

Bakteriális biofilmképződést gátló aptamerek előállítása és vizsgálata

Doktori tézisek

Harkai Ákos

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Mészáros Tamás, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Hegyesi Hargita, PhD., egyetemi docens
Dr. Sveiczner Ákos, PhD., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Monostory Katalin, DSc., tudományos főmunkatárs
Dr. Törőcsik Beáta, MD-PhD., egyetemi docens

Budapest
2025

1. Bevezetés

1.1. Aptamerek tulajdonságai, felhasználásuk

Az 1990-es évek hajnalán két, egymástól függetlenül működő kutatópáros olyan rövid, egyszálú RNS molekulák előállítását írta le, amelyek specifikusan, nagy affinitással kötődnek egy választott célmolekulához. Az egyik páros (Tuerk és Gold) a T4 bakteriofág DNS-polimerázát választotta célpontnak, és erre hajtott végre egy szisztematikus RNS-szelekciót. Ezzel demonstrálták, hogy egy random bázissorrendű RNS-gyűjteményből hamar azonosíthatók a fehérjéhez jól kötődő oligonukleotidok. Víziójuk szerint, módszerük általánosan alkalmazható bármilyen célmolekulára, ezzel pedig megalkották az angol *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*-nek, vagy röviden SELEX-nek nevezett folyamatot. A másik szerzőpáros (Ellington és Szostak) szerves kis molekulákra végzett hasonló RNS-, és DNS-szelekciókat, amik eredményeképpen szintén nagy diverzitású random nukleinsav könyvtárakból sikerrel izoláltak specifikusan illeszkedő részecskéket. A mesterséges, egyszálú oligonukleotidok megnevezésére az *aptus* (latin: illeszkedni) és *meros* (görög: részecske) szavak összevonásából az *aptamer* fogalmát vezették be, ami a mai napig használatos a tudományos világban.

Az aptamerek specifikus ligandfelismerésük folytán számtalan felhasználási lehetőséget rejtenek magukban, amiket elsősorban alkalmazott kutatási, elválasztástechnikai, diagnosztikai, vagy terápiás területeken lehet kibontakoztatni. A jelzett, potenciális alkalmazási területeken szinte egyeduralkodók a kutatás-fejlesztési és innovációs piacon korábban megjelenő monoklonális antitestek, amiknek kutatását az aptamerek leírását megelőzően, 1984-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták. Bár az antitestek jelentősége valóban tagadhatatlan, az aptamerek több szempontból (pl.: célmolekulák típusa, módosítási lehetőségek, stabilitás, költségigény) kedvezőbb tulajdonságokkal bírnak, így azok méltó alternatívái az ellenanyagoknak.

A megfelelő aptamer képes lehet működésében gátolni célmolekuláját, amely sajátságát kihasználva seregnyi inhibitorfejlesztés eredményezett ígéretes, klinikai vizsgálatokban kipróbált, gátló hatású aptamereket. Ezek közül kettő, a Macugen® és az Izervay® időskori makuladegeneráció terápiájában alkalmazott, aptameralapú gyógyszer. Amíg az előbbi készítmény a VEGF-hez kötődve akadályozza a szemben az új véredényképzést, addig az utóbbi a C5 fehérjéhez kapcsolódva gátolja a komplement

kaszkád által aktivált membránt támadó komplex (MAC) kialakulását, ezzel lassítva a retina degenerációját.

1.2. Biofilmek tulajdonságai, jelentősége

A biofilmek kémiai és biológiai heterogén, extracelluláris polimer alkotókból (EPS) felépülő, jellemzően szilárd-folyadék határfelületen kialakuló dinamikus struktúrák, amelyek hozzájárulnak a legtöbb prokarióta és néhány egysejtű eukarióta mindennapi túléléséhez. A biofilmképződés egy adott planktonikus sejt valamely felületen történő megtapadásával kezdődik, amivel nő a lokális populációsűrűség, és a mikrokolóniák által megindul a biofilm korai érése, amit az extracelluláris polimer termelésben gazdag késői érés követ, végül a kiterjedt biofilmből kiválnak és szétszóródnak az újabb planktonikus sejtek.

Bár a biofilmképződés szabályozásának molekuláris hátterét jelenleg is aktívan kutatják, az eddigi eredmények alapján a főbb mozgató rugók a környezeti hatások (tápanyag, pH, hőmérséklet, oxidatív stressz, populációsűrűség) megváltozása, valamint a kezdeti tapadást követő fenotípusváltozás lehetnek. E faktorok hatására egyes másodlagos hírvivők intracelluláris koncentrációja megnő; a ciklikus di-guanozin-monofoszfát (c-di-GMP) bakteriális jelátviteli molekula számos sejtfolymat, többek között a felszíni adaptáció, a motilitás és a biofilmképződés szabályozásához is hozzájárul. Az így alakuló mikrokolóniákban a lokális sejtsűrűség egyre növekszik, ami az egysejtűek intercelluláris kommunikációjához vezet. A *quorum sensing* (QS) – a többsejtű eukarióta rendszerekre emlékeztető – parakrin sejt-kommunikációt tesz lehetővé, amiben a mediátor szerepét kis molekulatömegű lakton-, furán-, zsírsav-származékok, esetleg oligopeptidek, úgynevezett *autoinduktorok* töltik be. Az autoinduktorok hatására a biofilm további érése, az EPS kiterjedt szintézise, majd később a sejtek szóródása valósul meg.

