Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie

Kamila Bláhová

Vývoj nové metody pro *in vitro* selekci DNA aptamerů
Development of the new method for *in vitro* selection of DNA aptamers

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Míšek, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.1.2022

Abstrakt

Aptamery jsou krátké sekvence jednovláknové DNA či RNA, které jsou schopné specificky vázat různé molekuly (léčiva, lipidy, cukry, proteiny atd.). Tyto aptamery se izolují z rozsáhlých knihoven náhodných sekvencí oligonukleotidů pomocí metody SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) neboli *in vitro* selekce (dále jen *in vitro* selekce). Přes úspěšnost této metody, *in vitro* selekce často vyžaduje více než deset kol afinitní selekce a taktéž optimalizaci podmínek selekce. Pro zvýšení účinnosti selekce aptamerů bylo vyvinuto několik metod, které využívají zvýšení počtu sekundárních struktur v náhodných knihovnách oligonukleotidů. Tyto metody, založené na zvýšení možnosti kanonického párování bází v jednovláknových oligonukleotidech, zvýšily efektivitu metody *in vitro* selekce. V této práci bylo testováno, jestli zvýšení pravděpodobnosti výskytu G-kvadruplexů, jako strukturních motivů v náhodných sekvencích, povede ke zvýšení efektivity selekce aptamerů. Byly použity čtyři knihovny jednovláknové DNA s rozdílným počtem guaninu (25 %, 35 %, 45 %, 55 %) v náhodné sekvenci. Jako modelová molekula pro selekci byl zvolen streptavidin, vůči kterému již bylo dříve vyselektováno několik aptamerů, které nejsou bohaté na guanin (G). Předběžné výsledky naznačují, že G-bohaté knihovny nezvyšují efektivitu *in vitro* selekce přinejmenším u molekul, které nepreferují G-bohaté aptamery.

Klíčová slova: DNA aptamery, *in vitro*, G-kvadruplex

Abstract

Aptamers are short sequences of single-stranded DNA or RNA that are able to specifically bind various molecules (drugs, lipids, sugars, proteins, etc.). These aptamers are isolated from large libraries of random oligonucleotide sequences by SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Component Enrichment) or *in vitro* selection. Despite the success of this method, *in vitro* selection often requires more than ten rounds of affinity selection as well as optimization of selection conditions. To increase the efficiency of aptamer selection, several methods have been developed that use an increase in the number of secondary structures in random oligonucleotide libraries. These methods, based on increasing the possibility of canonical base pairing in single-stranded oligonucleotides, increased the efficiency of the *in vitro* selection method. In this work, it was tested whether increasing the probability of occurrence of G-quadruplexes, as structural motifs in random sequences, will lead to increased efficiency of aptamer selection. Four single-stranded DNA libraries with different numbers of guanine (25 %, 35 %, 45 %, 55 %) in a random sequence were used. Streptavidin was chosen as the model molecule for selection, against which several aptamers that are not rich in guanine (G) have previously been selected. Preliminary results suggest that G-rich libraries do not increase the efficiency of *in vitro* selection, at least for molecules that do not prefer G-rich aptamers.

Keywords: DNA aptamers, *in vitro* selection, G-quadruplex

Poděkování

Ráda bych poděkovala především mému vedoucímu práce RNDr. Jiřímu Míškovi, Ph.D., za ochotu, trpělivost a odborné vedení při teoretické i experimentální části bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia.

1 Obsah

Abstrakt ... 3
Abstract ... 4
Seznam použitých zkratek: ... 7
2 Úvod ... 8
2.1 Sekundární struktury ssDNA a ssRNA ... 9
2.2 Knihovny oligonukleotidů pro *in vitro* selekci ... 11
2.3 Náhodné oblasti a zavedení sekundárních struktur do knihoven ... 12
3 Cíl bakalářské práce ... 17
4 Materiál a metody ... 18
4.1 Použité chemikálie ... 18
4.2 Použité přístroje ... 19
4.3 Použité metody ... 21
4.3.1 *In vitro* selekce ... 21
4.3.2 PCR amplifikace ... 22
4.3.3 Horizontální gelová elektroforéza ... 23
4.3.4 Izolace ssDNA ... 23
4.3.5 Štěpení DNA pomocí endonukleáz specifických pro jednotlivé knihovny ... 24
5 Výsledky a diskuse ... 25
5.1 Testování předpojatosti knihoven k amplifikaci pomocí PCR ... 25
5.2 *In vitro* selekce pomocí směsi knihoven ... 28
5.3 Evaluace *in vitro* selekce po deseti kolech ... 30
5.4 Vyhodnocení funkčnosti knihoven při *in vitro* selekci ... 31
6 Závěr ... 34
Seznam použité literatury ... 35

Seznam použitých zkratek:

A – adenin

bp – párů bází (z angl. base pairs)

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)

C – cytosin

cDNA – komplementární DNA

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

EMA – Evropská agentura pro léčivé přípravky (z angl. European Medicines Agency)

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)

G – guanin

G4 – G-kvartet

mRNA – messengerová RNA

nt – nukleotid

PBS – fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)

PBSM – fosfátový pufr s chloridem hořečnatým

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

RE – restrikční endokleasa/-asy

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)

RT-PCR – reverzní PCR (z angl. reverse transcription PCR)

SELEX – systematická evoluce ligandů exponenciálním obohacením (z angl. systematic evolution of ligands by exponential enrichment)

siRNA – short interfering RNA

ssDNA – jednovláknová DNA (z angl. single-stranded deoxyribonucleic acid)

ssRNA – jednovláknová RNA (angl. single-stranded ribonucleic acid)

