

Növényi vírus detektálása aptamerek alkalmazásával

Doktori tézisek

Balogh Zsófia

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola



Témavezető: **Dr. Mészáros Tamás**

Hivatalos bírálók: Dr. Berencsi György tudományos tanácsadó, kandidátus,
Dr. Ambrus Attila tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Machovich Raymund

tagjai: Dr. Jemnitz Katalin, Dr. Geiszt Miklós

Budapest

2011

Bevezetés

Az aptamerek jellemzése

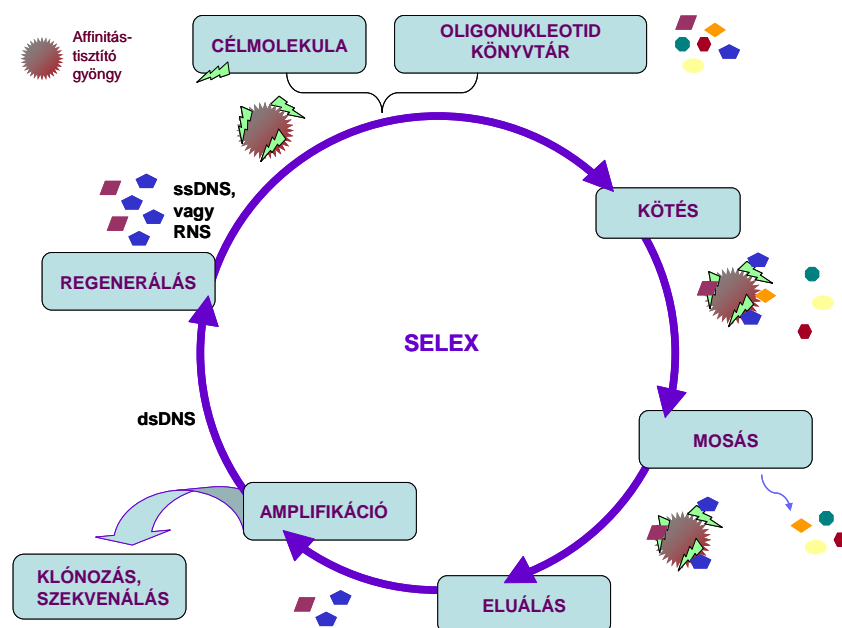
A diagnosztikai eljárások döntő része egy adott fehérje specifikus detektálásán, illetve annak mennyiségi meghatározásán alapul. Az ilyen irányú vizsgálatok történhetnek enzimaktivitás méréssel -amennyiben a fehérje karakterisztikus enzimaktivitással rendelkezik- vagy közvetlenül a fehérje mennyiségének meghatározásával. Az utóbbi eljárások alapját általában a fehérjéhez nagy specifitással és affinitással kötődő receptor molekulák adják. Napjaink legelterjedtebben alkalmazott receptor molekulái az ellenanyagok, azonban mintegy 20 éve megjelentek a fehérjéket, kismolekulákat szelektíven felismerő oligonukleotidok, az ún. aptamerek. Az elmúlt időszakban végzett vizsgálatok igazolták, hogy az aptamerek receptor molekulaként számos esetben kiválthatják, illetve felülmúlhatják az ellenanyagokat.

Az *in vitro* szelekciónak és előállításnak köszönhetően az aptamerek ígéretes szintetikus receptor molekulák. Előállításuk nem igényel élő állatot, sejtvonalat, így elméletileg bármilyen toxikus vagy alacsony immunogenitású célmolekulára szelektálható aptamer. Ráadásul a szelekció körülményei viszonylag szabadon választhatóak, úgy alakíthatóak, hogy optimálisak legyenek a későbbi *in vitro* diagnosztikai meghatározásokhoz, melyek körülményei sok esetben távol állnak a fiziológiás viszonyoktól. A szelektált aptamerek nukleotid szekvenciája pontosan ismert, így kémiai szintézissel bármikor nagy tisztaságban reprodukálhatóak. Az aptamerek kémiai szerkezete egyszerűbb, mérete pedig kisebb az antitestekénél, ennek ellenére affinitásuk és specifitásuk is igen nagy lehet, a disszociációs konstansuk az antitestekhez hasonlóan μM - pM tartományba esik. A foszfodiészter kötéseknek, és a denaturációt követő regenerálhatóságuknak köszönhetően hosszú távon stabilabbak, a hőmérsékletváltozásra kevésbé érzékenyek, mint az antitestek. Nukleinsavak lévén könnyen, irányíthatóan módosíthatóak különböző funkciós csoportokkal vagy jelölő molekulákkal. Az aptamerek további előnyös tulajdonságai, hogy szemben az ellenanyagokkal a szervezetbe juttatva nem váltanak ki immunválaszt, ezért terápiás célokra is alkalmazhatóak, egyszerűen előállítható oligonukleotid ellenszerükkel (komplementer szekvenciájukkal) pedig terápiás hatásuk fel is függeszthető.

SELEX –az aptamer szelekció folyamata

A SELEX egy olyan iteratív módszer, amelyben az in vitro szelekciós és amplifikációs lépések váltják egymást. A tipikus SELEX módszer kiindulási alapja egy kémiai úton szintetizált random oligonukleotid könyvtár, amely általában 10^{13} - 10^{15} -féle különböző oligonukleotidból áll és felépítését tekintve egy 20-80 nukleotid hosszúságú random szakaszt fog közre két, 18-21 nukleotid hosszúságú primer kötő régió, amelyek segítségével elvégezhetőek az amplifikációs lépések. A könyvtárból a darwini szelekcióhoz hasonlóan, szelekciós nyomás hatására viszonylag kisszámú, optimalizált szerkezeti elemekkel rendelkező szekvenciához lehet jutni. Az oligonukleotid könyvtárból a nagy affinitással rendelkező szekvenciákat a szelekció során alkalmazott célmolekulához kötik, elválasztják őket a nem kötődött szekvenciáktól, majd amplifikálják. Az így nyert, célmolekula-kötő képességét tekintve feldúsított oligonukleotid könyvtárat használják a következő SELEX ciklusban. Az iteratív módszer eredményeként az eredeti random oligonukleotid könyvtár viszonylag kevés, a célmolekulához nagy affinitással és specifitással kapcsolódó szekvenciára redukálódik (**1. ábra**). Egy sikeres aptamer szelekció általában 5-15 ciklusból áll, az utolsó SELEX ciklusban a kötőképesség alapján feldúsított oligonukleotidok, azaz aptamerek bázissorrendjét szekvenálással határozzák meg, és a szekvenciák összehasonlító analízise alapján kiválasztják a leggyakrabban előforduló vagy hasonló szerkezeti elemmel rendelkező szekvenciákat. A kiválasztott szekvenciákat ezután kötőképesség, affinitás és specifikusság szempontjából jellemzik. A SELEX módszer alkalmazásával aminosav enantiomerekre szelektív aptamereket izoláltak, és sok aptamer esetében a monoklonális antitestekéhez hasonló affinitást értek el ($K_d=10^{-11}$ - 10^{-8} M).