A biofilmek mátrixa az adott mikroorganizmusra jellemző, különféle polimerekből épül fel, azonban az EPS jelentős részét képezik az exopoliszacharidok, az extracelluláris DNS-ek, illetve az ezeket termelő és összekapcsoló szekretált, valamint sejt-felszíni fehérjék. Mivel ezek a biomolekulák igen változatosak lehetnek, ezért az univerzális biofilmképződést gátló eljárások kidolgozása nagy kihívást jelent a kutatók számára. Az egészségügyi vonatkozású biofilmek jellemzően szövetek-, nyálkahártyák felületén, illetve orvosi eszközökön alakulnak ki, amik ezzel számos patogén törzs

fennmaradásához biztosítanak védett és ideális miliőt. Mindazonáltal, napjainkban egyre szaporodó számban találni példát olyan ápolói, orvosi és fogorvosi használatra szánt eszközökre és eljárásokra, amelyek a biofilmképződést megelőzni, kialakulása esetén azt eliminálni igyekeznek, ezzel mérsékelve a patogének virulenciáját és multidrog-rezisztenciájuknak kialakulását.

1.3. *Streptococcus mutans* és a glükánkötő fehérje C

A humán szájüreg mikrobiomjának prominens tagja a *Streptococcus mutans*, egy fakultatív anaerob, Gram-pozitív, fiziológiás körülmények között kommenzalista életmódot folytató baktérium. Elégtelen szájhigiénia, vagy a vérkeringésbe jutása esetén azonban gyulladáskeltő patogénként is viselkedhet, amivel a fogszuvasodáson túlmenően több, súlyos kórkép (pl.: bakteriális endocarditis, stroke) kialakulásának kockázatát növelheti, prognózisát ronthatja.

A *Streptococcus*-ok virulenciáját elősegítik a sejtfelszínhez kötött és szekretált virulencia faktorok, a metabolitokból eredő acidogenitás, a savtűrő képesség és a biofilmképzésre való hajlam. Biofilmképzésüket számos sejtfelszíni fehérje segíti, amik közül a glükánkötő fehérjék kiemelt szerepet játszanak. A glükánkötő fehérje C (GbpC) kulcsfontossággal bír a sejtek extracelluláris glükán-polimerhez kapcsolásában, ezáltal a sejtek biofilm mátrixon belül való megtartásában. GbpC-hiányos mutáns törzsek létrehozásakor megfigyelték, hogy azok biofilm-mennyisége és kariogenitása szignifikánsan csökkent, ami rámutat a fehérje terápiás célpontként történő alkalmazhatóságára. 2018-as publikálása óta elérhető a fehérje nagyfelbontású kristályszerkezete, ami felfedte a fehérje jellegzetes szerkezeti régióit, és lehetőséget adott a kutatóknak specifikus gátlómolekulák fejlesztésére.

2. Célkitűzések

A dolgozatom témáját érintő szakirodalom tanulmányozása alapján megállapítottam, hogy a biofilmek összetett szerkezete és működése jelentős egészségügyi következményekkel is járhatnak, amiknek hatékony leküzdéséhez, mi több, megelőzéséhez jelenleg korlátozott számú eszközzel rendelkezünk. A patogén mikroorganizmusok által termelt biofilm minimalizálásának egy lehetséges stratégiája, ha egy jóldefiniált építőelemén keresztül, specifikusan célozzuk a biofilm architektúrát. Az aptamerek tulajdonságaikból adódóan bizonyítottan alkalmasak célmolekulák specifikus felismerésére és azok aktivitásának gátlására, így potenciális biofilm inhibitorként is használhatóak.

Munkám során elsődleges célként tűztük ki olyan DNS aptamerek előállítását és vizsgálatát, amelyek alkalmasak lehetnek a *Streptococcus mutans* glükánkötő fehérje C (GbpC)-hez kötődve a biofilmképződést specifikusan gátolni. Ehhez a következő lépések megvalósítását tartottuk szükségesnek:

1. Az aptamerszelekcióhoz, majd az azt követő kölcsönhatás vizsgálati mérésekhez szükséges rekombináns GbpC, valamint Antigen I/II célmolekulák molekuláris klónozás útján történő előállítása prokarióta sejtes rendszerben és az azt követő izolálásuk affinitás kromatográfiás módszerrel.
2. Az izolált rekombináns GbpC célfehérje stabilitásának és glükánkötésének vizsgálata a majdani szelekciós körülmények között.
3. A GbpC-specifikus DNS aptamerek szelekciójának elvégzése az Antigen I/II szerkezetanalóg fehérje és GbpC-hiányos *S. mutans* mutáns sejtek ellen végzett kontraszelekciós lépések közbeiktatásával.
4. A GbpC-re szelektált aptamerjelöltek előállítása továbbfejlesztett primer blokkolt aszimmetrikus PCR-rel, majd az aptamerek karakterizálása kísérletes és predikciós módszerekkel.
5. Végül a karakterizált aptamerek funkcionális tesztelése biofilmgátló kísérletekben.