T – thymin

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor

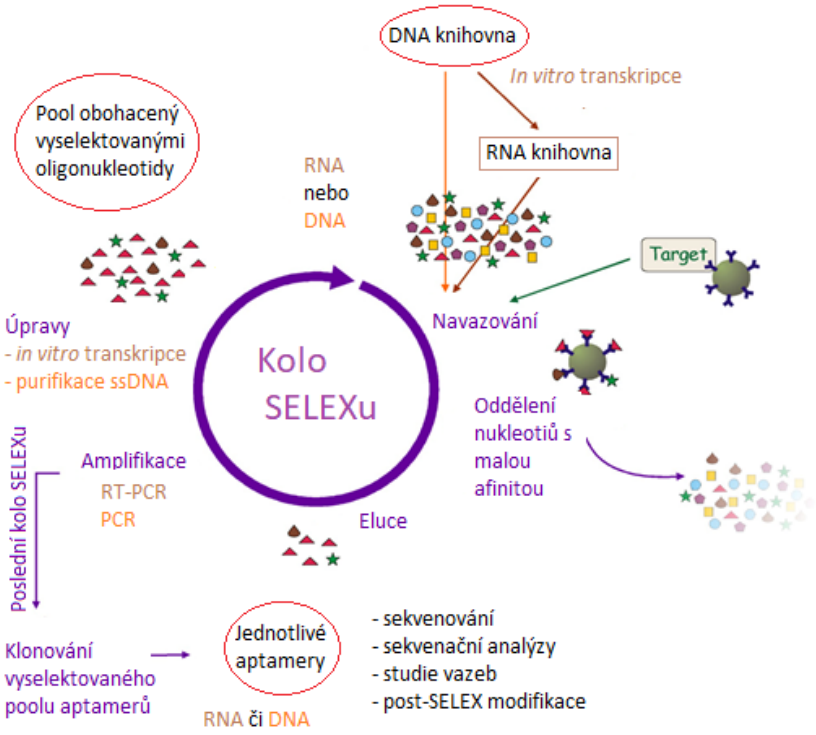
2 Úvod

Slovo aptamer je odvozen z latinského slova „aptus“, což znamená „přizpůsobit se“, a řeckého slova „meros“, což znamená „část“ [1]. Aptamery jsou krátké oligonukleotidy (jednovláknová DNA (ssDNA) nebo RNA (ssRNA) obvykle dlouhé 20 až 60 nt) [2], které jsou schopny specificky vázat nějaký ligand (protein, malá molekula atd.) Aptamery jsou obvykle produkovány tzv. *in vitro* selekcí neboli SELEX metodou, která využívá rozsáhlých syntetických knihoven oligonukleotidů s náhodnými sekvencemi. Při selekci dochází k exponenciálnímu nárůstu selektovaných aptamerů [3]. Tuto metodu (*Obr. 1*, str. 9) nezávisle na sobě poprvé popsali Tuerk s Goldem [4] a Szostak s Ellingtonem v roce 1990 [5]. Tuerk a Gold nalezli ssRNA aptamer, který by se specificky vázal na T4 DNA polymerázu [4]. Szostak a Ellington objevili ssRNA aptamery, které měli vysokou afinitu k molekulám barviv, které byly podobné metabolickým kofaktorům [5]. O dva roky později Szostak s Ellingtonem popsali metodu selekce s ssDNA aptamery. Největší výhodou ssDNA aptamerů oproti ssRNA je jejich větší stabilita (vůči nukleázám a hydrolýze) [6]. Naopak ssRNA aptamery mohou být geneticky kódovány a použity v *in vivo* experimentech [7].

V roce 2002 byly nalezeny přirozené aptamery v tzv. riboswitchích [8]. Riboswitche jsou protein nekódující RNA, které na sebe váží různé ligandy (např. metabolity, ionty) a mohou regulovat transkripci, translaci, sestřih a také degradaci mRNA v závislosti na vazbě ligandu [9,10]. Vazba ligandu v riboswitchích je zprostředkována právě molekulou aptameru.

Schopnost specifické vazby aptameru na ligand se využívá v mnoha oblastech. Své uplatnění našly v biotechnologiích, medicíně, farmakologii, mikrobiologii a analytické chemii včetně vývoje biosenzorů (aptasenzorů) a chromatografické separace [11,12]. Teoreticky lze aptamer získat pro jakoukoliv molekulu. Navíc jsou poměrně malé (8 – 15 kDa) ve srovnání s protilátkami (50–100 kDa) a při tom stále vykazují vysokou specifitu a afinitu ke svému cíli [13]. Dosud byly úspěšně vyvinuty specifické aptamery proti mnoha cílům, včetně malých anorganických iontů, léčiv, organických peptidů, proteinů a proti buňkám nebo tkáním [3]. První a zatím jediný terapeutický aptamer schválený v roce 2004 byl Macugen (pegaptanib). Jedná se o RNA aptamer který, blokuje vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF165, jehož nadměrná produkce způsobuje poškození centrální oblasti sítnice (žluté skvrny) [14,15]. Dále lze uvést Quarfloxin, který první léčivo třídy G-kvadruplexu, jenž dosáhl klinických studií fáze 2. Jedná se o potenciální

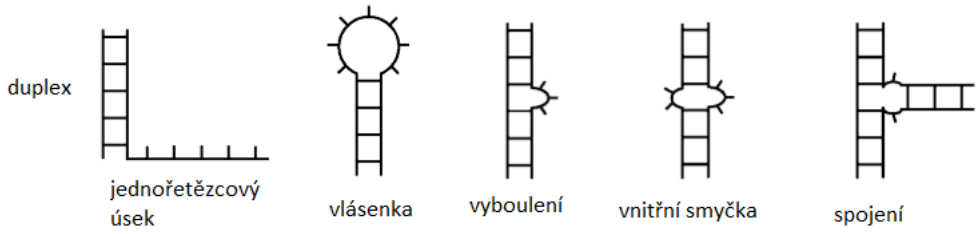
protinádorovou látku, která vykazuje nízkou cytotoxicitu [16]. Zvyšující se počet schválených terapeutik na bázi nukleových kyselin ukazuje vysoký potenciál jejich využití k léčbě nemocí. Celkově bylo k červnu 2021 schváleno (FDA, EMA) dvacet oligonukleotidových léčiv (jsou mezi nimi například i mRNA vakcíny, cílené na spike protein SARS-CoV-2, Comirnaty a mRNA-127) [17].



Obr. 1: Průběh *in vitro* selekce aptamerů pomocí metody SELEX. Obrázek byl přebrán a upraven z [18].

2.1 Sekundární struktury ssDNA a ssRNA

Jednovláknová DNA a RNA mohou tvořit stabilní sekundární struktury, které jsou klíčovou vlastností většiny aptamerů. Nejčastější sekundární strukturální prvky jednovláknových oligonukleotidů jsou vlásenky, vyboulení, vnitřní smyčky a spojení (*Obr. 2*, str. 10). Terciární struktura určuje její biochemickou aktivitu [2].

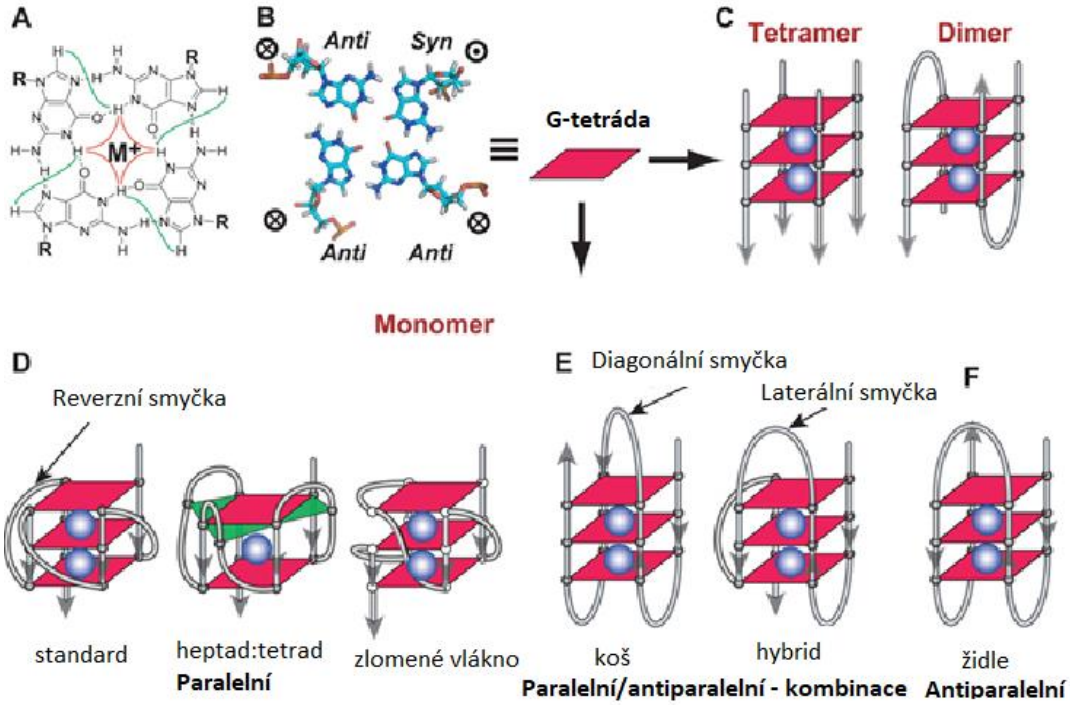


Obr. 2: Příklady častých sekundárních struktur jednovláknových oligonukleotidů [2].