1990-óta sokféle célmolekulára szelektáltak aptamereket, többek között szervetlen anyagokra, szerves kismolekulákra, peptidekre, fehérjékre, szénhidrátokra és antibiotikumokra. A SELEX eljárás egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy egy meghatározott célmolekulán túl célmolekulák keverékére, vagy akár teljes sejtekre, szövetekre, baktériumokra és vírusokra is alkalmazható.



1. ábra: A SELEX folyamatábrája.

Az aptamer-célmolekula kölcsönhatás jellemzése

Az aptamer-célmolekula kötődést a szerkezet pontos illeszkedése, hidrogén hidak kialakulása, aromás gyűrűk közötti, elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatások, illetve ezek kombinációja segíti elő. Az aptamerek többsége a célmolekula kötésekor adaptív konformáció változással nyeri el stabil másodlagos szerkezetét, szabad állapotban pedig rendezetlen szerkezetű. Kis molekulákkal történő kölcsönhatások esetében a meghatározott térbeli szerkezetbe hajtogatódás egy zsebszerű kötőhelyet alakít ki, ily módon az aptamer a célmolekulát teljesen beboríthatja. Ezzel szemben a nagyobb molekulákon, mint például a fehérjéken, az aptamer illeszkedik a célmolekulához. Egyes nukleotidok közvetlenül a célmolekulához kötődnek, míg más nukleotidok a kötő nukleotidok pontos térbeli elhelyezkedésében játszanak fontos szerepet.

A leggyakoribb szerkezeti elemek a hajtű, a pseudo-csomó vagy az úgynevezett quadruplexek lehetnek. A nagy guanozin tartalmú szekvenciákra jellemző négyszálú struktúrákban, a quadruplexekben négy guanin egy G-kvartettet alkot a Hoogsteen féle bázispárosodás alapján. Egy quadruplexben általában két vagy három G-kvartett fordul elő, és a szerkezetet koordinatívan kötött kálium- vagy nátriumion tovább stabilizálhatja a guaninok karbonil csoportjainak a kvartett középpontja felé koordinálásával. A főleg DNS aptamerekben előforduló quadruplex struktúra sokkal stabilabb az egyszerűbb szerkezeti

elemeknél. Valószínűsítik, hogy a G-quadruplex az aptamer stabil szerkezeti alapját szolgáltatja, és az összekötő hurkokban található nukleotidok felelősek a célmolekula kötéséért.

Az Apple Stem Pitting Virus (ASPV) jellemzése

A *Foveavirusok* nemzetségébe, a Flexiviridae családba tartozó ASPV az alma és körte ültetvényeket károsítja. A tünetek közé tartoznak a szárrészek és törzs fás szövetének gödrösödése, a levelek pöndörödése, a növény állapotának általános romlása. A vírus világszerte elterjedt és kereskedelmi kultúrákat is gyakran megfertőz, amely azonban látens, tünetmentes maradhat. A különböző ASPV izolátumok vizsgálata alapján több szekvencia variáns létezik. A vírus legfőbb fehérje komponense a 48 kDa molekulatömegű burokfehérje, amely 64,8-89,6% közötti homológiát mutat a különböző törzsek között.

Az érzékeny indikátor növényekre történő átoltás mellett az ASPV detektálására a nukleinsav alapú meghatározási módszerek terjedtek el, mint az RT-PCR és a fluoreszcens hibridizációs próbán alapuló meghatározás, amelyek érzékenyek, azonban nagy mintaszám vizsgálatára a körülményes minta előkészítés és nagy hibalehetőség következtében nem megfelelőek. A közelmúltban előállított monoklonális antitestekkel kifejlesztett DAS-ELISA módszer alkalmas a fertőzött növényi kivonatok detektálására, és lehetővé teszi nagyszámú minták elemzését, de gyakran félrevezető eredményeket ad.

Célkitűzések

A molekuláris diagnosztikai eszközök egyre növekvő jelentőséggel bírnak a vírusdetektálásban, a gyakorlatban azonban továbbra is az antitest alapú, enzim-kapcsolt immunológiai meghatározásokat részesítik előnyben. Ennek megfelelően az ASP vírus kimutatására is létrehoztak monoklonális ellenanyagot, és alkalmazásával kifejlesztettek egy ELISA készletet. A létrehozott eljárás azonban nem alkalmas a különböző ASPV izolátumokból származó burokfehérjék megkülönböztetésére, kimutatási határa alacsony és gyakran félrevezető eredményeket ad. Az elmúlt évtizedben az aptamerekről bebizonyosodott, hogy számos alkalmazási területen megfelelő alternatívái lehetnek az antitesteknek. A kontraszelekciós lépések beiktatásával, megfelelően szelektált aptamerek nagy specifitásuk

révén elméletileg képesek rá, hogy felismerjék az egyes ASPV izolátumokra jellemző burokfehérjéket, így alkalmasak lehetnek vírusdiagnosztikai módszerek fejlesztésére.

A fent említett szempontoknak megfelelően foglalom össze a munkánk során kitűzött célokat:

- Az aptamerek szelekciójához szükséges két ASPV izolátumra jellemző burokfehérje (MT32 és PSA-H) előállítására bakteriális fehérjetúltermelő rendszerrel, majd a rekombináns burokfehérjék tisztítása affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával.
- Olyan a burokfehérjére specifikus aptamerek szelekciója, amelyek képesek a két nagyfokú homológiát mutató fehérje megkülönböztetésére, így alkalmasak lehetnek a genotípusok meghatározására.
- A szelektált aptamerek kötőképességének jellemzése.
- Az aptamerek gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata és felhasználása vírusdiagnosztikai módszerekben antitest helyettesítő molekulákként.

Módszerek

ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszerben

A pDEST17::MT32 és pDEST17::PSA-H vektorokkal transzformált BL21(DE3)pLysS bakteriális sejteket 500-500 ml folyékony LB táptalajba oltottuk, és addig növesztettük, míg a szuszpenziók optikai denzitása 600 nm-en elérte a 0,5-ös értéket. Ezt követően a bakteriális sejtek rekombináns fehérjetermelését 400 μ M végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltuk 5 órán át, majd a szuszpenziót lecentrifugáltuk. A bakteriális csapadékot feltáró pufferben (10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,1% Triton X-100, Proteáz Inhibitor Kóktél, pH 7,5) felszuszpendáltuk, majd szonikálással feltártuk. A feltárt szuszpenziót újra centrifugáltuk, majd a felülúszóból nikkellion-aktivált affinitás kromatográfiás gyantával tisztítottuk a 6 \times His-jelölt rekombináns burokfehérjéket. A tisztítás lépéseit SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük.

Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója

A 10^{14} -féle DNS szekvenciából álló könyvtárban található szekvenciák két 18 nukleotid hosszúságú primer kötő részt és egy 40 random nukleotidból álló szakaszt tartalmaznak. A szelekciót SELEX módszerrel, 15 ciklus elvégzésével kiviteleztük. A szelekcióhoz körülbelül

300 pmol PSAH, vagy MT32 fehérjét tartalmazó Ni-NTA HisBind agaróz affinitás kromatográfiás gyantával inkubáltuk a DNS könyvtárat tartalmazó oldatot. Az inkubálás leteltével a gyengén vagy nem kötődött DNS szekvenciákat mosással távolítottuk el. A fehérjét és az ahhoz kötődött aptamereket 500 mM imidazol tartalmazó oldattal eluáltuk a gyantáról, és templátként a PCR elegyhez adtuk, majd módosítatlan forward és biotinilált reverz primerrel amplifikáltuk. A keletkezett PCR terméket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, majd Reacti-Bind sztreptavidin-módosított, nagy kötőképességű mikrotiter tálca 1-1 cellájában inkubáltuk. A biotint nem tartalmazó DNS szálakat ezután 100 mM-os NaOH oldattal eluáltuk, és az oldat pH-ját visszaállítottuk 7,5-re. Az így előállított elegyet használtuk fel a SELEX következő ciklusához. A szelekció további ciklusait azonos körülmények között, csökkenő fehérjemennyiséggel végeztük. A 2-9. ciklusban 150 pmol-t, a 10-15. ciklusban 100 pmol proteint használtunk fel a szelekcióhoz, hogy növeljük az erősebben kötődő szekvenciák arányát. A szelektált aptamerek specifikusságának növelésére a 3., 6., 9., ciklus után kontraszelekciós lépéseket is beiktattunk a SELEX folyamatába. A legutolsó ciklusban a PCR-hez biotin-mentes reverz primert alkalmaztunk, és a keletkezett terméket T/A klónozással p-GEM-T-easy vektorba inszertáltunk. A ligálási elegyet DH5 α kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk. A felnőtt telepekből 20-20 darabot kolónia PCR-rel ellenőriztünk, és a pozitív kolóniák nukleinsav szekvenciáját meghatároztuk. Az aptamer szekvenciákat Clone Manager program Align alkalmazásával összehasonlítottuk.

Western-blot

20-20 μ g fehérje tartalmú indukált bakteriális kivonatot SDS-PAGE segítségével elválasztottunk, majd félszáraz-blot alkalmazásával nitrocellulóz membránra transzferáltunk. A membránt először Protein-Free blokkoló pufferben, majd 50 pmol biotinilált aptamert tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Ezután háromszor mostuk, majd 1:2000 hígított Extravidinnel konjugált HRP oldattal inkubáltuk, és újra mostuk háromszor. A mosási lépések után ECL keverékkel inkubáltuk a membránt, és a keletkező kemilumineszcens jelet filmen detektáltuk.

Dot-Blot

Két kísérletet végeztünk, az egyikben a kereskedelmi forgalomban beszerezhető anti-ASPV IgG monoklonális antitest vírusfelismerő képességét vetettük össze a biotinilált

aptamerekével. Ekkor 15 µg fehérjetartalmú ASPV pozitív és negatív növényi kivonatot cseppentettünk nitrocellulóz membránokra egy-egy pontba. A pontok száradása után Protein-Free blokkoló pufferben inkubáltuk a membránokat, majd 1:1000 hígítású anti-ASPV IgG oldattal vagy 25 pmol/ml biotinilált MT32 vagy biotinilált PSAH aptamert tartalmazó oldattal inkubáltuk a membránokat. Az anti-ASPV IgG-t 1:5000 hígítású toma peroxidáz (HRP)-konjugált anti-egér antitesttel kapcsoltuk, a biotinilált aptamereket pedig 1:2000 hígított Extravidinnel konjugált HRP oldattal. A második dot-blot kísérletben 100 ng totál fehérjetartalmú, kereskedelmi forgalomban kapható ASPV, ACLSV és ApMV pozitív növényi kivonatot cseppentettünk nitrocellulóz membránra, és a membránokat 25 pmol/ml biotinilált MT32 vagy PSAH aptamert tartalmazó oldattal inkubáltuk.

ELISA és ELONA

Kereskedelmi forgalomban beszerezhető ASPV detektáló készlet segítségével a gyártó protokollja szerint elvégeztük az ELISA kísérletet. Az anti-ASPV IgG monoklonális antitesttel bevont mikrotiter tálcáit ASPV pozitív és negatív, illetve kétszer, négyszer, hatszor hígított ASPV pozitív kontroll növényi kivonattal inkubáltuk. A mikrotiter tálcát mosási lépés után, 1: 1000 hígítású alkalikus foszfatáz (AP)-konjugált anti-ASPV IgG-vel inkubáltuk. Újabb mosási lépést követően hozzáadtuk a pNPP szubsztrát oldatot, és 30 °C-on, 405 nm-en fotométerrel meghatároztuk az abszorbanciákat.

Az ELISA kísérlettel párhuzamosan elvégeztünk egy ELONA kísérletet is. A kísérlet lépései megegyeztek, kivéve, hogy a konjugált antitest helyett 100 pmol biotinilált PSAH aptamert tartalmazó oldattal inkubáltuk a mikrotiter tálcát, majd a mosási lépést követően 1:5000 hígítású AP-konjugált ExtrAvidinnel kapcsoltuk a mikrotiter tálcára kötődött aptamereket. Az ezt követő mosási lépések és a jel detektálása is megegyezett az ELISA-nál leírtakkal és egy időben zajlott, hogy az eredmények összevethetőek legyenek.

ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel

Az általunk alkalmazott maleimid-aktivált mikrotiter tálcáit kovalensen módosítottuk kötő pufferben (PBS, 10 mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH 7,2) hígított 50 pmol tiolmódosított MT32 aptamerrel. Mosási lépést követően a mikrotiter tálcát Protein-Free blokkoló pufferrel inkubáltuk. Az így előkészített cellákba bakteriális totál kivonatot és ugyanezt a kivonatot különböző mennyiségű tisztított PSAH fehérjével kiegészítve adtuk. Az

inkubálás után a mikrotiter tálcát mosó pufferrel mostuk (PBS, 1mM EDTA, 0,2% Tween-20, pH 7,2), majd 50 pmol biotinizált PSAH aptamert tartalmazó mosó pufferrel inkubáltuk. Három mosási lépést követően 1:5000 hígítású AP-konjugált ExtrAvidinnel inkubáltuk a mikrotiter tálcát, majd további mosási lépéseket követően pNPP szubsztrát oldattal inkubáltuk a cellákat, és a színváltozást abszorbancia mérésével detektáltuk 405 nm-en.

ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel

A vírus partikulumok detektálására a növényi kivonatokból származó háttér miatt más kapcsolási módszerre volt szükség. NucleoLink plate mikrotiter tálca aktivált felületére 10 pmol/cella 5' foszfátcsoport és TTTTT összekötő módosítással szintetizált MT32 aptamert kovalensen kapcsoltunk a gyártó protokollja szerint. Ezután 0,1 µg/ml dIdC-t tartalmazó 5%-os BSA oldattal blokkoltuk a mikrotiter tálcát. A blokkolás után a cellákba 10 µg totál fehérje tartalmú vírusmentes és ASPV, ACLSV vagy ApMV-fertőzött vírusos növényi kivonatokot pipettáztunk. Az inkubálás után háromszor mostuk a mikrotiter tálcát, majd 10 pmol/cella biotinizált MT32 aptamert tartalmazó oldattal inkubáltuk a cellákat. A nem kötődött aptamerek eltávolítására három mosási lépést alkalmaztunk, majd 1:5000 hígítású AP-konjugált ExtrAvidin oldatot adtunk a mikrotiter tálca celláiba. A detektálás a fentebb leírtaknak megfelelően történt, abszorbancia mérésével.

Eredmények

A szelekció során alkalmazott burokfehérjék bemutatása és összehasonlító analízise

Az ASPV vírus felületét beborító burokfehérje több ezer kópiában van jelen egy vírus részecskén, így több aptamer kötődését teszi lehetővé egy részecskéhez, és a célmolekula a vírus natív állapotában is hozzáférhető. Mindezek következtében a vírus burokfehérjék detektálása a növényi vírusfertőzések kimutatására alkalmas módszer.

Két ASPV-izolátum burokfehérjéinek, az MT32 és PSA-H aminosav szekvenciáit összehasonlító analízisnek vetettük alá, amely kimutatta, hogy a két fehérje közel 81%-ban azonos, a legkarakteresebb különbség, hogy a PSA-H fehérje körülbelül 20 aminosavval többet tartalmaz, mint az MT32 (2. ábra).

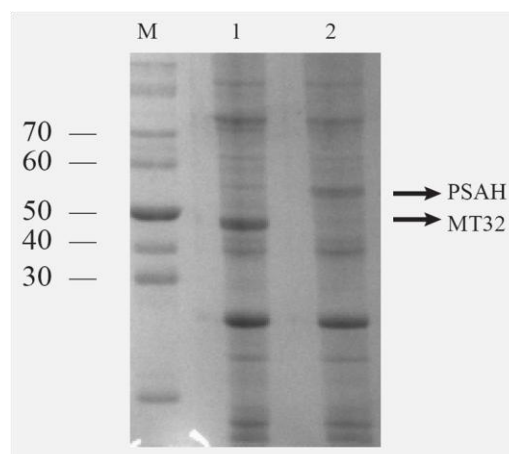
MT32,	1	HTSNGSQPCSSAPHVSEVEEAAA-----VSAPNPSVVNSAPVSAPIV
PSA-H,	1	HTSNGSQPCASTPHVSAEEPAAAASVPNSTPHVSAEGPAAAASAPNSSVVSSAPASAPTA
MT32,	43	SEPVISQVQSVAPIVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQEEAARRGYEEGSRPNRILPNTGAY
PSA-H,	61	SEPVISQVQSLAPIVSGFDPNLHGRLTNEQMRQAQNEAAMQGYEEGSRPNRILPSSITAH
MT32,	103	NNYASMNSNPFETGTAYSEAPRMNMGPPYISSGYEQTSEPSAQRIFPVQHGVSPPSHDAN
PSA-H,	121	NDYASMNSNPFETGTAYGGAPRVSFSGSYTFPGSGSASEPNSQRIFPQHGVSNSAHASD
MT32,	163	LVSQVTVGGNSGSPFTLGNRAPRNATSNIGGRRRLDSMSLENIRYEPQAGVVASNQKI
PSA-H,	181	LVPHCATSGGNTGTPFTLGNRAPRNATANTGGRRRLDSVGLKNIRYEPQAGVVASNQKI
MT32,	223	RAIGVALIGHGIPHEQLTEGVVYRARCADVGSADKSTVLGTFPGSDITLVEEVGTRVQQT
PSA-H,	241	RAVGVALIGHGIPHEQLTEGVVYLARHCADVGSADSEALLGTFPGSDITLVEEVGTRVQQT
MT32,	283	EGCTLRQYCAFYAKRVWNLHLQTSPPANVVGKEFKFETRYAADFPPGVESTASLEPAD
PSA-H,	301	EGCTLRQYCAFYAKRVWNLHLQTSPPANVVGKEFKFETRYAADFPPGVESTASLEPAD
MT32,	343	GLIRLPTQAERVANATSKETIQHYRIRSMEGTQAVNFGVTTGGKIGPKPVLISIRK
PSA-H,	361	GLIRLPTQAERVANATSKETIQHYRIRSMEGTQAVNFGVTTGGKIGPKPVLISIRK

2. ábra: Az ASPV-izolatúmok (MT32és PSA-H) burokfehérjéinek összehasonlító analízise az aminosav szekvenciák feltüntetésével. A kiemelés az azonos aminosavakat jelöli a szekvenciákban.

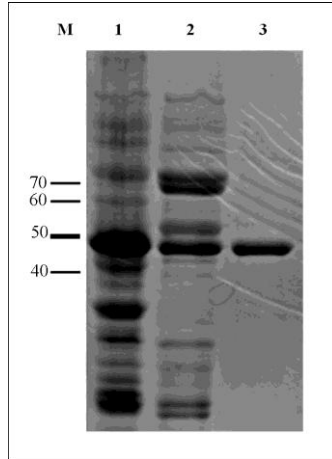
ASPV burokfehérjék túltermelése és tisztítása bakteriális expressziós rendszer alkalmazásával

Az általunk alkalmazott aptamer szelekciós eljáráshoz nagy tisztaságú, gyantán immobilizált célfehérjére volt szükség, amit bakteriális fehérjetúltermelő rendszerrel biztosítottunk.

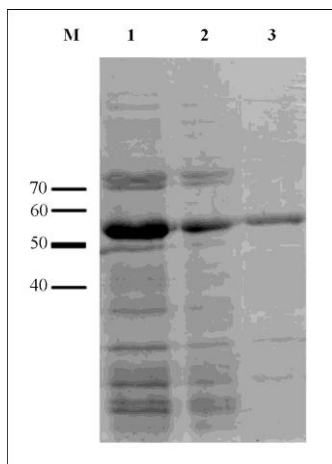
A megfelelő IPTG koncentráció, indukciós hőmérséklet és időtartam meghatározása után előállítottuk a rekombináns burokfehérjéket (**3. ábra**), amelyeket HisBind affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával tisztítottunk. A gyantához kötött fehérjék tisztaságáról egyre intenzívebb mosási lépésekkel gondoskodtunk. Meghatároztuk a mosó puffer maximális imidazol koncentrációját (150 mM), amely hatékonyan távolítja el a szennyező fehérjéket, de még nem okoz jelentős veszteséget a burokfehérje kitermelésben. A fehérjék expresszióját és a tisztítási lépéseket 10%-os SDS-PAGE alkalmazásával és Coomassie festéssel ellenőriztük (**4. ábra**, **5. ábra**).



3. ábra: Túltermelt burokfehérjék kimutatása SDS-PAGE módszerrel. Molekulasúly marker (kDa) (M), MT32-t (1) és PSAH-t (2) túltermelő 50 µg fehérjetartalmú denaturált bakteriális totál fehérjekivonat, Coomassie festéssel vizualizálva. A megfelelő magasságban nyilakkal is jelzett intenzívebb sávok a túltermelt burokfehérjéket jelzik a gélen.



4. ábra: MT32 burokfehérje tisztítása His-Bind affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával. Az 50 µg fehérjetartalmú denaturált bakteriális fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE alkalmazásával választottuk el, és Coomassie festéssel vizualizáltuk. Molekulasúly markernek megfelelő referencia pontok (kDa) (M), Szonikálással feltárt MT32 fehérjét túltermelő bakteriális kivonat centrifugális felülúszó (1), MT32 burokfehérjét túltermelő bakteriális fehérjekivonat affinitás kromatográfiás gyantához kötve, a mosást megelőzően (2), Affinitás kromatográfiás gyantához kötött fehérjék mosás után (3). A mosási lépések hatására a tiszta burokfehérje a megfelelő magasságban egy sávot szolgáltatva jelenik meg a gélen.



5. ábra: PSA-H burokfehérje tisztítása His-Bind affinitás kromatográfiás gyanta alkalmazásával. Az 50 µg fehérjetartalmú denaturált bakteriális fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE alkalmazásával választottuk el, és Coomassie festéssel vizualizáltuk. Molekulasúly markernek megfelelő referencia pontok (kDa) (M), PSA-H burokfehérjét túltermelő bakteriális fehérjekivonat affinitás kromatográfiás gyantához kötve, a mosást megelőzően (1), Affinitás kromatográfiás gyantához kötött fehérjék 3×100 mM imidazol-PBS mosás után (2),

Affinitás kromatográfiás gyantához kötött fehérjék a mosási lépések után (3). A mosási lépések hatására az affinitás kromatográfiás gyantához nem specifikusan kötődött fehérjék nagyrészt eluálódnak, és a tiszta burokfehérje a megfelelő magasságban egy sávot szolgáltatva jelenik meg a gélen.

Burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója

A tisztított, 6×His jelölő címkével ellátott burokfehérjéket Ni-NTA His-Bind agaróz affinitás kromatográfiás gyanta felületére kötöttük. A gyantán immobilizált burokfehérjét a random oligonukleotid könyvtárral inkubáltuk, amely $\sim 10^{14}$ -féle DNS szekvenciát tartalmazott. 15 szelekciós és három kontraszelekciós ciklust követően 20-20 vírus burokfehérje-specifikus egyszálú DNS szekvenciát határoztunk meg klónozás és szekvenálás segítségével. Az aptamer szelekció eredményeként nyert szekvenciák variábilis szakaszait összehasonlító analízisnek vetettük alá, amelyhez a Clone Manager programot alkalmaztuk (**6. ábra**). Egyes szekvenciák többször is előfordultak, ezek közül mindkét fehérje esetében a leggyakrabban előfordulót választottuk ki és szintetizáltattuk nagyobb mennyiségben a további kísérleteinkhez.

```

MT32 1-10      -----ggggtggtgggttcttttgtggattggtggtgggggca----
MT32 18-19    caggaatgctaaaggtttggtggttgg-tggttatgctatg-----
MT32 20      -----tgaaggtttggttttgg-tggtcag-ggatggaaggctgttc
MT32 21      ---gcatcgtgaaggtttggttattggt-tggtcag-ggctcgcg-----
MT32 15-17    -----ccaaaggtttggtggttgg-tggttggtgggtgtgcagctgc--
MT32 11-14    -----cccgataggtttggtc-tggt-tggaggagggggtattgt---

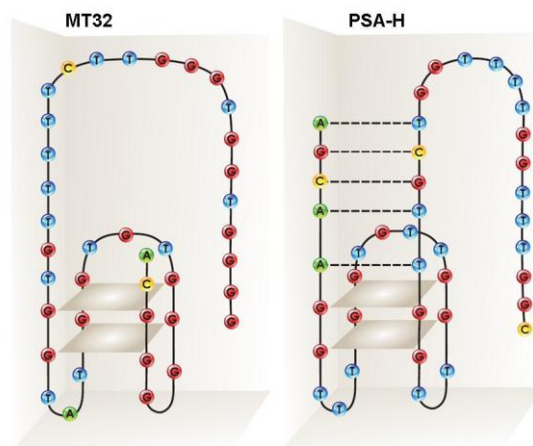
PSAH 20      ---acgtatcaaaggttt-ggtattggttggtt-gtagcgtgttg-----
PSAH 21      ---gcca---aggttt-ggtattggttggttggtggggag-gggttat---
PSAH 19      -----cttgaaggttt-ggtggtggttgg--caaggag-g---tgctgca
PSAH 18      --gggcctggaaggttt-ggtggtggttgg--gcagg--g--g---taagt---
PSAH 14-15    gtggcccaaagaaggttt-ggtggtggttgg--gtttg--t--g---tcc----
PSAH 16-17    ----gcggtaaaggttt-ggttttgggttgg--tatcgcga-ggtttaa----
PSAH 1-9      -----agcaaaggttt-ggtggtggttggttgctggtttt-ggttggc---
PSAH 10-13   ----tgggctaaggtgtcgggggtgggtgggttgtgtcttga-----

```

6. ábra: 20-20 MT32-, és PSA-H-specifikus szekvencia összehasonlító analízise. A vastagon jelölt betűk a QGRS Mapper programmal jósolt G-quadruplex szerkezetet kialakító nukleotidokat jelölik, a sötétszürke kiemelés a szekvenciák közötti szignifikáns homológiát jelöli.

A burokfehérje-kötő aptamerek prediktív másodlagos szerkezete

A QGRS Mapper interneten elérhető program alkalmazásával megvizsgáltuk, a G-quadruplexek előfordulásának lehetőségét a szekvenciákban. Minden aptameren belül több ilyen szakaszt találtunk, a legvalószínűbb G-quadruplexet kialakító nukleotidokat vastag betűvel jelöltük az ábrán (**6. ábra**). A burokfehérjékre specifikus aptamer szekvenciák közül kiválasztottuk a leggyakrabban előfordulókat, és grafikusán is ábrázoltuk a prediktív másodlagos szerkezetüket (**7. ábra**).



7. ábra: Az MT32 és PSA-H aptamer prediktív másodlagos szerkezete a nukleotidok feltüntetésével.

A szürke négyzetek a G-kvartetteket jelölik.

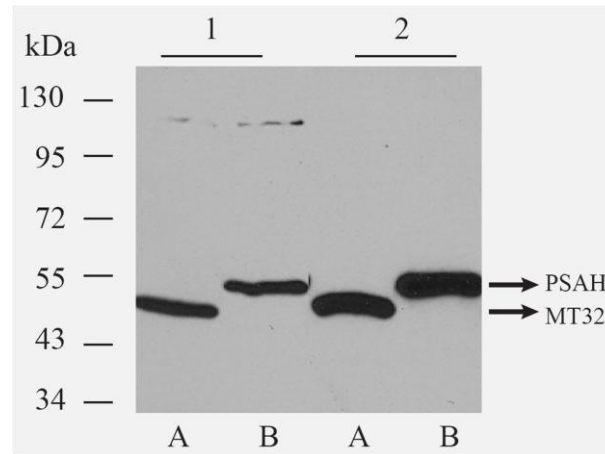
Az aptamerek kötőképességének jellemzése felületi plazmon rezonancia (SPR) alkalmazásával

A két leggyakrabban előforduló szekvenciát SPR analízisnek vetettük alá, hogy meghatározzuk a célmolekula kötőképességüket. Az oligonukleotidok variábilis szakaszát a 3'-végen HS-(CH₂)₆-TTTT összekötő szakasszal szintetizáltattuk, és közvetlenül egy arany chip felületén immobilizáltuk. Az aptamerek és a tisztított burokfehérjék közötti affinitást felületi plazmon rezonanciával (SPR) határoztuk meg. Az aptamer-fehérje komplexek disszociációs állandóit (K_d) az SPR-görbék kinetikai analízisével számítottuk ki. A PSA-H aptamer disszociációs konstansának értéke két nagyságrenddel alacsonyabb volt a PSA-H fehérjével ($K_d=8,0 \times 10^{-9}$ M), mint az MT32-vel ($K_d=2,9 \times 10^{-7}$ M). Ezzel ellentétben az MT32 aptamer esetében csupán kis eltérést tapasztaltunk a két fehérje K_d értékében, így az MT32 fehérjével $K_d=5,5 \times 10^{-8}$ M, a PSA-H fehérjével pedig $K_d=8,3 \times 10^{-8}$ M értékeket határoztunk meg.

Western-blot analízis

A szelektált aptamerek specifikusságának vizsgálatára Western-blot analízist végeztünk. A túltermelt burokfehérjéket tartalmazó bakteriális totál fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE-sel választottuk el, majd az általunk optimalizált protokoll szerint nitrocellulóz membránra

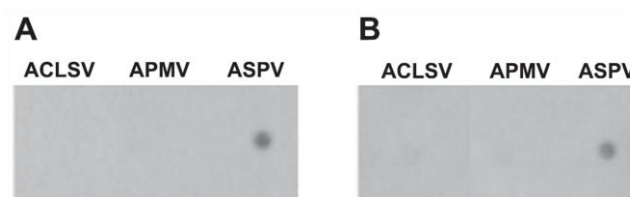
blottoltuk, Protein Free blokkoló oldattal kezeltük, és biotin-jelölt burokfehérje-specifikus aptamerekkel inkubáltuk. Az aptamerek kötődését ExtrAvidin-HRP kapcsolása után HRP-katalizált ECL reakcióval detektáltuk. Az aptamerek specifikusan csak a denaturált burokfehérjékhez kötődtek (**8. ábra**).



8. ábra: Az aptamerek specifitásának igazolása Western-blot analízissel. 20-20 µg/sáv MT32 (A) és PSA-H (B) burokfehérjét túlermelő totál *E. coli* fehérjekivonatokat 10%-os SDS-PAGE segítségével elválasztottunk, és nitrocellulóz membránra blottoltunk. A detektálást biotinilált MT32 (1) és PSA-H (2) aptamerekkel, ExtrAvidin-HRP kapcsolásával és ECL reakcióval végeztük. A denaturált totál bakteriális fehérjekivonatokból az aptamerek specifikusan csak a burokfehérjékhez kötődtek. A nyilak a megfelelő magasságban jelzik a burokfehérjéket.

Dot-blot analízis

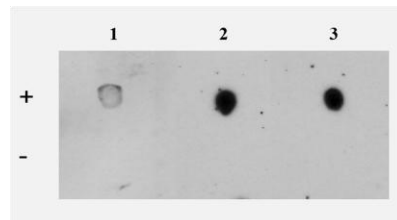
Az aptamerek specifitását natív vírusokkal is vizsgáltuk, melynek során dot-blot analízist végeztünk vírus fertőzött növények fehérjekivonataival. Kereskedelmi forgalomban beszerezhető Apple Mosaic Virus (ApMV), Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) és Apple Stem Pitting Virus (ASPV) pozitív növényi kivonatokat cseppentettünk nitrocellulóz membránra, és a detektálást a Western-blot kísérletnél leírtak szerint kiviteleztük. A natív vírusfehérjéket tartalmazó membránon jól láthatóan kimutattuk az ASPV-t mindkét aptamer segítségével, míg nem kaptunk jelet az ACLSV-t és ApMV-t tartalmazó pontokban (**9. ábra**).



9. ábra: Az aptamerek Dot-blot analízise ACLSV-, APMV- és ASPV-fertőzött növényi kivonatokkal.

100 ng fehérjét tartalmazó natív, vírusfertőzött növényi fehérjekivonatokat nitrocellulóz membránra cseppentettünk, majd biotin-jelölt, MT32 (A) és PSA-H (B) specifikus aptamerekkel inkubáltunk. A detektálást ExtrAvidin-HRP kapcsolásával, és ECL reakcióval végeztük.

A szelektált aptamereink és a kereskedelmi forgalomban elérhető anti-ASPV IgG antitest alkalmazhatóságát dot-blot analízissel vetettük össze. Specifikusságuk összehasonlítására natív ASPV-fertőzött és negatív kontroll növényi kivonatokat cseppentettünk nitrocellulóz membránra, és biotin-jelölt aptamerekkel, vagy monoklonális anti-ASPV IgG antitesttel inkubáltuk. A detektálást HRP-konjugált anti-egér antitest, illetve ExtrAvidin-HRP kapcsolásával és ECL reakcióval végeztük. Az eredmények alapján az aptamerek körülbelül tízszer intenzívebb jelet szolgáltatnak és specifikusan csak az ASPV-t tartalmazó növényi kivonathoz kötődtek (**10. ábra**).



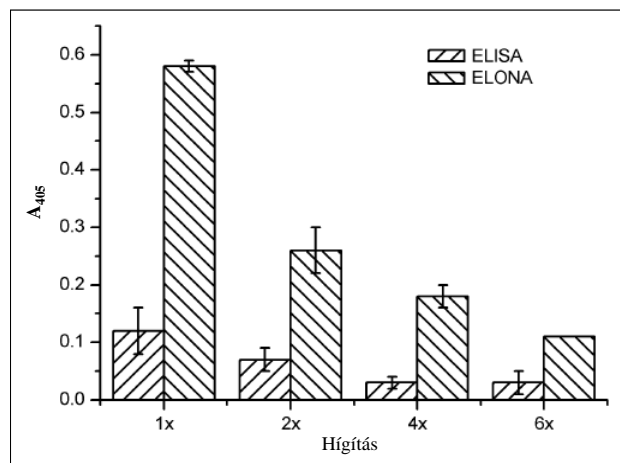
10. ábra: Az aptamerek és az anti-ASPV IgG összehasonlító vizsgálata dot-blot analízissel. 15 µg/pont vírusfertőzött (+) és negatív kontroll (-) növényekből származó fehérjekivonatokat nitrocellulóz membránra cseppentettük, majd a membránt az antitesttel (1), illetve MT32 (2) és PSA-H (3) biotin-jelölt aptamerrel inkubáltuk. A detektálást HRP-konjugált anti-egér antitest, illetve ExtrAvidin-HRP kapcsolásával és ECL reakcióval végeztük. Az aptamerek jóval intenzívebb jelet szolgáltatnak az anti-ASPV IgG-nél és nem kötődtek a kontroll kivonatokhoz.

ASPV kimutatása ELISA és ELONA módszerrel

A kereskedelmi forgalomban kapható, ASPV detektálásra kifejlesztett készlet komponenseit felhasználva elvégeztünk egy dupla ellenanyag, más néven szendvics ELISA meghatározást. Az anti-ASPV IgG ellenanyag burkolt tálcáit ASPV-fertőzött növényi fehérjekivonat különböző hígításaival (1x, 2x, 4x, 6x), illetve negatív kontroll kivonattal, majd AP-konjugált anti-ASPV IgG antitesttel inkubáltuk. Az ELONA meghatározásnál az ELISA-nál leírtaknak megfelelően jártunk el, de a felismerő antitestet biotinilált PSA-H aptamerrel helyettesítettük. Az ELONA eljárás során a kötődő aptamerek detektálására egy plusz, ExtrAvidin-AP-val történő inkubációs lépést iktattunk be. A kétféle módon előkészített tálcán azonos

paraméterekkel, pNPP szubsztrát hozzáadásával és fotometriával határoztuk meg a kapcsolódott AP mennyiségét (**11. ábra**).

A két kísérlet eredményei alapján az ELONA érzékenyebb módszernek bizonyult, minden hígítás esetén intenzívebb jelet szolgáltatott a megfelelő ELISA-val mért értékekhez képest, így a hatszoros hígításban mért érték is a mérési tartományba esett, míg az ELISA módszerrel már nem lehetett különbséget tenni a négyszeres és hatszoros hígítású minták között.

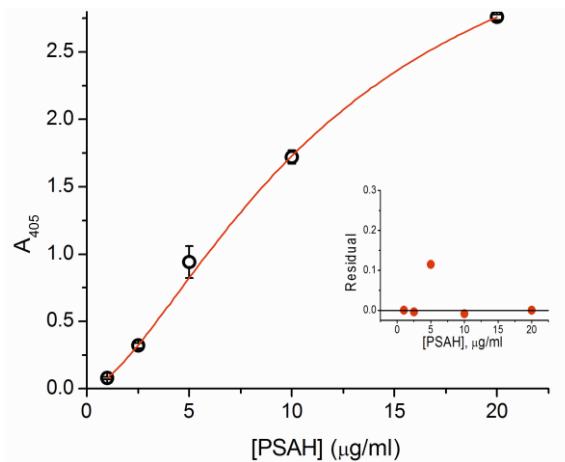


11. ábra: ASPV detektálása ELISA és ELONA módszer alkalmazásával. Az anti-ASPV IgG antitestet mikrotiter tálcán immobilizáltuk, majd az ASPV-pozitív növényi kivonat különböző hígításaival, illetve negatív kontroll kivonattal inkubáltuk. A detektálást AP-konjugált anti-ASPV IgG vagy biotinilált PSA-H aptamer és Extravidin-AP kapcsolásával, és pNPP szubsztrát hozzáadásával végeztük. Az ELONA minden pontban magasabb abszorbancia értékeket szolgáltatott, mint a megfelelő ELISA-val mért értékek.

ASPV vírus burokfehérjék detektálása DOS-ELONA módszerrel

A sikeres ellenanyag-aptamer kombinációs ELONA eljárást követően azt vizsgáltuk, hogy szelektív aptamereink alkalmasak-e a vírus burokfehérje ellenanyag használata nélküli detektálására. Az 5'-végen tiol módosítással szintetizált MT32 aptamerrel módosított, és blokkolt maleimid-aktivált mikrotiter tálca celláit különböző mennyiségű tisztított PSA-H fehérjét tartalmazó bakteriális fehérjekivonattal inkubáltuk, és a mosási lépések elvégzése után biotinilált PSA-H aptamert tartalmazó oldattal inkubáltuk. A detektálást ExtrAvidin-AP és pNPP szubsztrát oldat hozzáadásával végeztük. A mért értékekre sztenderd negyedfokú logisztikus egyenletet illesztettünk ($R^2=0,999$) (**12. ábra**).

A kísérlet eredménye alapján a PSA-H fehérje tisztán aptamer alapú detektálása is megoldható, antitest alkalmazása nélkül. Az alkalikus foszfatázzal katalizált reakció akár 100 ng PSA-H protein kimutatására alkalmas mérhető jelet szolgáltatott komplex bakteriális mátrixból.

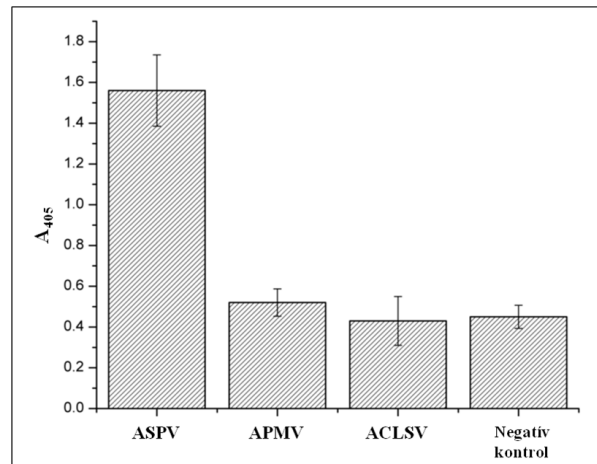


12. ábra: PSA-H burokfehérje koncentráció meghatározása DOS-ELONA módszerrel. A tiolmódosított MT32 aptamerrel bevont mirotiter tálcát különböző mennyiségű PSA-H fehérjét tartalmazó bakteriális kivonattal inkubáltuk. A detektálást biotinilált PSA-H aptamer és ExtrAvidin-AP kapcsolásával, pNPP szubsztráttal végeztük. Az abszorbancia értékek három mérés eredményének átlagai, a háttér értékével korrigálva. Az aptamerekkel létrehozott szendvics típusú meghatározás alkalmas a PSA-H burokfehérje kimutatására komplex bakteriális mátrixból.

ASPV vírus partikulumok detektálása DOS-ELONA módszerrel

Miután igazoltuk, hogy a DOS-ELONA módszer alkalmas a vírus burokfehérje mérésére, az ASPV vírus partikulumok detektálására is kidolgoztunk egy eljárást. A foszforilált és 5 timidin összekötővel ellátott MT32 aptamert kovalensen kapcsoltuk az aktivált NucleoLink mikrotiter tálca felületére. A szabad kötőhelyek inaktiválása után dIdC-t tartalmazó BSA oldattal blokkoltuk, majd 10 µg fehérjetartalmú vírusmentes és ASPV-, ACLSV- vagy ApMV-fertőzött növényi fehérjekivonatokkal inkubáltuk a cellákat. A detektálás biotin-jelölt MT32 aptamer és ExtrAvidin-AP konjugátum kapcsolásával, pNPP szubsztrát hozzáadásával történt. A fotometrálassal mért jelintenzitás az ASPV-fertőzött kivonat esetében körülbelül háromszor nagyobb volt, mint az ApMV, ACLSV és a negatív kontroll esetében mért értékek (**13. ábra**). A kísérlet eredménye alapján a DOS-ELONA specifikusan kimutatja az ASPV-

fertőzött kivonatot, és alkalmas teljes vírusrészecskék megkötésére komplex növényi mátrixból.



13. ábra: Vírusdetektálás DOS-ELONA módszerrel növényi kivonatokból. A mért jelintenzitás az ASPV-fertőzött kivonat esetében körülbelül háromszor nagyobb, mint az ApMV, ACLSV és a negatív kontroll esetében mért értékek.

Következtetések

- Egy korábban publikált, affinitás kromatográfiás gyantán immobilizált célfehérjéken alapuló aptamer szelektációs módszer módosított változatát sikeresen alkalmaztuk burokfehérje specifikus aptamerek szelektációjára, amellyel igazoltuk, hogy az eljárás általánosan alkalmazható. A szelektáció sikerét bizonyítja, hogy az SPR analízis alapján az aptamerek nagy affinitású kötést alakítanak ki a burokfehérjékkel. A disszociációs konstansok értékei a mikro- és nanomoláris tartományba esnek, így affinitásuk hasonló vagy magasabb, mint a korábban, más megközelítésekkel izolált vírus specifikus aptamereké.
- A szelektált aptamereket sikeresen alkalmaztuk a vírusfertőzött növényi kivonatok kimutatására többféle diagnosztikai módszer alkalmazásával. Az aptamerek mind a natív, mind a denaturált burokfehérjéket specifikusan felismerik, amit a dot-blot és western-blot kísérletek eredményei támasztanak alá. Az aptamerek tehát alkalmasak a klasszikus bioanalitikai módszerekben az antitestek helyettesítésére, amelyhez csupán a kimutatási módszer körülményeinek optimalizálására van szükség.

- A szelektált aptamereink egyik előnyös tulajdonságaként kiemelhető, hogy a minta előkészítés valószínűleg nem befolyásolja a fehérjén az aptamer kötődéséhez szükséges motívumok hozzáférhetőségét. Ez a megállapítás arra alapozható, hogy az aptamereket tisztított burokfehérjékre szelektáltuk, amelyeket natív és denaturált állapotban is felismernek. Ezzel ellentétben az ASPV-specifikus antitest a denaturált fehérjéhez nem kötődik, így valószínűsíthető, hogy az antitest által felismert epitópok hozzáférhetősége függ a minta előkészítés folyamataitól, ami a gyakorlati felhasználás során negatív eredményhez vezethet.
- Egy korábban publikált, kevésbé elterjedt ELONA módszer mintájára elvégzett kísérletünk eredményei alapján is kijelenthető, hogy az aptamerek alkalmasak az antitestek helyettesítésére, és komplex növényi mátrixban nagy érzékenységgű víruskimutatást tesznek lehetővé.
- Legfontosabb eredményünk egy új, tisztán aptamer alapú meghatározási módszer, a DOS-ELONA fejlesztése, amellyel kiküszöböltük az eredeti ELONA módszer antitest igényét, így azok előállításából és alkalmazásából fakadó hátrányokat. A módszer csupán aptamerek alkalmazásával lehetővé teszi a burokfehérje koncentráció pontos meghatározását komplex, bakteriális fehérjét tartalmazó mátrixból is, és a meghatározás elvégezhető egy általános felszereltségű laboratóriumban is.
- Az általunk kifejlesztett DOS-ELONA módszer alkalmas az ASPV-fertőzött növényi kivonatok kimutatására és érzékenysége felülmúlja az elérhető ASPV-detektáló ELISA módszerét. Ebben a meghatározásban kihasználtuk a vírus kapszid felépítését, így ugyanazt az aptamert alkalmazhattuk a vírus részecskék kikötéséhez és detektáláshoz is, ami tovább egyszerűsítette az analízist, és az aptamerek antitesteknél kisebb mérete révén a jelintenzitás növekedését eredményezte.

Az aptamerek egyre népszerűbb felismerő molekulák, ennek ellenére csak kevés publikációban számolnak be olyan diagnosztikai alkalmazásokról, amelyekben komplex mátrixból történik a meghatározás. Az általunk bemutatott DOS-ELONA módszerek alkalmasak komplex bakteriális és növényi fehérjét tartalmazó mátrixból is a burokfehérje és a teljes vírus meghatározására.

Saját publikációk jegyzéke

1. Selection and versatile application of virus specific aptamers

Zsófia Balogh, Viola Bardóczy, Gergely Lautner, Beata Komorowska, Róbert E. Gyurcsányi, Tamás Mészáros (2010)

The FASEB Journal, 2010 Nov. 24, (11):4187-95. Epub 2010 Jul 12.

IF.: 6,401

2. Aptamer based biochips for label-free detection of plant virus coat proteins by SPR imaging.

Lautner, G., Balogh, Zs., Bardóczy, V., Mészáros T., Gyurcsányi, R., E. (2010),

Analyst, 2010 May, 135(5):918-26. Epub 2010 Feb 11.

IF.: 3,272