3. Módszerek

3.1. GbpC és Antigen I/II rekombináns fehérjék előállítása

A célfehérjék génjeit kódoló plazmid konstrukciókat klasszikus rekombináns DNS technikával hoztuk létre. A génfragmenteket úgy terveztük meg, hogy a sejtfelszíni fehérjéknek az extracelluláris szakaszai, N-terminális 6xHis-jelöléssel kerüljön kifejeződésre. Ehhez kémiaiailag megsztetizáltattuk a génfragmenteket tartalmazó pUCIDT-Amp (IDT) donor plazmidokat, majd PCR segítségével felsokszorosítottuk az expressziós pET-28a (Novagen) recipiens plazmidba beilleszteni kívánt DNS szakaszokat. Ezután mind az expressziós vektort, mind a PCR terméket restrikciós endonukleázokkal kezeltük, majd az emésztett fragmenteket agarózgélből izolálva T4 DNS ligázzal egyesítettük. A GbpC (50 kDa) és AgI/II (65 kDa) fehérje fragmentek túltermeléséhez autoindukciós expressziós rendszert használtunk, amihez BL21(DE3) kémiai kompetens *E. coli* sejteket gyártói utasítások szerint transzformáltuk a korábban nukleinsav-szekvenálással validált plazmidokkal. A rekombináns fehérjék izolálását, a sejtek feltárását követően, a 6xHis-jelölésen keresztül, nikkelionokkal konjugált PureCube Ni-INDIGO paramágneses affinitásgyöngyökkel gyártói utasítások szerint végeztük, és a tisztítás egyes lépéseit SDS-PAGE elválasztást követően ellenőriztük.

3.2. GbpC stabilitási és funkcionális vizsgálatai

Az alkalmazott pufferek GbpC-termostabilitásra gyakorolt hatását termikus kihajtogatódási mérésekben vizsgáltuk. Ehhez fluoreszcens GloMelt festéket és tisztított GbpC-t kevertünk össze, amit a tesztpufferek (PBS, PBS+Ca²⁺, ASB) egyikével hígítottunk. A fehérje termikus kihajtogatódása során bekötődő festék fluoreszcenciáját követtük kék optikai filter (SYBR Green) beállítással QuantStudio 12K PCR készülékkel, majd a kapott olvadási görbék hőmérséklet szerinti első deriváltját értékeltük.

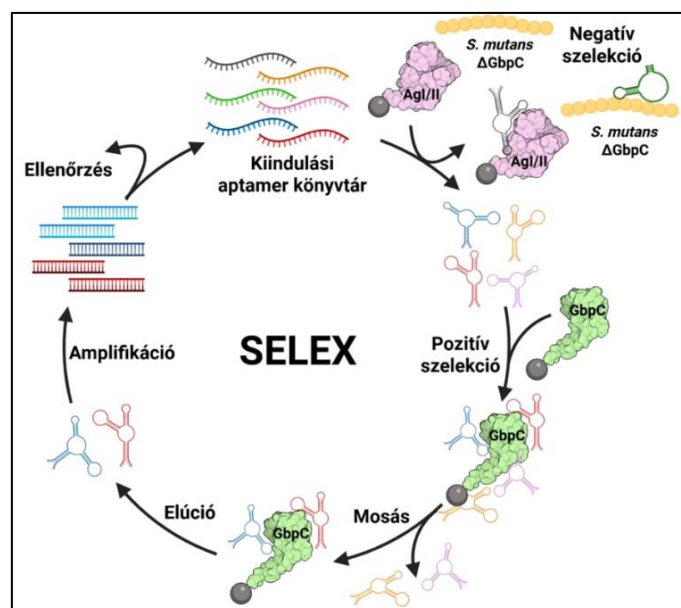
A tisztított fehérjék glükánkötő aktivitását háromféle kölcsönhatás vizsgálati technikával ellenőriztük. Az ALPHA mérésekben a vizsgált dextrán és GbpC molekulákat sztreptavidinnel, illetve Ni²⁺-nal funkcionalizált donor és akceptor gyöngyök felületére kapcsoltuk, majd a mintakeveréket 680 nm hullámhosszúságú fénnel besugároztuk. A kölcsönhatás következtében a donor és akceptor gyöngyök közel kerültek egymáshoz, és a gyöngyök közti távolságot megtévő reaktív oxigén gerjeszteni tudta az akceptor gyöngyökben található fluorofór komponenseket, így a létrejött kölcsönhatást 520-620 nm-en kemilumineszcens jel formájában detektáltuk EnSpire készülékkel.

A bioréteg interferometria (BLI) mérésekhez előbb a biotinilált dextránt szenzorfelületre immobilizáltuk, majd az így módosított szenzort a másik partnert tartalmazó mintaoldatba merítjük. A módszerrel a kötődő GbpC molekula asszociációs és disszociációs kinetikáját valós időben követtük BLItz készülékkel, amiből megállapítható volt a kölcsönhatást jellemző egyensúlyi disszociációs állandó értéke.

Végül az immobilizálást nem igénylő mikroskalás termoforézis (MST) technikával is megvizsgáltuk a GbpC dextrán iránti affinitását, amihez a GbpC-ből 1xASB-vel készült felező hígítási sorhoz 100 nM-os FITC-dextrán oldatot adtunk 1:1 térfogatarányban, és az egyes hígítási tagokat tartalmazó reakcióelegyek hőmérsékletváltozás indukálta fluoreszcenciaváltozást Monolith készülékkel követtük.

3.3. GbpC specifikus aptamerek szelekciója SELEX eljárással

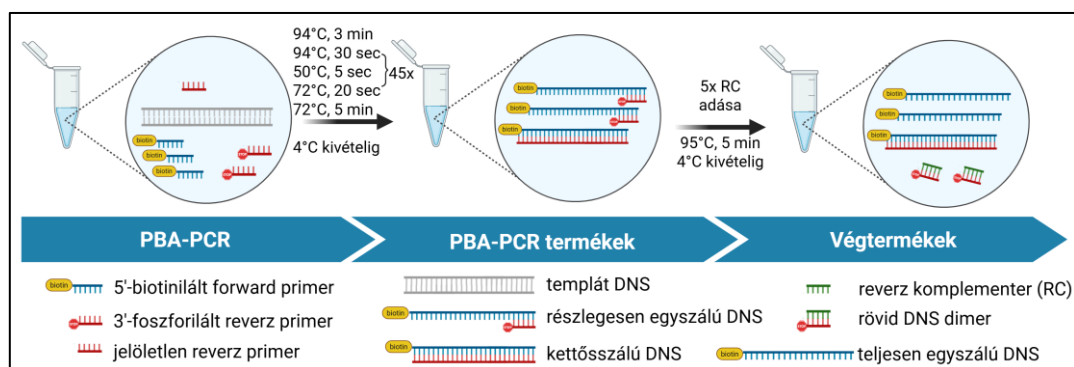
Az aptamerszelekcióhoz mintegy 10^{14} -féle különböző egyszálú oligonukleotidokat tartalmazó DNS könyvtárból indultunk ki. A 76 bázishosszúságú oligonukleotidokat egy 40 nukleotidból álló központi variábilis és egy-egy 18 nukleotidból álló primer régió alkotta. A szelekciós puffert úgy választottuk meg, hogy az a potenciális felhasználási körülményeket imitálja, egyúttal ideális miliót biztosítson a célfehérjék natív térszerkezete számára. Ehhez mesterséges nyálpuffert alkalmaztunk, aminek kémiai összetétele a fiziológias szekréturnak megfeleltethető. A szelekció egyes ciklusaihoz a fehérje-célmolekulát együtt inkubáltunk a kiindulási könyvtár oligonukleotidjaival. Az így inkubált célmolekuláról a gyengén kötődő aptamereket mosásokkal elimináltuk, majd a jól kötődőket eluáltuk, ezt követően emulziós PCR-ben amplifikáltuk, és a kétszálú termékeket alkalikus denaturálással egyszálúsítottuk, hogy azokat a következő szelekciós ciklushoz használhassuk. Az aptamerek specifikusságának növelése érdekében a SELEX folyamata során a 3., 5., 7. ciklusok után kontraszelekciós célpontként Antigen I/II-t, illetve GbpC-hiányos *S. mutans* törzset alkalmaztunk (1. ábra). Az utolsó ciklust követően amplifikált aptamereket TOPO vektorba inszertáltuk, és a konstrukciókkal *E. coli* sejteket transzformáltunk, majd az inszertet tartalmazó (pozitív) kolóniák PCR termékeit nukleinsav-szekvenálásra küldtük.



1. ábra: Az aptamerszelekció egy ciklusának sematikus ábrája.

3.4. PBA-PCR

Az egyes oligonukleotidok kötődésének kísérletes vizsgálatához az aptamerjelölteket a munkacsoportunk által kifejlesztett, majd optimalizált primer blokkolt aszimmetrikus PCR (PBA-PCR) technikával állítottuk elő. A PBA-PCR lényege, hogy a részlegesen egyszálú termékeket eredményező aszimmetrikus PCR-t a reakció kezdete előtt egy második, 3'-végén foszfáttal módosított reverz primerrel egészítettük ki, aminek következtében a blokkoló primer miatt az adott szárról nem képződött termék. Azonban a blokkoló primer kötődése hatással lehet az előállt aptamerjelölt által létesített kölcsönhatásokra, ezért azt feleslegben adott komplementer oligonukleotiddal leszorítva teljesen egyszálú aptamerjelölteket kaptunk. Az így előállított szekvenciákat ALPHA előszűrési és specifikussági mérésekhez használtuk (2. ábra).



2. ábra: Aptamerek előállítása továbbfejlesztett PBA-PCR-rel.

3.5. Aptamerek funkcionális vizsgálata

A karakterizálási és specifikussági vizsgálatok alapján legjobbnak ítélt négy jól és egy gyengén kötődő (A30, A39, A65, A96 és A58) aptamert választottunk biofilmképződést gátló kísérleteinkhez. Ehhez biofilmképző tápoldatot készítettünk, ami steril BHI tápoldatból, 1% szacharózból és vad típusú vagy GbpC-hiányos *S. mutans* törzsből állt. Az oldatokat U-fenekű mikrotiterlemezbe osztottuk szét, és kémiaiilag szintetizált, jelölésmentes aptamert adtunk hozzá. Az összeállított keveréket 16 órán keresztül, 37°C-os statikus, atmoszférikus termosztátban inkubáltuk. Másnap a felülúszók leöntését követően kristályibolyával festettük a keletkező biofilmstruktúrákat. A képződött mennyiségével arányos abszorbanciát 595 nm-en CLARIOstar készülékkel mértük, és az aptamerek gátló hatását a kezeletlen minták abszorbanciájához viszonyítva számítottuk ki.

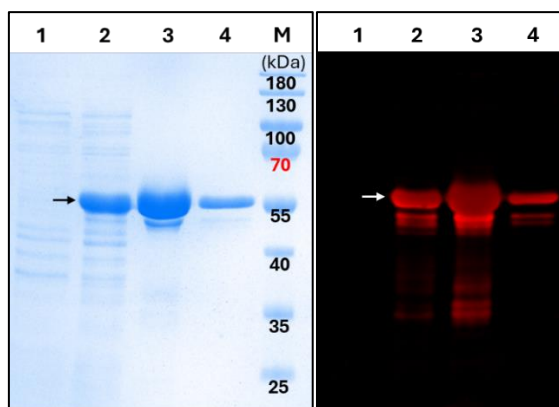
3.6. GbpC-aptamer komplexek térszerkezetének predikciója

A karakterizált és funkcionálisan vizsgált aptamerek kötőhelyének feltérképezését az online hozzáférhető, gépi tanulással fejlesztett AlphaFold Server (Google DeepMind & Isomorphic Labs) szerkezetjóló alkalmazás segítségével végeztük. A szerver legújabb 3-as verziója lehetővé teszi különböző biomolekulák ionok jelenlétében kialakuló komplexének modellezését. A bekért aminosav (UniProt: Q8DTF1 alapján) és aptamer nukleinsav-szekvenciák, valamint a szelekció és a kölcsönhatás vizsgálatok során is jelen lévő Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- ionok megadása után a kapott eredményeket értékeltük, és PyMOL (v3.1) segédprogrammal elemeztük.

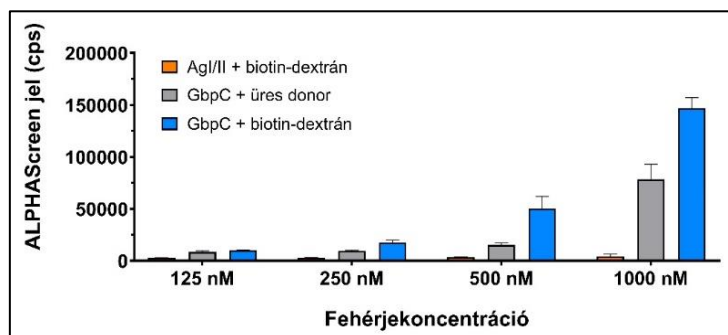
4. Eredmények

4.1. A GbpC előállítása és funkcionális vizsgálata

Az aptamerszelekcióhoz és az azt követő kölcsönhatás vizsgálatokhoz választott GbpC célmolekulát *E. coli* alapú autoindukciós fehérjeexpressziós rendszerben termeltettük. Az indukálás után a fehérjét hatékonyan tisztítottuk affinitáskromatográfiás módszerrel, és a sejtekből történt izolálást követő SDS-PAGE elválasztás után nagy mennyiségben, minimális degradációval detektáltuk (3. ábra). A GbpC dextránkötő képességét, így a funkcionális térszerkezetét egyértelműen igazolták ALPHA eredményeink (4. ábra).



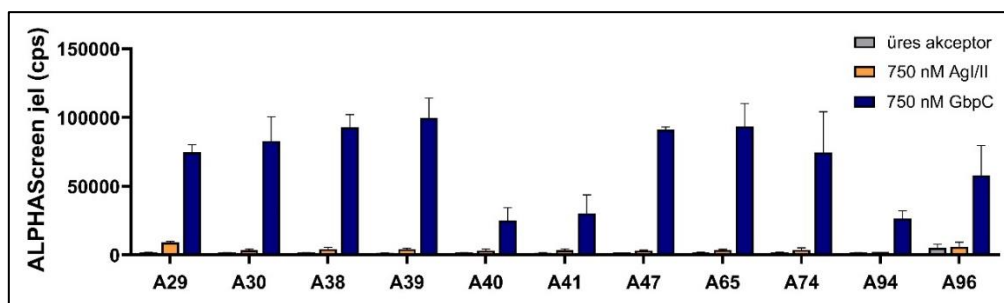
3. ábra: A GbpC tisztítása. A fehérjetisztítás egyes frakcióit 12%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélben, 1xLaemmli pufferben választottuk el. Az elválasztás után a fehérjét Coomassie-festéssel (bal) és Western blot technikával (jobb) tettük láthatóvá. M: Fehérje marker; 1-4: GbpC (nyíl) indukálás előtt, indukálás után, affinitástisztítás után, puffercsere után.



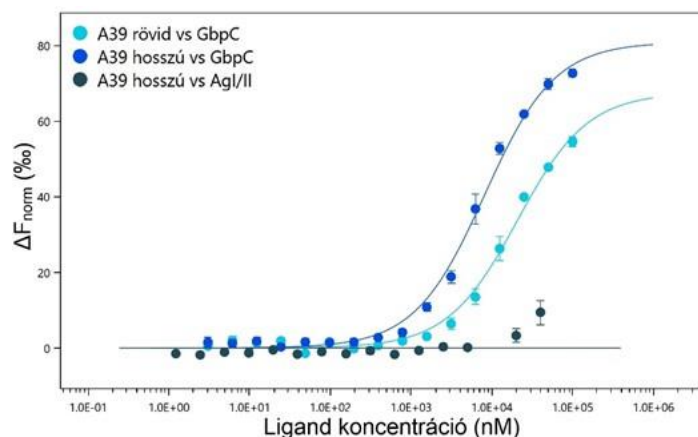
4. ábra: A fehérjék dextránkötő-képességének vizsgálata ALPHA-val. A GbpC, valamint AgI/II fehérjék kölcsönhatását 15 nM biotinilált dextránnal szemben 0,1 mg/ml mucinnal kiegészített ASB-ben mértük. A Ni^{2+} -nal konjugált akceptor gyöngyök által generált kemilumineszcens jelet EnSpire készülékkel detektáltunk.

4.2. GbpC specifikus aptamerek szelekciója és karakterizálása

A nukleinsav-szekvenálási eredmények elemzése során 42 egyedi nukleinsav-szekvenciát azonosítottunk. Ebből 6 (A32, A41, A49, A55, A57, A75) kétszer, 1 (A10) hatszor fordult elő. Az előszűrési kísérletek alapján 11 legjobbnak bizonyult aptamerjelölt specifikusan kötődött a GbpC célmolekulához, míg a kontraszelekciós célpontként választott AgI/II iránt nem mutatott affinitást (5. ábra), ami a SELEX eljárásunk jól tervezettségét igazolja. Az MST eredmények szerint a kapott K_D értékek a primerrégiók hiányában az A39 esetén 8,09 μM -ról 19,6 μM -ra (6. ábra), az A96 esetén 8,50 μM -ról 66,9 μM -ra nőttek, ami a primerrégiók jelenlétének fontosságát jelzik az aptamerek GbpC-vel kialakított kölcsönhatásában.



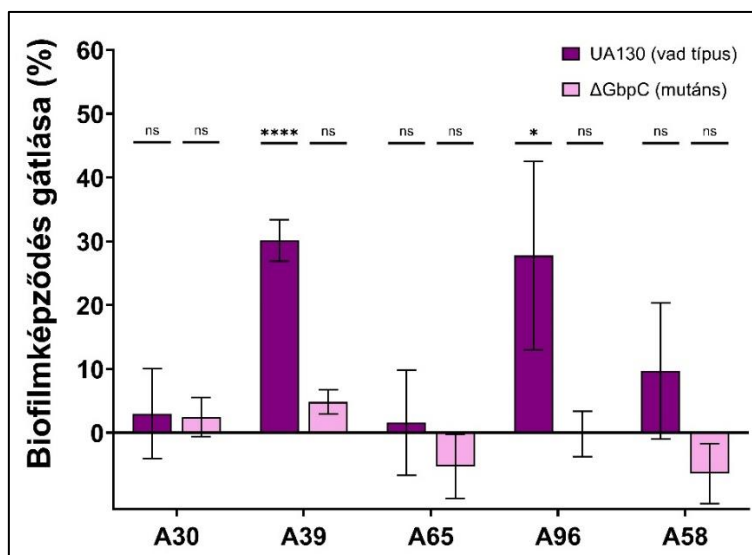
5. ábra: A 11 legjobban kötődő aptamer specifikusság vizsgálata ALPHA-val. A GbpC (kék), AgI/II (narancs) és fehérje nélküli kontroll (szürke) kölcsönhatásokat PBA-PCR-rel előállított aptamerekkel szemben mértük. A Ni^{2+} -nal konjugált akceptor gyöngyök által generált kemilumineszcens jelet EnSpire készülékkel detektáltunk.



6. ábra: Az A39 aptamer affinitásának vizsgálata MST-vel. A GbpC és AgI/II fehérjékkel szemben mértük az aptamer hosszú és primerrégiók nélküli rövid változatának kölcsönhatását Monolith készülékkel. A telítési görbe inflexiós pontjához tartozó fehérjekoncentráció érték az adott kölcsönhatást jellemző disszociációs állandó (K_D) értékét adja meg.

4.3. Aptamerek biofilmgátló hatása

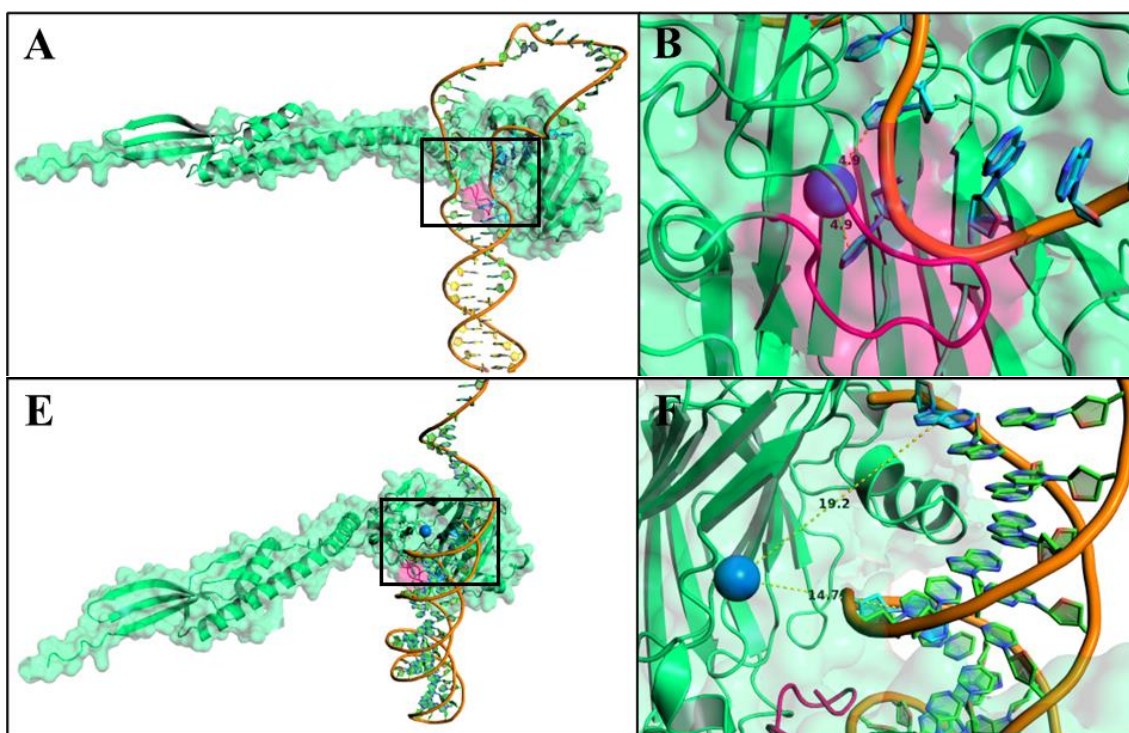
A biofilm gátlási kísérletekhez a GbpC iránt négy jól (A30, A39, A65, A96) és egy gyengén (A58) kötődő aptamert választottunk, majd a biofilm festési protokollt követően a mért abszorbancia értékeket a kezeltlen mintáéhoz viszonyítottuk (7. ábra). A normalizált eredmények alapján megfigyeltük, hogy az A39 és A96 – a kölcsönhatás vizsgálatokban legjobban teljesítő – aptamerek számottevően, csaknem 30%-kal csökkentették a vad típusú *S. mutans* biofilm mennyiségét, ezzel szemben az A30, A65 és A58 aptamerek nem mutattak szignifikáns gátló hatást. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy az aptamerek az előbbiektől eltérő GbpC-kötőhelyekre szelektálódtak. Kiemelendő, hogy a Δ GbpC mutáns törzs kezelése során egyik aptamernek sem volt szignifikáns gátló hatása a biofilmképződésre, ami a kiválasztott aptamerek nagyfokú specifikusságát jelzi.



7. ábra: Az aptamerek hatása a biofilmképződésre. Biofilmképző tápoldatban növesztett *S. mutans* vad típusú vagy GbpC-hiányos törzsekhez aptamereket adtunk, majd kristályibolyával végzett festés után a biofilm mennyiségével arányos abszorbanciát ClarioStar készülékkel mértük. Az A39 és A96 aptamerek közel 30%-kal csökkentették a biofilm mennyiségét a kezeltlen mintákhoz képest. ([ns]: nem szignifikáns; [*]: $p < 0,05$; [****]: $p < 0,0001$)

4.4. GbpC-aptamer prediktált komplexei

Az A39 aptamer-GbpC komplex térszerkezeti predikciójából kitűnt, hogy az aptamer egy szakasza a GbpC Ca^{2+} -kötőhelyéhez közel alakít ki kapcsolatot a fehérjével (8/A,B ábra). A kalciumion kötése a feltételezett glükánkötő zsebben történik, ebből fakadóan az aptamer közelsége ehhez a régióhoz potenciálisan hozzájárul a biofilmgátló hatás kialakulásához. Megvizsgálva az A30-GbpC komplex prediktált térszerkezetét is, azt találtuk, hogy ez esetben az aptamer a glükánkötő zseben kívül és a Ca^{2+} -kötőhelytől távolabb helyezkedik el (8/E,F ábra). Habár méréseink alapján az A30 is specifikus és jó affinitást mutató aptamer, a biofilm képződésére nem volt hatással, amit alátámasztani látszik a glükánkötő zsebtől becsült távolabbi pozíciója. Ez összhangban van sejtésünkkel, miszerint az A30 aptamer kölcsönhatásban résztvevő DNS-szakasza a GbpC vélhetően más epitópjához kötődik.



8. ábra: A GbpC-aptamer komplexek prediktált térszerkezete. Az aptamerek (narancs) közül az A39 (A), valamint az A30 (E) GbpC-vel (zöld) alkotott közös komplexét ábrázoltuk. A kinagyított régiókban (keretezett) a glükánkötő zsebet fedő hurokstruktúra (magenta) közelében található Ca^{2+} (kék) és az aptamerbázisok közötti legrövidebb becsült távolságokat jelöltük, amik az A39 (B) esetén rendre 4.9 Å, míg az A30 (F) esetén 14.7-19.2 Å közé estek. A predikciókat AlphaFold 3-mal készítettük és a kapott szerkezeteket PyMol (v3.1) programmal vizualizáltuk.

5. Következtetések

Munkám során célunk olyan DNS aptamerek előállítása és vizsgálata volt, amelyek alkalmasak lehetnek a *Streptococcus mutans* GbpC-hez kötődve a biofilmképződést specifikusan gátolni. Eredményeink alapján az alábbi megállapítások tehetők:

1. A GbpC bakteriális sejtfelszíni fehérje ideális célpont mesterséges nyálpufferben végzett aptamerszelekciók kivitelezésére.
2. A munkacsoportunkban továbbfejlesztett PBA-PCR-rel kombinált ALPHAScreen technika alternatívát nyújt az aptamerjelöltek gyors és hatékony előállítására és affinitásuk vizsgálatára. A technika alkalmazásával azonosítottuk a SELEX után kapott jól kötő aptamerjelölteket, amiket további karakterizálás után használhattunk biofilmképződés gátlásra.
3. A szelektált aptamerekkel a GbpC célmolekulát az azzal jelentős homológiát mutató Antigen I/II-vel szemben is nagy szelektivitással ki tudtuk mutatni, ami az alkalmazott SELEX eljárásunk lépéseinek jól tervezettségét igazolja.
4. A szelektív aptamerek a GbpC természetes ligandját reprezentáló dextránnal összemérhető affinitást mutattak a célmolekula iránt, ami lehetőséget ad a fehérje glükánkötésének aptamerekkel történő gátlására.
5. Az MST eredmények fényében elmondható, hogy a vizsgált aptamerek GbpC-re specifikus térszerkezetük kialakításához szükséges a vizsgált aptamerek primer régióinak jelenléte.
6. Az inhibitorhatású aptamerek összetett tápoldatban a vad típusú *S. mutans* sejtek biofilmjét szignifikáns mértékben csökkentették, míg a GbpC-hiányos *S. mutans* sejtek biofilmképződésére nem voltak ilyen hatással.
7. A specifikus aptamerek közül nem mindegyik szekvencia mutatott biofilmképződést gátló hatást a *S. mutans* vad típusú sejtekkel, ami valószínűsíthetően az aptamerek eltérő GbpC-epitópokhoz való kötődésével magyarázható.

Összegezve, szelektált aptamereink ígéretes jelöltjei lehetnek a dentális plakk minimalizálását célzó újabb fejlesztéseknek. Továbbá, reményeink szerint az általunk bemutatott aptamerszelekciós stratégia, kiegészülve a modern bioinformatika adta eszközökkel szélesebb körben is értékesnek bizonyulhat, és hozzájárulhat számos orvosiilag releváns aptameralapú terápia kidolgozásához.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Ákos Harkai, Yoon Kee Beck, Anna Tory, Tamás Mészáros. (2025) Selection of streptococcal glucan-binding protein C specific DNA aptamers to inhibit biofilm formation. International Journal of Biological Macromolecules, 288, 138579, 12p.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138579>

IF: 8,5 (D1)

Krisztina Percze, **Ákos Harkai**, Tamás Mészáros. (2024) A Cost-Effective Approach for Single-Stranded DNA Amplification Using Primer-Blocked Asymmetric PCR. Current Protocols, 4 (9) e1125, 21p.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.1125>

IF: 2,2 (D1)

Egyéb közlemények:

Zoltán Tolnai, **Ákos Harkai**, Zsuzsanna Szeitner, Éva Nagyné Scholz, Krisztina Percze, Anna Gyurkovics, Tamás Mészáros. (2019) A simple modification increases specificity and efficiency of asymmetric PCR. Analytica Chimica Acta, 1047, 225–230.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.017>

IF: 5,977 (Q1)