Sekundární struktury spolu asociují a pomocí kanonického a nekanonického Watson-Crickovského párování bází, van der Waalsových interakcí a vodíkových můstků, tvoří terciární struktury [2].

Další jedinečnou třídu sekundárních struktur nukleových kyselin vytvořených oligonukleotidy bohatými na G jsou tzv. G-kvadruplexy. G-kvadruplexy se mohou v roztoku skládat za fyziologických podmínek [1,19,20]. G-kvadruplexy jsou tvořeny z patrově naskládaných G-kvartetů (G-tetrád). G-tetráda je planární útvar čtyř guaninových bází spojených Hoogsteenovou vodíkovou vazbou (*Obr. 3* A – B, str. 11) [19,20]. Tvorba a stabilizace G-kvadruplexů závisí na monovalentních kationtech, konkrétně na K^+ a Na^+, kde K^+ je považován za fyziologicky relevantnější vzhledem k jeho vysoké intracelulární koncentraci (140 mM) proti Na^+ (10 mM) [16]. Stabilizace je způsobena koordinací pozitivně nabitých kationtů s elektronegativními atomy kyslíku ve středním kanálu sousedních skládaných G-tetrád (*Obr.3* A – B, str. 11) [16,20]. Stabilita struktury G4 závisí na mnoha faktorech, včetně délky a sekvenčního složení celkového motivu G4, velikosti smyček (obvykle 1 – 7 nt) mezi guaniny, stechiometrií vlákna, zarovnání, povaha vazebných kationtů [19] a interakce π - π mezi guaniny v sousedních rovinách [20].

Struktury G-kvadruplexů jsou určovány primárními nukleotidovými sekvencemi. Určitá sekvence bohatá na G může zaujímat různé G-kvadruplexní struktury v přítomnosti různých kationtů a může se tak skládat do více než jedné konformace [16]. Struktury G4 přijímají různé topologie a mohou být klasifikovány do různých skupin v závislosti na orientaci řetězců DNA (*Obr. 3,* str. 11). G4 struktury tedy mohou být rovnoběžné, antiparalelní nebo jejich hybridy. Kromě toho se mohou tvořit v jednom řetězci (intramolekulární) nebo z více řetězců (intermolekulární) a smyčky mohou zaujímat různé struktury [19].



Obr. 3: Struktury G-kvadruplexů: A – rovinný G-kvartet; B – guaniny z paralelních G-traktů mají Na G-tetrádách stejnou glykosidickou konformaci. U antipalelních G-traktů mají rozdílnou glykosidickou konformaci; C – F – ukázka některých objevených struktur G-kvadruplexů [16].

V závislosti na jejich chemické povaze, délce smyček a lokalizaci v sekvenční nebo strukturní molekule mohou tedy jsou G-kvadruplexy tvořit vysoce polymorfní struktury vykazující různé skládací topologie. V lidském genomu velmi pravděpodobně hrají klíčovou roli v regulaci mnoha biologických procesů (replikace, transkripce a translace) [1,19]

2.2 Knihovny oligonukleotidů pro *in vitro* selekci

Obecně má protokol *in vitro* selekce tyto hlavní kroky: inkubace oligonukleotidové knihovny s cílovou molekulou, oddělení aptamerů s malou afinitou k cílové molekule, eluce navázaných aptamerů, amplifikace pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) a následná izolace jednovláknového oligonukleotidu (*Obr. 1*, str. 9). Kola *in vitro* selekce jsou opakována (10 – 15×) pro dostatečné obohacení knihovny aptamery s vysokou afinitou k cílové molekule. Jsou-li známy vlastnosti cílové molekuly, je dobré před zahájením *in vitro* selekce přizpůsobit parametry knihovny. Výběr knihovny je důležitý pro nalezení co možná nejlepších aptamerů [4,5].

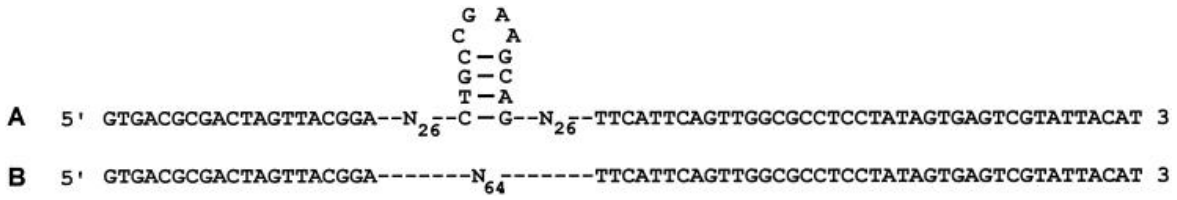
K získání co nejlepších aptamerů je důležité zvolit vhodnou metodu *in vitro* selekce i počáteční knihovnu. Mělo by být zváženo několik klíčových parametrů, jako je délka náhodné oblasti, začlenění modifikovaných nukleotidů a náhodný typ souboru

oligonukleotidů. Dále je dobré zohlednit vlastnosti cíle, konečné použití aptameru, význam pokrytí maximálního sekvenčního prostoru, nutnost zavedení určité sekvence (např. známé sekvence pro primery, nukleázy) nebo strukturního prvku (*Obr. 2*, str. 10) [3].

2.3 Náhodné oblasti a zavedení sekundárních struktur do knihoven

Obecně se délka náhodné oblasti v knihovnách pohybuje obvykle mezi 30 a 50 nukleotidy. Pro některé speciální cílové molekuly, pro které je těžké získat aptamery s vysokou afinitou a specifitou, se zvyšuje délka náhodné oblasti na 100–200 nukleotidů. Delší náhodné sekvence mohou tvořit složitější trojrozměrné struktury a vazebná místa, což zlepšuje různorodost aptamerového fondu a pravděpodobnost generování vysoce afinitních aptamerů [3]. Diverzita počátečních knihoven používaných při *in vitro* selekci se obvykle pohybuje okolo 10^{14} různých náhodných sekvencí. Aptamery s vysokou afinitou k cílové molekule tvoří stabilní sekundární/terciární struktury, které umožňují oligonukleotidům fungovat jako efektivní receptory [6]. Lze tedy předpokládat, že zvýšením výskytu stabilních sekundárních/terciárních struktur v náhodných knihovnách oligonukleotidů by mohlo vést k zefektivnění a urychlení metody *in vitro* selekce.

V roce 2002 Davis a Szostak popsali experiment s částečně strukturovanými aptamery [21]. Porovnávali afinitu plně náhodné RNA knihovny s částečně strukturovanou RNA knihovnou, které obsahovala předem navrženou strukturu (stabilní smyčka se středem v náhodné sekvenci, *Obr. 4*, str. 13). Předpokládali, že částečně strukturovaná knihovna bude při selekci aptamerů vůči GTP jako cílové molekule více úspěšná než náhodná knihovna, a to právě kvůli zvýšenému výskytu stabilních sekundárních struktur. Pravděpodobnost výskytů aptamerů s vysokou afinitou ke GTP je v náhodné knihovně velmi malá. Tyto dvě knihovny byly smíchány v poměru 1:1 a provedena selekce na molekulu GTP. Po 10 kolech *in vitro* selekce bylo zjištěno, že většina aptamerů s nejvyšší afinitou ke GTP pochází z částečně strukturované knihovny. Zavedení struktury tedy zvýšilo funkční potenciál knihovny. Jistou nevýhodou tohoto přístupu může být menší variabilita struktur v počáteční knihovně [21].



Obr. 4: Počáteční knihovny (A, B) použité v experimentu Davise a Szostaka. Obě knihovny obsahovali 124 bází, na 3´ a 5´-koncích jsou sekvence kompatibilní s příslušnými primery a T7 promotor. **A** značí knihovnu se zavedenou stabilní smyčkou (12 nt). Smyčka je z obou stran obklopena 26 náhodnými bázemi (N). **B** zobrazuje knihovnu s oblastí náhodné sekvence (64 nt) [21].

V návaznosti na tento experiment vyšel v roce 2010 článek, ve kterém autoři popisují vztah mezi stupněm sekundární struktury aptameru a funkčním potenciálem knihovny [22]. Na rozdíl od Davise a Szostaka do knihovny záměrně neumísťovali žádné specifické sekundární struktury. Pro experiment navrhli knihovny (*Obr. 5*, str. 14), které měly různé stupně předpovídané průměrné sekundární struktury. Výsledné knihovny pojmenovali jako „knihovnu RY“ a „knihovnu R*Y*“. V knihovně se střídaly oblasti obsahující sekvence RYRYRY… (nebo R*Y*R*Y*…) se sekvencemi s náhodným pořadím bází. Střídání těchto sekvencí zvýšilo pravděpodobnost Watson-Crickovského párování a utvoření rozmanitých sekundárních struktur v oligonukleotidech. Úseky R v „knihovně RY“ značí puriny a Y pyrimidiny. „Knihovna R*Y*“ se od „knihovny RY“ složením příliš nelišila. Oblast R* je nukleotidová směs, která obsahuje převážně puriny s nízkým obohacením pyrimidinů. V oblasti Y* jsou zase převládají pyrimidiny a puriny jsou zastoupeny v malém počtu. Navržená „knihovna R*Y*“ má díky tomuto zavedení nukleových bází oproti „knihovně RY“ výhodu ve vyšší rozmanitosti sekundárních struktur. Takto upravené knihovny byly použity k *in vitro* selekci (9 – 10 kol) pro tři různé cílové molekuly (streptavidin, IgE, VEGF). Výsledky byly takové, že aptamery z „knihovny R*Y*“ měly v porovnání s náhodnou knihovnou (N_{60}) vždy větší zastoupení aptamerů v selektovaném poolu (streptavidin 6×, IgE 10× a VEGF 1,3×). „Knihovna RY“ byla ze všech knihoven nejméně konkurenceschopná kvůli její malé strukturní flexibilitě [22]. Lze tedy konstatovat, že zvýšení strukturního potenciálu počátečních knihoven vede též ke zvýšení funkčního potenciálu při *in vitro* selekci.

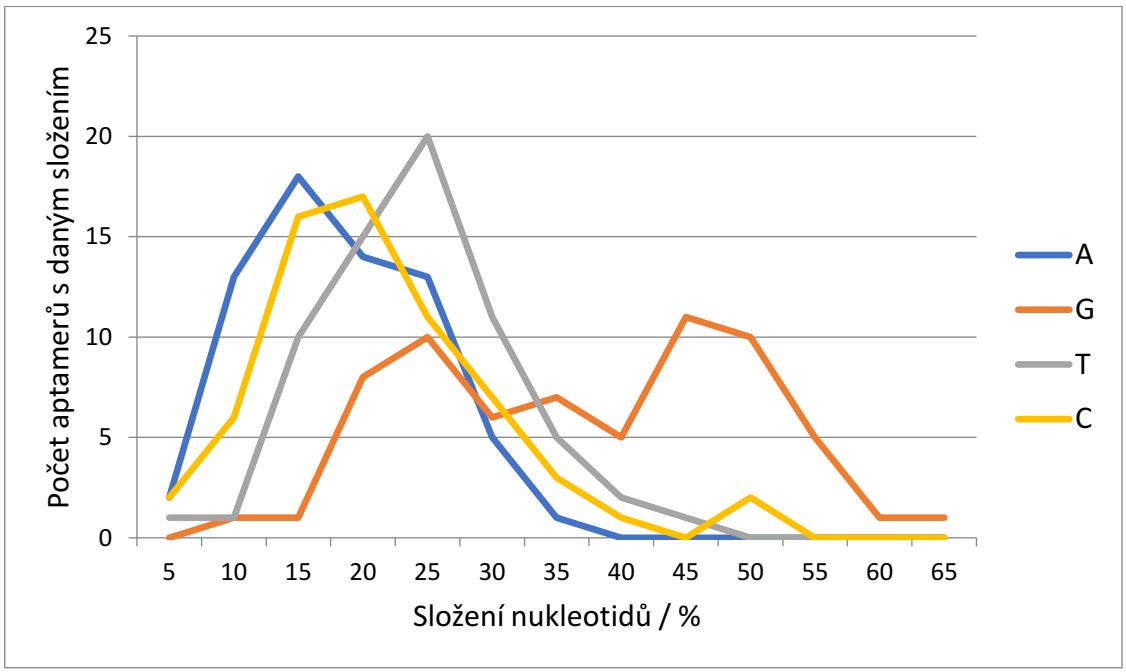
N_{60} = PBS-tag_1-$(NNNNN\text{-}NNNNN)_6$-PBS

R*Y* = PBS-tag_2-$(R'Y')_4N_4\,(R'Y')_5N_3\,(R'Y')_8N_4\,(R'Y')_5N_3\,(R'Y')_4$-PBS

RY = PBS-tag_3-$(RY)_4N_4\,(RY)_5N_3\,(RY)_8N_4\,(RY)_5N_3\,(RY)_4$-PBS

Obr. 5: Tři použité knihovny použité ve výše uvedeném experimentu. Kde N značí náhodný nukleotid; R* (45 : 5: 45 : 5), Y* (5 : 45 : 5 : 45) , R (50 : 0 : 50 : 0)
a Y (0 : 50 : 0 : 50) jsou poměry bází A : C : G : T v sekvenci [22].

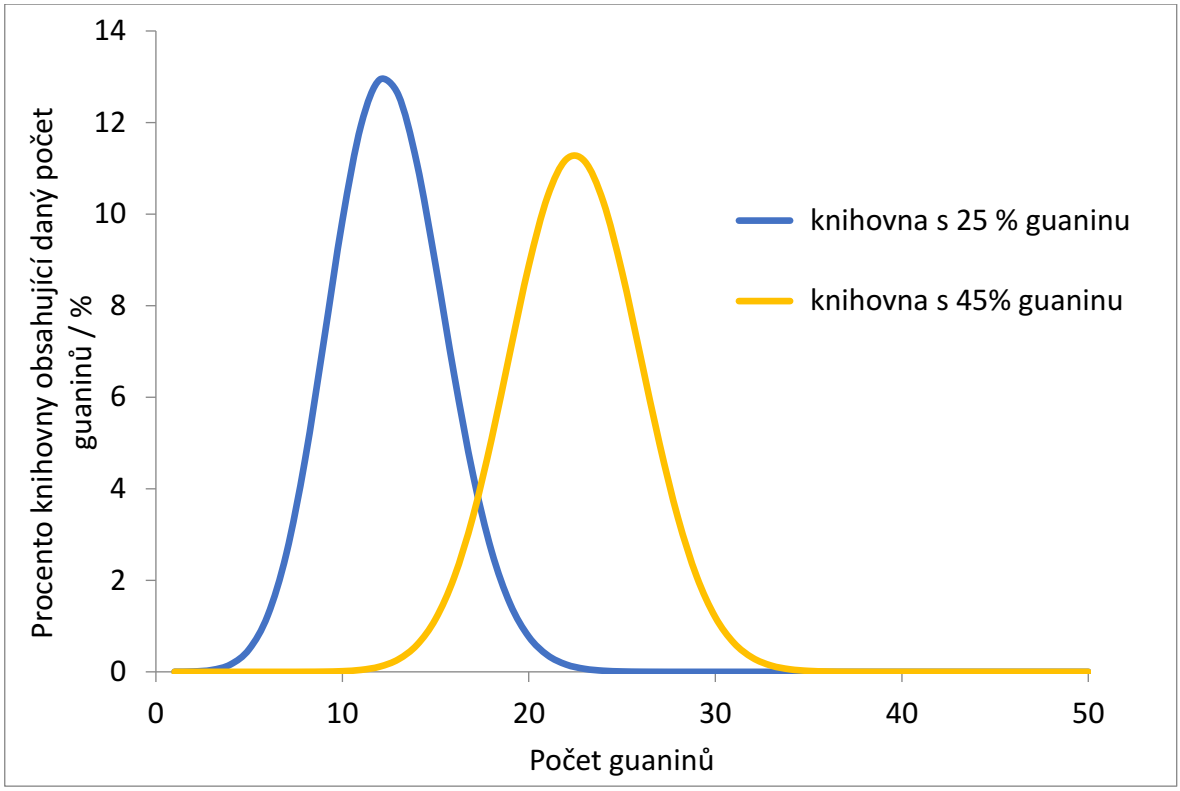
V naší laboratoři byla provedena analýza sekvencí všech dostupných DNA aptamerů s ohledem na jejich nukleotidové složení (*Obr. 6*) [23]. V tomto grafu je nápadný fakt, že zhruba polovina všech DNA aptamerů selektovaných vůči různým cílovým molekulám má vysoký podíl guaninu (cca 45 %). Detailní analýza jednotlivých G-bohatých aptamerů ukázala, že u těchto sekvencí nelze formulovat stabilní sekundární struktury na základě Watson-Crickovského párování bází. Lze tedy předpokládat, že stabilní sekundární struktury u těchto aptamerů jsou tvořeny G-kvadruplexy.



Obr. 6: Graf závislosti počtu aptamerů na složení nukleotidů podle jednotlivých bází.

Jelikož valná většina všech počátečních knihoven použitých pro *in vitro* selekci DNA aptamerů používá náhodné zastoupení všech čtyř bází, je zastoupení G-bohatých aptamerů (> 40 %) v těchto knihovnách velice nízké (*Obr. 7*, str. 15). Tento fakt vedl k hypotéze, že

použití počátečních knihoven s vyšším zastoupením guaninu by mohlo zvýšit funkční potenciál a efektivitu *in vitro* selekce podobně jako je tomu u zmíněných částečně strukturovaných knihoven.



Obr. 7: Binomické rozdělení popisující výskyt aptamerů s daným počtem guaninů v knihovnách (50 nt) s různým celkovým zastoupením guaninů. Knihovna s 25 % guaninu odpovídá běžným knihovnám s ekvimolárním zastoupením všech bází.

K ověření této hypotézy byly použity čtyři knihovny s různým procentuálním zastoupením guaninu (*Tab. 1*, str. 16). Každá knihovna měla na 5‘-konci stejné kompatibilní sekvence pro přední primer, sekvence pro specifické endonukleázy (jedinečná u každé knihovny) a na 3‘-konci byla opět kompatibilní sekvence pro zadní fosforylovaný primer. V téže tabulce jsou uvedeny sekvence použitých primerů z nichž zadní byl na 5‘-konci fosforylovaný.

Tab. 1: Přehled použitých knihoven a jejich složení, kde N_x značí náhodnou oblast o velikosti *x* nukleotidů, „Phos“ zbytek kyseliny fosforečné.

Název knihovny	Sekvence	Zastoupení bází v náhodné oblasti N = G : A : C : T
G25	5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG-GGATCC-N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	1 : 1 : 1 : 1
G35	5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG-CAGCTG-N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	35 : 22 : 22 : 22
G45	5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG-GCTAGC –N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	45 : 18 : 18 : 18
G55	5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG-CTCGAG –N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	55 : 15 : 15 : 15
Název primeru	Sekvence primeru	
Zadní fosforylovaný primer	5‘-Phos-GCGTGCGTCTTCCGGTG	
Přední primer	5‘-TGTCGCTGCGTCGCCTG	

3 Cíl bakalářské práce

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, jestli počáteční G-bohaté knihovny mohou mít vyšší funkční potenciál při *in vitro* selekci DNA aptamerů.

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

10× TBE pufr	BioRad®
10000× GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Agaróza – Molecular Biology Agarose	BioRad®
Biotin	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Deionizovaná voda	
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific
Ethanol	Lach-Ner
Přední primer (0,025 µmol, RP1) 5‘-TGTCGCTGCGTCGCCTG	Sigma-Aldrich
Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	New England Biolabs
Knihovna G25 (0,05 µmol, N = G : A : C : T 1 : 1 : 1 : 1) 5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG-GGATCC-N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	IDT DNA
Knihovna G35 (0,05 µmol, N = G : A : C : T 35 : 22 : 22 : 22) 5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG- CAGCTG-N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	Cartridge
Knihovna G45 (0,05 µmol, N = G : A : C : T, 45 : 18 : 18 : 18) 5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG- GCTAGC –N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	Cartridge
Knihovna G55 (0,05 µmol, N = G : A : C : T, 55 : 15 : 15 : 15) 5‘-Fluorescein-TGTCGCTGCGTCGCCTG- CTCGAG –N_{60}-CACCGGAAGACGCACGC	Cartridge
Λ-exonukleáza	New England Biolabs
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg)	New England Biolabs
PCR Master Mix	Thermo-Fisher Scientific

Pufr CutSmart 10× New England Biolabs

Pufr „Lambda Exonuclease Reaction Buffer (10X)“ New England Biolabs

Pufr PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_20$, 1,8 mM KH_2PO_4)

Pufr PBSM – elační (PBS, 1 mM $MgCl_2$, 0,1% BSA, 50 µM biotin)

Pufr PBSM – selekční (PBS, 1 mM $MgCl_2$, 0,1% BSA)

Pufr PBSM (PBS, 1 mM $MgCl_2$)

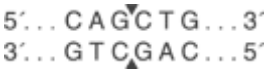
Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder New England Biolabs

Restrikční endonukleázy:

BamHI-HF® New England Biolabs

NheI-HF® New England Biolabs

PvuII-HF® New England Biolabs



XhoI New England Biolabs

Zadní fosforylovaný primer (0,025 µmol RP1) Sigma-Aldrich
5‘-Phos-GCGTGCGTCTTCCGGTG

4.2 Použité přístroje

0,5ml plastové zkumavky Eppendorf

1,5ml plastové zkumavky Eppendorf

Analytické váhy Schoeller

Automatické pipety Research plus	Eppendorf AG
Centrifuga 5418 R	Eppendorf AG
Elektroforetická vana	BioRad
Erlenmeyerova baňka	
GE Healthcare MagRack 6	Fisher Scientific s.r.o.
Hřeben na gel	BioRad
Inkubovaná třepačka s chlazením TS-100C	Biosan
Kádinky	
Lepící páska	
Míchačka	
Mikrovlnná trouba	
Navažovací papírky	
Odměrný válec	
PCR termocykler Aeri D-48x0,2ml	Esco Micro Pte Ltd
Potravinová fólie	
Předvážky AQT-600	AE ADAM
Skalpel	
Stojánky na zkumavky	
Špičky na pipety	Vertex
UV transiluminátor T-GENIUS	SYNGENE
Zdroj pro elektroforézu PowerPac HV Power Supply	BioRad

4.3 Použité metody

4.3.1 *In vitro* selekce

Příprava počáteční knihovny a selekce aptamerů pro streptavidin. Počáteční knihovna byla připravena naředěním čtyř 100 mM knihoven G25, G35, G45, G55 (10 µl, 100 mM od každé) do pufru PBSM (finální objem 290 µl).

Diverzita počáteční knihovny byla vypočtena následovně

Počáteční molární množství oligonukleotidů, n, lze vypočítat podle rovnice

$$n = c \cdot V_0, \tag{1}$$

kde c značí počáteční koncentraci knihoven a V_0 jejich objem po smíchání.

Molární množství jde vyjádřit také vztahem

$$n = N/\boldsymbol{N_a}, \tag{2}$$

kde N značí počet oligonukleotidů v poolu a $\boldsymbol{N_a}$ Avogadrovu konstantu (přibližně $6{,}022 \cdot 10^{23}$) [24].

Z rovnic (1) a (2) je možné vyjádřit vztah prvotní počet oligonukleotidů v roztoku

$$N = n \cdot \boldsymbol{N_a}. \tag{3}$$

Vzorové dosazení do rovnice (4)

$$N = n \cdot \boldsymbol{N_a} = c \cdot V_0 \cdot \boldsymbol{N_a} = 100 \cdot 10^{-3}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot (4 \cdot 10 \cdot 10^{-6})\ \text{L} \cdot 6{,}022 \cdot 10^{23}\text{mol}^{-1}$$
$$= 2{,}41 \cdot 10^{18}\ \text{nt}$$

Tato počáteční knihovna ($2{,}41 \cdot 10^{18}$ nt) byla zahřáta na 90 °C po dobu 2 min a následně zchlazena na laboratorní teplotu. Objem vzorku byl doplněn 250 µl selekčního pufru (PBSM s 0,1% BSA) na celkový objem 290 µl. 5 µl streptavidinových magnetických kuliček (Dynabeads M-270, Thermo Fisher Scientific) bylo promyto selekčním pufrem (2 × 500 µl). Separace byla provedena na stojánku s magnetem (magnetoseparace). Takto promyté kuličky byly inkubovány s roztokem počáteční knihovny po dobu 30 min za stálého míchání. Kuličky byly ze suspenze odděleny pomocí magnetoseparace a promyty selekčním pufrem (3 × 250 µl). Eluce DNA ze streptavidinových magnetických kuliček byla provedena elučním pufrem (50 µM biotin v selekčním pufru). Kuličky byly inkubovány s 50 µl

elučního pufru po dobu 15 min za stálého míchání. Supernatant byl oddělen pomocí magnetoseparace. Eluce DNA ze streptavidinových kuliček byla ještě jednou zopakována. Supernatanty s eluovanou DNA byly spojeny a vyčištěny pomocí kitu (Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit - „oligonucleotide cleanup“ návod) a DNA eluována do 20 µl („elution buffer“).

4.3.2 PCR amplifikace

Eluovaná ssDNA (20 µl) byla amplifikována pomocí PCR reakce (*Tab. 2*) v termocykleru [25]. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny níže v tabulce (*Tab. 3*). PCR reakce probíhala po dobu pětadvaceti cyklů. Po každém pátém cyklu byl odebrán vzorek (6 µl). Vzorky byly odebírány z důvodu nalezení vhodného počtu cyklů amplifikace. K zobrazení byla použita horizontální elektroforéza na agarózovém gelu. S vybraným vzorkem byla provedena PCR. Koncentrace vhodného vzorku se řádově pohybovala v nM.

Tab. 2: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci ssDNA, kde *t* značí čas a *T* teplotu.

Složky	V_{PCR1} / µl
Master Mix (*Taq* polymeráza 0,2 U/µl)	25
Vzorek ssDNA	20
dIH_2O	3
Zadní fosforylovaný primer (100 µM)	1
Přední primer (100 µM)	1
Celkový objem	50

Tab. 3: Reakční podmínky při PCR.

t / s	*T* / ºC	
60	95	
30 30 30	95 60 72	Počet cyklů 25
∞	4	

pozn.: tučně ohraničená část tabulky označuje cyklický děj

4.3.3 Horizontální gelová elektroforéza

Horizontální gelová elektroforéza byla prováděna na 2% nebo 3% agarózovém gelu v 0,5× TBE pufru (50 ml) s 2,5 µl 10 000× GelRed. Pro kvantifikaci i určení přibližné velikosti nukleotidů byl použit komerční marker (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder; 4,8 ng/µl). V případě nutnosti použití nanášecího pufru (Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS, NEB) byl použit poměr vzorek : pufr 5 : 1. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 35 – 40 min. Gel byl vizualizován v UV transiluminátoru (T-GENIUS, SYNGENE). Pro kvantifikaci byl použit program ImageJ.

4.3.4 Izolace ssDNA

Dvouvláknová DNA (1 µl) získaná po *in vitro* selekci amplifikací pomocí PCR s daným počtem cyklů byla dále amplifikována PCR (6 cyklů) s 5‘-fosforylovaným zadním primerem. Reakce byla vyčištěna pomocí kitu (Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit podle protokolu „DNA cleanup and concentration“ pro dsDNA ‹ 2 kb). Jako eluční činidlo bylo použito 20 µl dIH_2O. Koncentrace vzorku dsDNA se pohybovala okolo koncentrace 10^{-7} M. Jednovláknová DNA byla získána selektivní degradací 5‘-fosforylovaného vlákna pomocí λ-exonukleázy (*Tab. 4*).

Tab. 4: Složení reakční směsi pro izolaci ssDNA pomocí λ-exonukleázy, V značí objem.

Složky	V / µl
dsDNA	15
dIH_2O	28
10× „Lambda Exonuclease Reaction Buffer“	5
λ-exonukleáza (5 U/µl)	2
Celkový objem	50

Reakční směs byla inkubována při teplotě 37 ºC po dobu 30 min. Deaktivace λ-exonukleázy probíhala při 75 ºC po dobu 10 min. ssDNA byla z reakční směsi získána pomocí kitu (Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit - „oligonucleotide cleanup“ návod a eluována 20 µl „elution buffer“). Koncentrace ssDNA byla určena pomocí horizontální gelové (agarózové) elektroforézy s definovaným standardem ssDNA původní knihovny.

4.3.5 Štěpení DNA pomocí endonukleáz specifických pro jednotlivé knihovny

Každá ze čtyř knihoven obsahovala specifickou sekvenci pro restrikční endonukleázu (RE): G25 (*BamHI*), G35 (*PvuII*), G45 (*NheI*) a G55 (*XhoI*). Výrobce udává aktivity všech čtyř RE na 20 U/µl. Složení směsí pro reakci s restrikčními endonukleázami je uvedeno níže v tabulce (*Tab. 5*). Inkubace při 37 ºC probíhala po dobu 1 h. Za stejných podmínek reagovalo celkem šest směsí. Jako kontrola sloužila směs bez RE, další obsahovala všechny typy RE a u ostatních byl přítomen pouze jeden typ RE. Průběh štěpení DNA byl sledován pomocí horizontální gelové elektroforézy (*Obr. 12*, str. 30).

Tab. 5: Složení reakčních směsí a podmínky pro konečné vyhodnocení poolu restrikčními nukleázami.

Složky	V / µl
DNA	4
pufr	2
dIH2O	13
RE	1

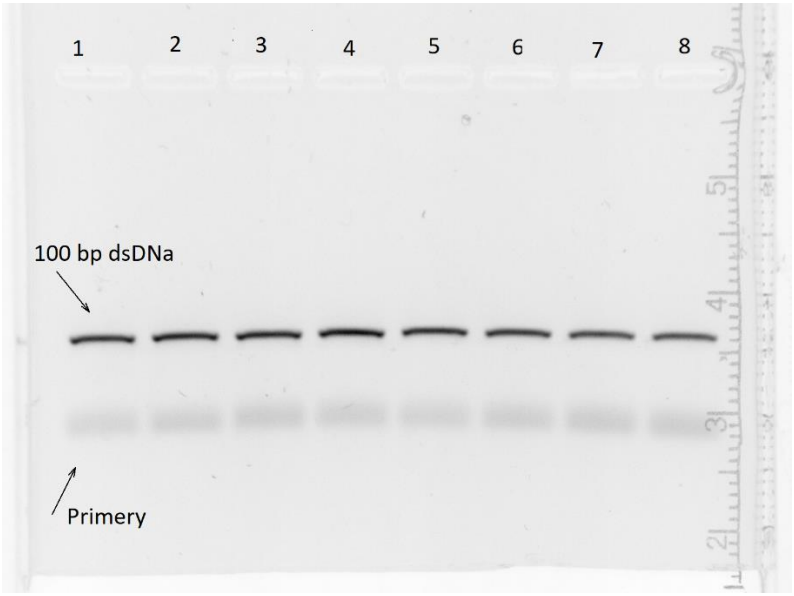
5 Výsledky a diskuse

Obecné předpoklady

Pro ověření předpokladu, že G-bohaté knihovny DNA mohou mít vyšší funkční potenciál pro selekci aptamerů při *in vitro* selekci byl využit streptavidin jako cílový ligand. Aptamery vůči streptavidinu byly v předešlých letech identifikovány *in vitro* selekcí pomocí ssDNA knihoven s náhodnými sekvencemi s ekvimolárním zastoupením jednotlivých bází (A, G, C, T) [26]. Získané aptamery neobsahovaly vyšší podíl G-bohatých sekvencích a tvoří sekundární struktury pomocí kanonického Watson-Crickovského párování bází [23]. Tento fakt jej činí ideálním ligandem pro ověření hypotézy vyššího funkčního potenciálu G-bohatých knihoven DNA. Dalším aspektem je komerční dostupnost streptavidinu vázaného na magnetických kuličkách, což výrazně zjednodušuje separaci vázaných a nevázaných molekul ssDNA při *in vitro* selekci.

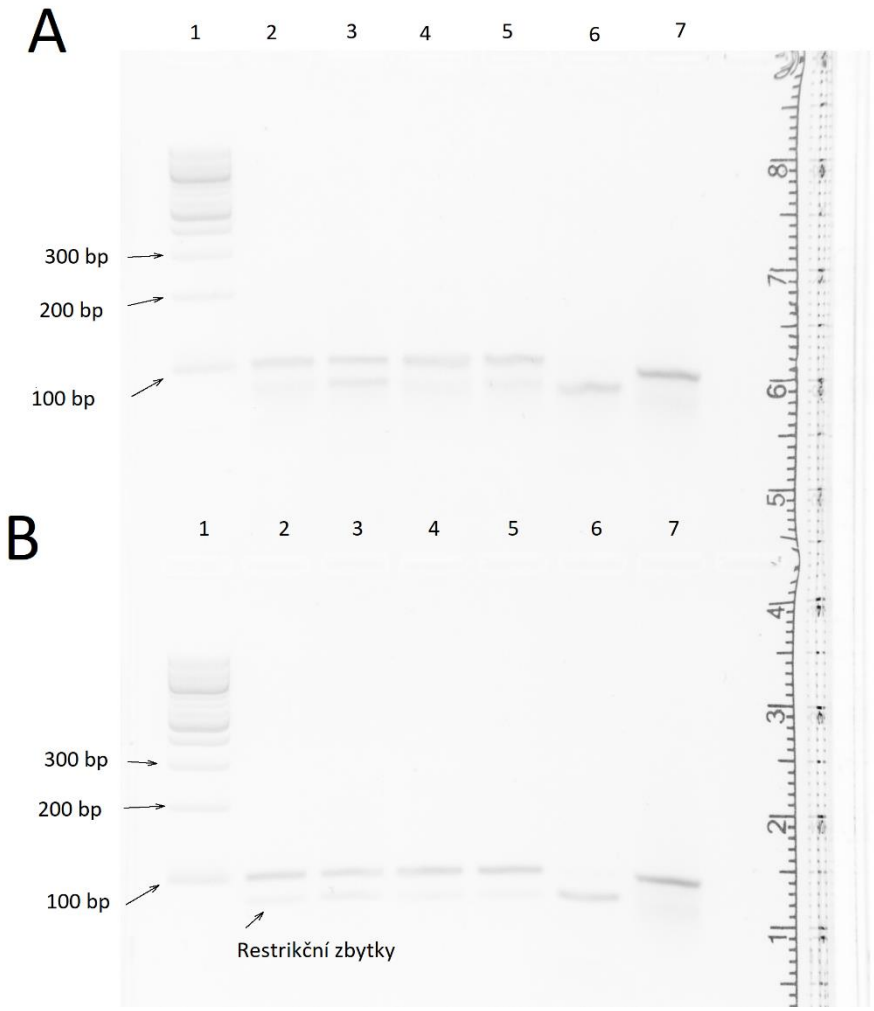
5.1 Testování předpojatosti knihoven k amplifikaci pomocí PCR

Jelikož různé DNA templáty se amplifikují pomocí PCR s různou kinetikou a některé GC-bohaté sekvence mohou být velmi obtížně amplifikovatelné, bylo původním úkolem zjistit amplifikovatelnost jednotlivých knihoven. V případě, že některá knihovna by se amplifikovala pomocí PCR jen obtížně, došlo by v průběhu *in vitro* selekce k falešnému obohacení knihoven ostatních. Proto byl proveden následující experiment. Bylo smícháno ekvimolární množství všech čtyř knihoven (G25, G35, G45, G55) a provedena amplifikace pomocí osmi cyklů PCR. 1/256 podíl této PCR reakce byl odebrán a použit jako templát do nové PCR reakce, která byla amplifikována opět osmi cykly. Tento postup byl opakován celkem osmkrát. Vzorky z jednotlivých reakcí byly vyhodnoceny pomocí agarózové elektroforézy (*Obr. 8*, str. 26). Tento experiment ukázal, že směs všech čtyř knihoven se amplifikuje pomocí PCR dle očekávání a bez jakýchkoliv nechtěných efektů.

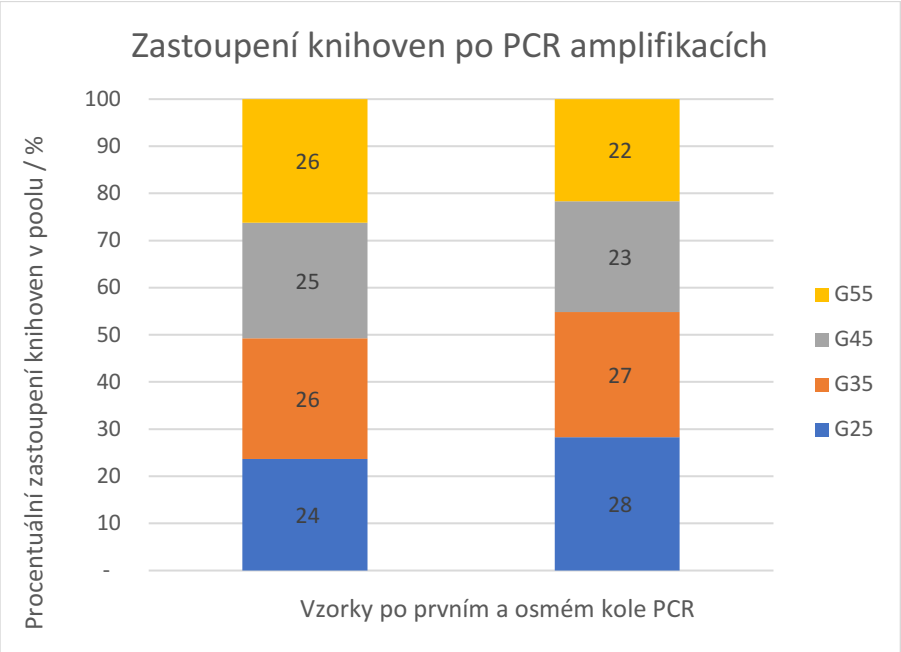


Obr. 8: Obrázek gelu obarveného barvivem GelRed po provedení horizontální agarózové elektroforézy. 1 – směs knihoven (25, 35, 45, 55 % G) po jednom kole (8 cyklech) PCR, 2 – byl odebrán podíl 1/256 ze vzorku 1 po následujícím kole (8 cyklech) PCR byl vzorek 2 nanesen na gel, 3 – 8 obecně 1/256 z předešlého vzorku z předchozího kola

Dále byly reakce po jednom a osmi kolech PCR amplifikací (každé kolo mělo 8 cyklů PCR) zreagovány se čtyřmi RE specifickými pro jednotlivé knihovny s různým podílem guaninu. Vyhodnocení vzorků bylo provedeno pomocí horizontální elektroforézy na agarózovém gelu a kvantifikováno pomocí programu ImageJ (*Obr. 9*, str. 27 a *Obr. 10*, str. 28). Jak je patrné, tak po osmi kolech PCR amplifikací (každé kolo 8 cyklů) nedošlo k výrazné změně poměru knihoven ve směsi, a tudíž lze tuto metodu použít pro *in vitro* selekci aptamerů k ověření funkčnosti jednotlivých knihoven s různým zastoupením guaninu v náhodných sekvencích.



Obr. 9: Obrázek agarózového gelu obarveného barvivem GelRed po provedení horizontální gelové elektroforézy. Kontrola předpojatosti knihoven při PCR amplifikaci po 1. kole PCR (A) a po 8. kole PCR (B): řady 1 – 100 bp marker, do každé řady 2 – 5 byla přidána jedna specifická RE v pořadí *BamHI*, *PvuII*, *NheI* a *XhoI*, 6 – reakce se všemi čtyřmi RE, 7 – reakce bez RE

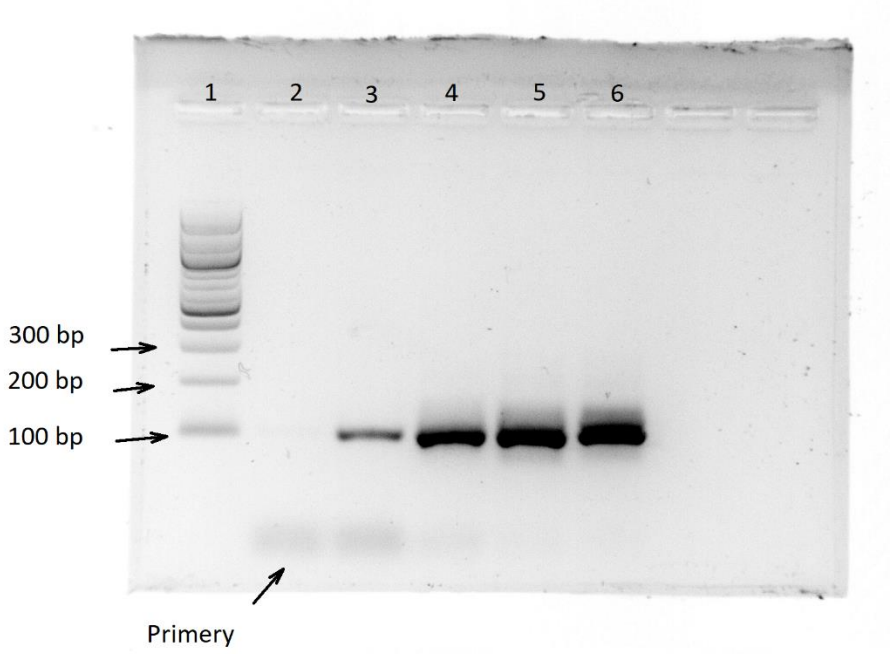


Obr. 10: Kvantifikace gelové elektroforézy z *Obr. 9* na str. 27: první sloupec zobrazuje zastoupení jednotlivých knihoven prvním kole PCR, druhý po osmi kolech PCR

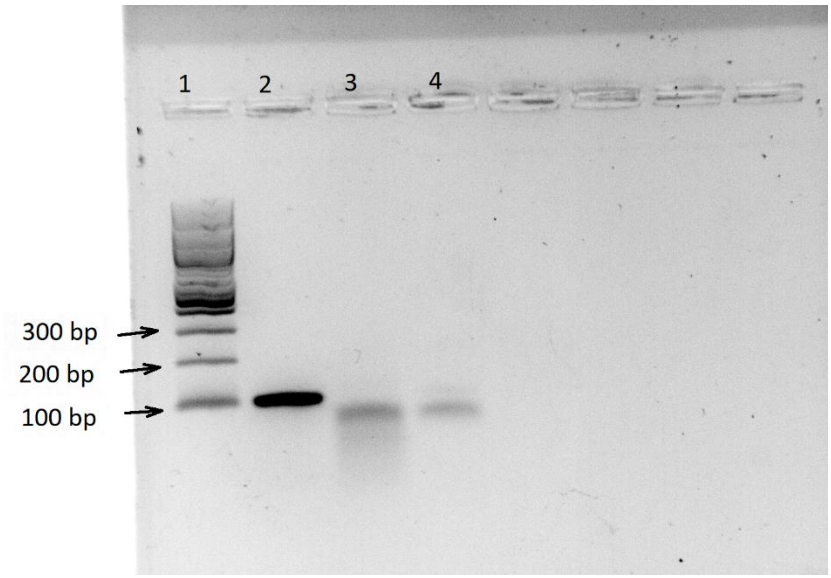
5.2 *In vitro* selekce pomocí směsi knihoven

V prvním kole *in vitro* selekce bylo smícháno ekvimolární množství všech čtyř knihoven ssDNA s různým zastoupením guaninu a tato směs byla použita pro afinitní selekci se streptavidinovými magnetickými kuličkami. Knihovny ssDNA byly získány z komerčního zdroje (IDT DNA). Eluce navázané DNA byla provedena pufrem s obsahem biotinu, který má vysokou afinitu k streptavidinu ($K_d \sim 10^{-14}$) [27]. Tímto způsobem byla upřednostněna eluce specifické DNA s vazbou v oblasti interakce streptavidin-biotin. Získaná DNA byla dále vyčištěna a amplifikována pomocí PCR. Při PCR byly odebírány vzorky po 5 cyklech, které byly následně naneseny na gel (příklad *Obr. 11*, str. 29). Po elektroforéze byl vybrán počet cyklů, ve kterém nebyly pozorovány další nespecifické produkty (viditelné v řadách 4 – 6) a ve kterém bylo možné sledovat přítomnost nukleotidů. Takový vzorek byl ještě jednou podroben PCR amplifikaci k získání dostatečného množství dsDNA. Po přečištění namnožené dsDNA následovala příprava ssDNA pomocí λ-exonukleázy. