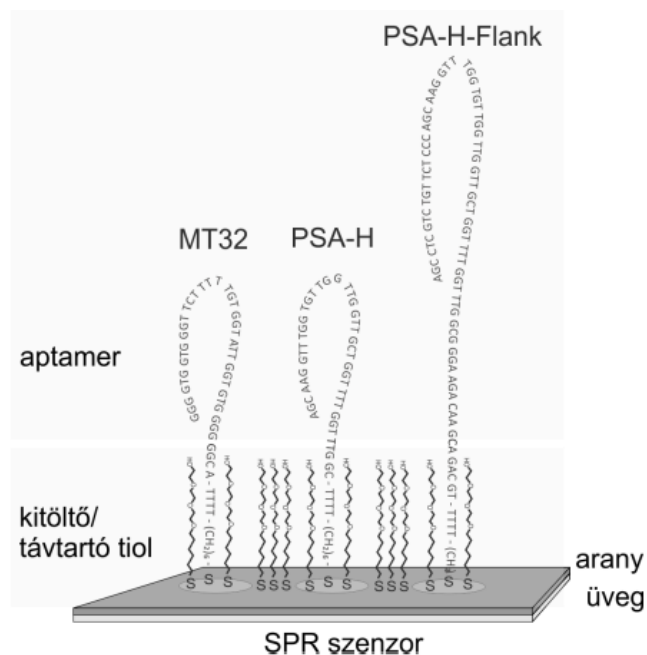
tartalmazó polimerek fejlesztése volt. A molekuláris lenyomatú polimerek (Molecularly Imprinted Polymer–MIP) előállítására megfelelő funkcionális monomer egységekből, polimerizációval történik a célmolekula jelenlétében. Ennek eltávolítása után a polimerben visszamaradt negatív lenyomat lehetőséget ad a célmolekula szelektív visszakötésére. Ez az univerzális elv, amely kimondottan sikeresnek bizonyult kis molekulatömegű komponensekre szelektív MIP-ek előállítására, a makromolekuláris célvegyületek esetében több okból nehézségbe ütközik. Így a makromolekulák mozgása gátolt a konvencionális molekuláris lenyomatot tartalmazó tömbpolimerekben és a polimerizáció után a makromolekulák eltávolítása a polimerből nem lehetséges.^{4,5} A probléma megoldásához felületi lenyomatú polimer mikroszerkezetek előállítására és alkalmazására dolgoztunk ki elektrokémiai módszert. Ennek segítségével a fehérje felismerésére alkalmas felületi lenyomatú polimer közvetlenül az SPR szenzorchipen állítottuk elő.

2. Eredmények

2.1. Aptamer alapú SPR szenzorchipek fejlesztése növényi vírusfehérjék kimutatásához⁶

Az SPR bioszenzorok esetében a szelektív molekuláris felismerést biztosító komponenst a szenzorchip felületére kell immobilizálni. Az aptamerek a felületi borítottság és a szenzorchip alaposabb optimalizálását igénylik, mint az antitestek, mivel nagymértékű konformációs flexibilitásuknak köszönhetően adaptív felismerési mechanizmussal kötődnek a ligandumaikhoz.⁷ Munkám során tiol módosítással ellátott aptamerek (HS-aptamer) közvetlen immobilizációját vizsgáltam arany szenzorchipen. Vizsgáltam az oligonukleotid hosszának hatását a felületi borítottságra, valamint a felületen található egyéb, térkitöltő tiolok és a primer felismerő (flank) régiók hatását a specifikus és nem-specifikus adszorpcióra az SPR szenzor felületén (1. Ábra). Mivel a korábbi tanulmányok rámutattak, hogy az etilén-glikol származékokkal módosított felületek jobban ellenállnak a proteinek nem-specifikus adszorpciójának, vizsgáltam a tiol terminális csoportot tartalmazó polietilén-glikol (5 és 20 kDa) és rövidebb oligoetilén-glikol térkitöltő molekulák alkalmazhatóságát növényi minták esetén. Az etilén-glikol származékok valóban nagyon kismértékű nem-specifikus adszorpciót mutattak többféle növényi kivonat esetében is, azonban a kevert aptamer/polietilén-glikol monorétegek esetében a hosszabb polietilén-glikol láncok sztérikusan gátolták a specifikus kötődést is. Csak a tetra- és hexaetilén-glikol származékok (HS-TEG, HS-HEG) alkalmazásakor tapasztaltunk megfelelő specifikus kötődést, ami rávilágít az aptamer rétegek optimalizálásának fontosságára. Ennek megfelelően a monoréteg nem tartalmazhat az aptamer szekvencia immobilizálásához használt távtartónál hosszabb kitöltő molekulákat, mivel azok már sztérikusan gátolják a célmolekula bekötődését. Az aptamer szálak 3' végére tervezett TTTT-(CH₂)₆-SH távtartónak köszönhetően a vírus kapszidfehérje felismeréséért felelős rész kiemelkedik a TEG-SH felületről.

Az optimális specifikus kötőképesség elérése érdekében az aptamer/HS-TEG monoréteg optimalizálását három alapvető immobilizációs paraméter változtatásával végeztem: a két



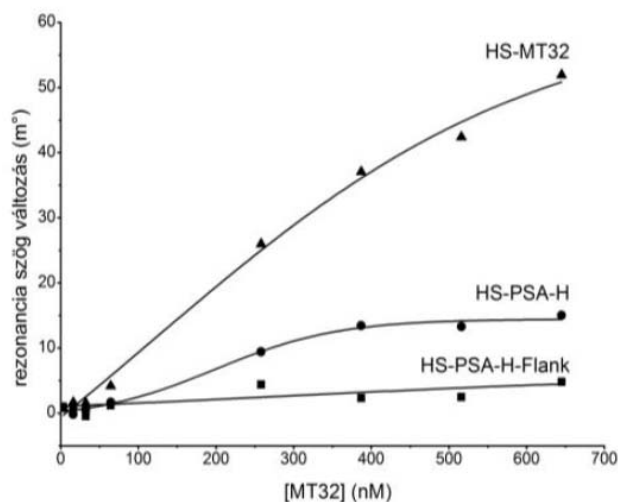
1. Ábra. Mikroceppentett SPR szenzor sematikus ábrája.

tiol koncentrációját és a pufferoldat ionerősségét változtattam. Az eredmények azt mutatták, hogy az optimális aptamer-ligandum kölcsönhatás, azaz a legalacsonyabb nem-specifikus adszorpció és a legmagasabb specifikus válasz érdekében legalább 5 μM aptamer koncentráció szükséges, míg a TEG-SH koncentrációját nagyobb, 100 μM , értéken kell tartani az immobilizáció során.

Az SPR jel koncentráció függését kezdetben tisztított MT32 és PSA-H vírus fehérjékkel vizsgáltam. A primer felismerő régiókat is tartalmazó 81mer PSA-H-Flank aptamerhez egyáltalán nem kötődött az MT32 fehérje, lehetőséget adva a két homológ vírusfehérje megkülönböztetésére. Az aptamerek szelektivitása összhangban volt az SPR tranziensek kinetikai kiértékeléséből származó aptamer-fehérje kölcsönhatások disszociációs állandóival (K_d). MT32 fehérje esetén a HS-MT32 aptamer K_d értéke kb. 1 nagyságrenddel volt kisebb, mint a HS-PSA-H aptamer K_d értéke, azaz $5,5 \times 10^{-8}$ M a $2,9 \times 10^{-7}$ M-rel szemben. A PSA-H fehérje-aptamer disszociációs állandó értéke az alábbiak szerint nőtt: PSA-H aptamer ($8,0 \times 10^{-9}$ M), PSA-H-Flank aptamer ($2,6 \times 10^{-8}$ M) és MT32 aptamer ($8,3 \times 10^{-8}$ M), ami megfelelt a szelektivitási sorrendnek.

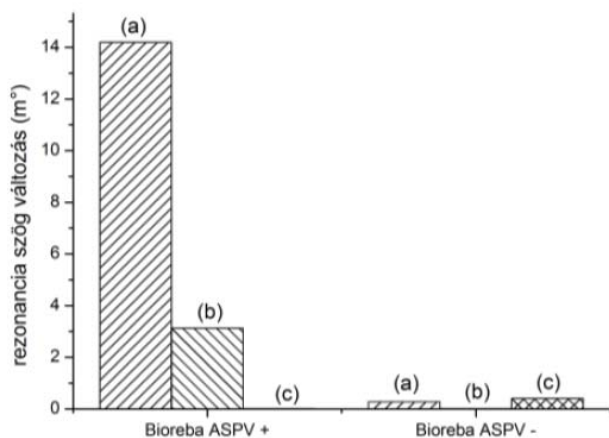
A vírusfehérjék valós növényi mintából történő kimutatásakor számolni kellett az aptamerek jelentős negatív töltéssűrűsége miatt a magasabb pI értékű mátrix fehérjék nem-specifikus adszorpciójával. A TEG-SH felületek nem mutattak szignifikáns nem-specifikus adszorpciót a vizsgált mintákkal, azonban az aptamereket is tartalmazó kevert monorétegek esetén ez jelentős mértékű volt (10-35 m^2). Bár az azonos sarzsából származó növényi kivonatok esetén a nem-specifikus adszorpció gyakorlatilag megegyezett, jelentősen eltért a különböző növényekből készített növényi kivonatok, illetve az azonos növényből készített, de különböző sarzsok esetén. Véletlenszerű bázissorrendű, de az aptamerekkel megegyező hosszúságú és felületi

borítottaságú DNS százból kialakított referencia felületet alkalmazva vizsgáltam a felületre immobilizált aptamerek és MT32 vírus kapszidfehérjével adalékolt alma levél kivonat közötti kölcsönhatást. Az SPR mérésekkel kapott adatok jó egyezést mutattak a pufferoldatban végzett mérésekkel. A hosszabb PSA-H-Flank és a rövidebb PSA-H aptamerek válasza kisebb volt, míg az MT32 aptamer a növekvő MT32 koncentrációval közel lineárisan növekvő rezonancia szög eltolódást mutatott (2. Ábra).



2. Ábra. MT32 kalibrációs görbék alma levél kivonatból, három különböző aptamerrel. A görbék korrekciója a referencia DNS felületen mért rezonancia szög eltolódások kivonásával történt. A mérési adatokat a specifikus kötődés elsődrendű kinetikáját leíró hiperbolikus egyenlettel illesztettem.

A vírus kapszidfehérjék növényi kivonatból történő meghatározására alkalmazott módszert ASPV pozitív növényi kivonatokon teszteltem (3. Ábra).

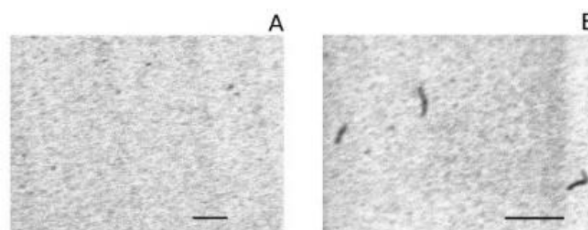


3. Ábra. 500 µg/mL összes protein koncentrációjú, ASPV fertőzött növényi kivonat válaszele: (a) MT32, (b) HS-PSA-H, (c) HS-PSA-H-Flank aptamerek.

Az eredmények szerint a HS-PSA-H és HS-MT32 aptamerek alkalmazásával, jelölésmentes detektálással megkülönböztethető a pozitív és negatív kontroll minta. Mivel a HS-PSA-H-Flank aptamer egyáltalán nem adott válaszelet, és a legnagyobb rezonancia szög eltolódást az MT32 aptamerrel mértem, feltételezhető, hogy a növényi

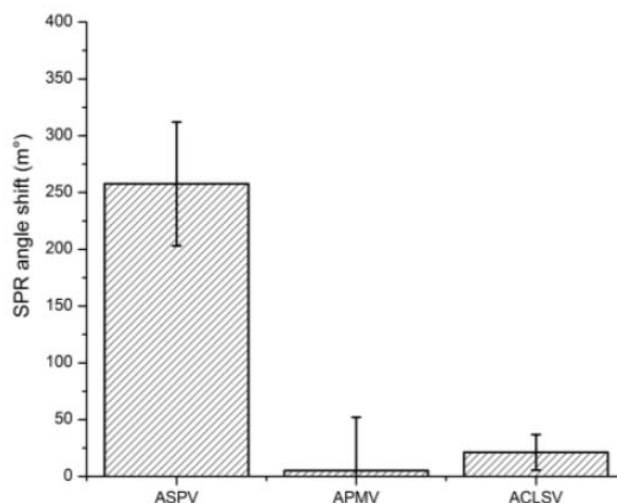
kivonat csak MT32 proteint tartalmazott, ami a kontroll gyártói specifikációjának megfelelően az ASPV jelenlétére utal.

Az SPR méréseket pásztázó elektronmikroszkópiás (SEM – Scanning Electron Microscopy) felvételekkel támasztottam alá (4. Ábra). Az aptamerrel módosított szenzorfelületen hosszúságú vírusfragmenseket ($2,2 \times 10^7$ db/cm²) detektáltunk, míg a HS-TEG blokkolt felületen egyáltalán nem tapasztaltunk víruskötődést.



4. Ábra. Tipikus pásztázó elektronmikroszkópiás felvételek: (A) aptamer nélküli referencia felület és (B) HS-MT32 aptamer módosított felület ASPV fertőzött növényi kivonattal történő inkubálást követően. A méretvonalak 500 nm-esek.

Annak ellenőrzésére, hogy az MT32 aptamer különbséget tud-e tenni más vírusok által fertőzött növényi minták között, ASPV-vel, alma mozaik vírussal (apple mosaic *ilarvirus* – APMV) és alma klorotikus levélfoltosság vírussal (apple chlorotic leaf spot *trichovirus* – ACLSV) fertőzött növényi mintákat vizsgáltam HS-MT32 aptamerrel módosított SPR szenzorchipen. Az MT32 aptamer és a HS-T₄₄ referencia oligonukleotidon mért rezonancia szög eltolódások között nem volt szignifikáns eltérés az APMV és az ACLSV vírussal fertőzött minták esetében (5. Ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MT32 aptamer különbséget tud tenni az ASPV és egyéb releváns vírusok között.⁸



5. Ábra. Referencia felülettel korrigált felületi plazmon rezonanciás válaszele ASPV, APMV és ACLSV fertőzött növényi kivonatokra, 100 µg/mL teljes protein koncentrációnál.

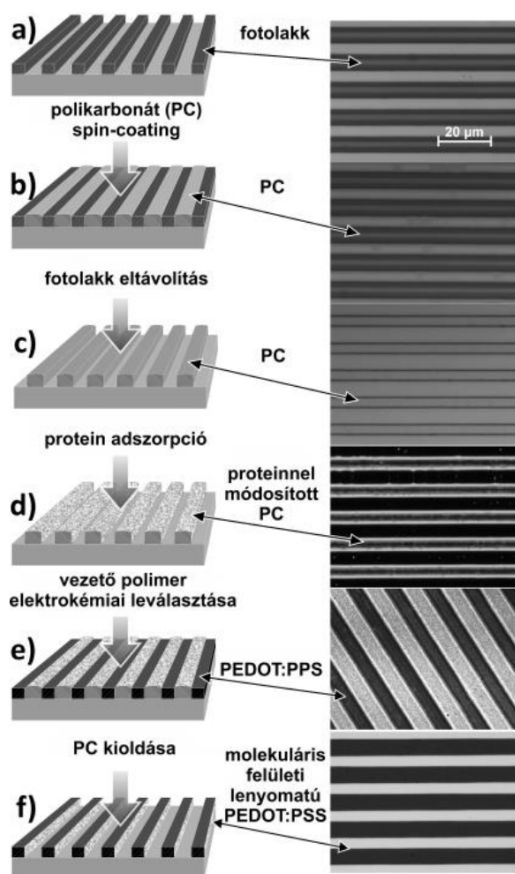
2.2. Nagy jelerősítésű homogén távolság modulált lumineszcens assay (ALPHA) aptamer-fehérje kölcsönhatások jellemzésére

A vírus fehérje - aptamer kölcsönhatások jellemzésére kidolgoztam egy erősített lumineszcenciás távolságmodulált

homogén mérési módszert (ALPHA - Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay). A PSA-H aptamer esetében az ALPHA módszerrel meghatározott K_d érték $5,3 \pm 3,9$ nM, az MT32 aptamer esetében pedig $70,5 \pm 28,0$ nM volt. Ezek az eredmények jó egyezést mutattak az SPR-rel mért adatokkal.⁹

2.3. Fehérjék szelektív, jelölésmentes detektálása mikromintázott, felületi lenyomatot tartalmazó mesterséges receptorokkal

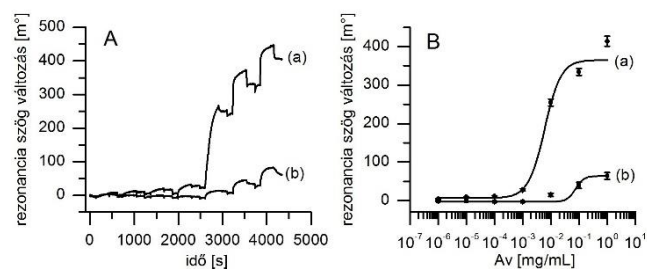
Egy újszerű megközelítést alkalmaztunk annak érdekében¹⁰, hogy az SPR szenzor érzékelési zónájában alakítsunk ki fehérjekötő helyeket a felületi lenyomatképzéssel (SI - Surface Imprinting). A 6. Ábra mutatja a molekuláris lenyomatképzés sématis ábráját, ami fotolitográfias eljárással létrehozott mintázatképzésen alapul, és csak a PEDOT/PSS barázdák függőleges falain, azaz a szenzorchip felületére merőlegesen elhelyezkedő kötőhelyeket hoz létre.



6. Ábra. A molekuláris lenyomatú polimer mikrobarázdák létrehozása során a felületi lenyomatképzés folyamatának sématis ábrája (a-f, bal), és a megfelelő mikrostrukturák optikai mikroszkópiás képei (a-c, e, f, jobb). A (d) ábrán a polikarbonát (PC) mikrobarázdákon a protein adszorpciót fluoreszcensen jelölt proteinnel (avidin-fluoreszcen izotiocianát - Av-FITC) és epifluoreszcens képalkotással jelenítettük meg.

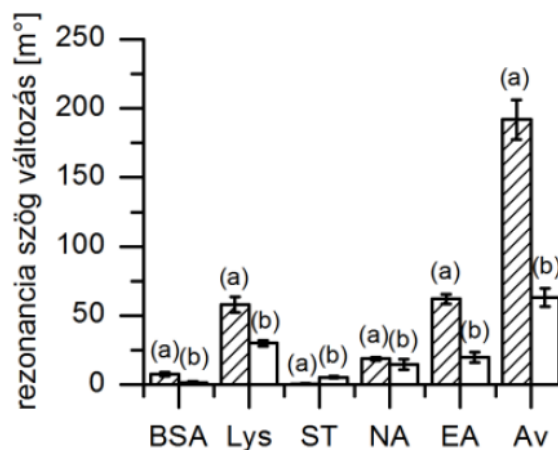
A mikromintázott polimer chippekkel történő SPR mérésekhez a szenzorchipen felületi lenyomatot tartalmazó (SIP) és felületi lenyomatot nem tartalmazó (NIP) strukturákat is kialakítottunk, hogy egyszerre lehessen nyomonkövetni a kétféle felületen a kötődéseket. Az avidin válaszgörbék (7. ábra) egyértelműen bizonyítják a felületi lenyomatképzés hatását a NIP felülethez képest. Az avidin-MIP kölcsönhatás

disszociációs egyensúlyi állandója (125 nM)¹⁰ közel egy nagyságrenddel kisebb volt, mint a NIP felület esetében ($1,4 \mu\text{M}$). Ugyanez a tízszeres faktor jellemezte a telítési koncentrációnak megfelelő jelarányt, ami azt jelenti, hogy a lenyomatképzési faktor az egyik legmagasabb az eddig publikált protein-MIP-ek között. A SIP szelektivitását avidin származékokkal, streptavidinnal (ST), NeutrAvidinnal (NA) és ExtrAvidinnal (EA) vizsgáltam, valamint olyan fehérjékkel, melyek szintén magas izoelektromos ponttal (pI) rendelkeznek, például a lizozimmal (Lys, pI 11,35). Egy jelentősen kisebb pI értékű (4,7), de közel azonos molekulatömegű fehérjét, marha szérumalbumint (BSA - Bovine Serum Albumin) is vizsgáltam.



7. Ábra. (A) avidin-SIP mikromintázott (a) és NIP (b) felületeken mért SPR szenzorgramok egymást követő, növekvő avidin koncentrációk esetén; (B) a kumulatív kalibrációs görbe.

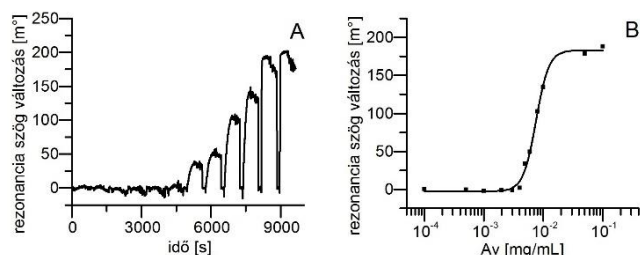
A NIP felületek minden esetben kisebb válaszjelet adtak a vizsgált fehérjék esetén, mint az avidin felületi lenyomatú polimer felületeken (Avidin-SIP). A vártan megfelelően az avidin-SIP felületen a legnagyobb válaszjelet az avidin adta, majd az ExtrAvidin, NeutrAvidin és streptavidin következett a szerkezeti hasonlóság sorrendjében (8. Ábra).



8. Ábra. Avidin-SIP (a) és NIP (b) felületek válaszjelei különböző proteinek 10^{-2} mg/mL koncentrációjú oldata esetén.

1 M-os NaCl oldat alkalmazása lehetővé tette a SIP felületek regenerálását. A regenerált felület válaszjele (9. Ábra) ugyan elhanyagolható alapvonal eltolódást mutat, de ebben az esetben valamivel kisebb a lenyomatképzési faktor. Ez arra utal, hogy a koncentrált NaCl oldat hatással van a SIP kötőhelyeire. A nagy ionerősségű oldattal végzett sikeres regenerálás az avidin és a SIP közötti kölcsönhatás elektrosztatikus jellegére utal, szemben az avidin - NIP kölcsönhatással, amit nem befolyásol az ionerősség.

Valószínűleg a lenyomatképzés során feldúsul a PSS a PEDOT/PSS filmek felületén. Ez a jelenség megmagyarázná



9. Ábra. (A) Mikromintázott avidin-SIP nem-specifikus adszorpcióval korrigált SPR válaszele különböző avidin koncentrációk esetén, az egyes koncentrációk között regenerálva a felületet; (B) kalibrációs görbe.

a SIP felületek nagyobb affinitását a nagyobb pI-vel rendelkező fehérjékhez, valamint lizozim nagyobb adszorpcióját a SIP felületekhez, mint a NIP felületekhez. Az avidin és a SIP közötti kölcsönhatás azonban nem tisztán elektrosztatikus jellegű, amire az utal, hogy az avidin és a semleges töltésű extravidin esetén nagyobb válaszelet kapunk, mint a lizozim estében.

Köszönetnyilvánítás

Ez a közlemény Lautner Gergely PhD disszertációja alapján készült (védés: 2013. január 17.). Köszönet illeti Dr. Mészáros Tamást, a Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetének egyetemi docensét, akinek a csoportja végezte az aptamerek szelektációját. Köszönet az Új Széchenyi Terv TAMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002 és 0001 program, valamint az OTKA (NF69262, K68161), ENIAC CAJAL4EU és MTA Lendület program anyagi támogatásáért.

3. Kísérleti módszerek

3.1. Aptamerrel módosított SPR szenzorchipek előállítása

A növényi vírus fehérjékre (MT32 és PSA-H) szelektált originális aptamereket tiol csoporton keresztül immobilizáltuk a felületi plazmon rezonanciás szenzorchip arany felületéhez. Ennek érdekében az aptamereket a 3' végükön „TTTT-(CH₂)₆-SH” módosítással szintetizáltattuk meg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A képpalkotó felületi plazmon rezonanciás (iSPR) mérésekhez a szenzorchip felületét mikroceppentő robot (Calligrapher Microarrayer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) alkalmazásával mintáztuk a tiol módosított oligonukleotidokkal. Amennyiben nem volt szükség a szenzorchip mintázására, az iSPR-t egy csatornás rendszerként alkalmaztuk és a szenzorchipet az SPR átfolyó cellájában módosítottuk. Az aptamerek immobilizációs körülményeit iSPR mérések alapján optimalizáltuk.

A különböző hosszúságú oligonukleotidok felületi sűrűségét az immobilizált DNS szálak negatív töltését kompenzáló Ru³⁺ mennyiségének mérésével, voltametriásan határoztuk meg.

3.2. Felületi lenyomatú polimer alapú SPR szenzor előállítása

A protein felületi lenyomatú PEDOT/PSS mikromintázatot planáris, módosítatlan arany SPR szenzorchipen

hoztuk létre. Az arany bevonatú üveg hordozón először fotolitográfias technika alkalmazásával mikrobarázdákat hoztunk létre fotolakkból, majd a felületre polikarbonát (PC) áldozati anyagot vittünk fel a fotolakk barázdák közé. A fotolakk eltávolítását követően a visszamaradt PC mikrobarázdákra adszorbeáltattuk a célfehérjét, majd PEDOT/PSS vezető polimert választottunk le a felületre elektrokémiaiag. A PC eltávolítása után a felületen fehérje lenyomatot tartalmazó PEDOT/PSS mikrobarázdák maradnak vissza. A lenyomatképzéshez avidin (Av, 66 kDa, pI = 10,5) fehérjét használtunk és ExtrAvidin (EA, pI = 6,5), streptavidin (ST, 60 kDa, pI = 5,5), NeutrAvidin (NA, 60 kDa, pI = 6,3), lizozim (Lys, 14,3 kDa, pI = 11,35) és BSA (66,4 kDa, pI = 4,7) fehérjékkel vizsgáltuk a felületi lenyomatú polimer szelektivitását.

3.3. Fehérje detektálás felületi plazmon rezonanciával

A szintetikus receptorok és a fehérjék közötti kölcsönhatás mérésére iSPR készülék (IBIS Technologies, Enschede, Hollandia) alkalmaztunk. Ez lehetőséget adott egy vékony arany réteggel bevont üveglemez (szenzorchip) felületén történő törésmutató változás nagy érzékenységu nyomonkövetésére, amely adott esetben arányos a szenzor felületén immobilizált receptorokhoz kötődő molekulák tömegével. Így ez a módszer alkalmas a szenzorchip felületére immobilizált receptorok és a szenzorchip felületére oldatban juttatott molekulák közötti kölcsönhatás valós idejű, jelölésmentes detektálására.

3.4. Fehérje-aptamer kölcsönhatás jellemzése ALPHA-val

Az ALPHAScreen[®] néven elterjedt nagy jelerősítésű homogén távolság modulált lumineszcens mérés technika biológiai kölcsönhatások mérésére alkalmas, rendkívül érzékeny módszer. A mérés technika egy polisztirol donor- és akceptor mikrogyöngy párból áll, melyek a felületükre immobilizált biomolekulák kölcsönhatása következtében kerülnek egymáshoz közel. Nagy intenzitású lézerténnyel megvilágítva a donor gyöngyöt a felületén található fényérzékenyítő származék hatására a környezeti oxigén molekulákból gerjesztett állapotú, szingulett oxigén molekulák jönnek létre. A szingulett oxigén molekulák reagálnak a kb. 200 nm térségben található akceptor gyöngyben lévő fluoroforokkal, melynek hatására kemilumineszcencia lép fel.

Hivatkozások

1. Tuerk, C., Gold, L. *Science*. **1990**, 249(4968), 505-10.
2. Ellington, A. D., Szostak, J. W. *Nature*. **1990**, 346(6287), 818-22.
3. Lee, J. F., Hesselberth, J. R., Meyers, L. A., Ellington, A. D. *Nucleic Acids Research*. **2004**, 32(suppl 1):D95-D100.
4. Glad, M., Norrlöw, O., Sellergren, B., et al. *Journal of Chromatography A*. **1985**, 347(0):11-23.
5. Kryscio, D. R., Peppas, N. A. *Acta Biomaterialia*. **2012**, 8(2): 461-73.
6. Lautner, G., Balogh, Z., Bardóczy, V., Mészáros, T., Gyurcsányi, R. E. *Analyst*. **2010**, 135, 918-926.
7. Hermann, T., Patel, D. J. *Science*. **2000**, 287(5454):820-5.
8. Balogh, Z., Lautner, G., Bardóczy, V., Komorowska, B., Gyurcsányi, R. E., Mészáros, T. *Faseb Journal*. **2010**, 24(11) 4187-4195.

9. Lautner, G., Balogh, Z., Gyurkovics, A., Gyurcsányi, R. E., Mészáros, T. *Analyst* **2012**, *137*, 3929-3931
10. Lautner, G., Kae, J., Reut, J., Opik, A., Rappich, J., Syritski, V., Gyurcsányi, R. E. *Advanced Functional Materials*. **2011** *21*, 591-597.

Development and Application of Selective Synthetic Receptors for Protein Detection

My doctoral research focused on the development and application of robust synthetic receptors designed explicitly for analytical purposes. Two, conceptually different kind of synthetic receptors were developed and evaluated for the selective detection of protein targets: DNA aptamers and molecularly imprinted polymers.

Aptamers are 40-80mer single stranded oligonucleotides that selectively bind to their cognate target molecules upon forming specific 3D structures. Although nucleic acid – protein interactions are well known in nature, the sequences of nucleic acid aptamers for a given target compound are determined by a synthetic, *in-vitro* procedure referred to as SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).^{1,2} Since the first publication of the SELEX procedure in 1990, a large number of aptamers have been selected for an impressive range of target molecules.³ However, still most of analytically aimed studies are performed in „ideal conditions” on a relatively limited number of well characterized model aptamers, which were not intended originally for analytical application. This implies that in the majority of the reports the analytical method development uses aptamers that have not been optimized for the analytical task and consequently, analytical applications that start from the selection of aptamers custom tailored for the intended analytical task are scarce. However, the aptamer selection would gain significantly, if through counter-selection the sequences, that bind notorious interferents from the sample, are discarded from the oligonucleotide library.

Therefore, one of the main goals of my research was to develop aptamer-based label-free sensors by covering the whole line of research from aptamer selection to their application in complex matrices. In addition, we also aimed at developing methodologies for high throughput evaluation of aptamer-protein interactions. As the fast generation of highly discriminating receptors makes aptamers one of the most prospective candidates for the detection of various virus strains and their mutants, we attempted for the first time, the development of an aptamer-based assay against the coat proteins (MT32 and PSA-H) of a plant virus, Apple Stem Pitting Virus (ASPV). The label-free detection of ASPV was ensured by developing surface plasmon resonance (SPR) sensor chips based on original aptamer sequences, which also allowed the real time kinetic analysis of aptamer-target interactions.^{6,8} SPR imaging was used both as a fast means to optimize a mixed HS-aptamer/HS-TEG self-assembled monolayer for optimal binding and for analyzing plant virus contamination in plant extracts. We studied in detail the effect of various parameters, i.e., aptamer length, spacer length, surface density, co-immobilized thiol derivatives, on the specific and non-specific binding of the relevant target proteins and viruses in various conditions. This enabled ultimately the development of a self-referencing method based on multiplexed aptamer based sensorchips for specific recognition of ASPV virus in real plant extract samples. The selected aptamer were even able to discriminate between the two virus coat proteins PSA-H and MT32 with amino acid sequences identical in 81%. The specificity of MT32 aptamer was confirmed by testing crude plant extracts infected by apple mosaic *ilarvirus* or apple chlorotic leaf spot *trichovirus* that are widespread apple viruses often coinfecting with ASPV.

During our experiments we realized that a major bottleneck of the aptamer selection process is that selected oligonucleotides have to be evaluated individually in terms of their binding properties, e.g., by determining the dissociation constant (K_d) of aptamer–target molecule complexes, to designate the most auspicious aptamers. However, as typically a great number of sequences are selected this becomes an arduous task. Therefore, we introduced a microtiter plate based Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay (ALPHA) to assess the K_d value of aptamer–protein complexes demonstrated through the study of apple stem pitting virus coat protein-specific aptamers. The obtained K_d values for PSA-H and MT32 aptamers were 5.3 ± 3.9 nM and 70.5 ± 28.0 nM, respectively, in very close agreement with the values determined by SPR: 8 nM (PSA-H aptamer) and 83 nM (MT32 aptamer).⁹ Thus the ALPHA method can be used as a simple, cost-effective method for screening aptamer–target protein interactions during aptamer selection.

The second part of my research focused on the development of molecularly imprinted polymers for protein recognition. Molecularly imprinted polymers (MIPs) are selective, synthetic sorbents prepared from a mixture of functional monomers in the presence of a target molecule. During polymerization, the target molecule acts as a template inducing binding sites in the polymer matrix, which are capable of selectively recognizing (rebinding) the target molecule. Although the universal concept of molecular imprinting proved to be very successful for small molecule imprinting, its application for biomacromolecules is still a major challenge.^{4,5} It has been reported that despite of the ubiquitous importance of macromolecular recognition in bioanalysis only ca. 2 % of the reported MIPs involve macromolecular targets. One reason for this is that the bulk synthesis method, with excellent results in generating MIPs for recognition of low-molecular-weight compounds, is hardly applicable to macromolecules due to their hindered mobility in the highly reticulated polymeric networks. Thus, in the worst case the macromolecules become entrapped in the polymeric material with both their removal and rebinding prohibited. Therefore, the essential prerequisite of generating macromolecular imprints should be clearly to create accessible binding sites amenable for free exchange of the target between the MIP and the sample phase.

We have developed a novel method for the synthesis of surface imprinted polymers (SIP) compatible with conventional photolithographic technology directly onto the surface of surface plasmon resonance (SPR) sensorchips. Apart from the overwhelming majority of the MIPs prepared by chemical synthesis, we used electrochemical oxidation to form surface-imprinted microbands of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) doped with poly(styrenesulfonate) (PSS) enabling the label-free real-time detection of the model protein (avidin) – MIP interactions.¹⁰ Despite the structural complexity of the surface imprinted PEDOT/PSS micropatterns, their interaction with proteins could be determined in a straightforward manner with SPR imaging at sensitivities that, in this particular case, outperformed those of fluorescence imaging.

The novel surface imprinted microstructures bound avidin, the template protein, with dissociation constants in the submicromolar range (125 nM). Imprinting factors of approximately 10 were obtained, which places the protein-imprinted PEDOT/PSS among the best SIPs reported so far. The avidin imprinted PEDOT/PSS microstructures were shown to discriminate even between close functional Av homologues, i.e., neutravidin, streptavidin and extravidin. The marked ionic strength dependence of the Av binding to the SIP that we found as well as the lesser selectivity towards lysozyme, a protein with (pI=11.35) suggested a major electrostatic contribution to the binding interactions, which, however, is not solely responsible for the selective recognition of avidin.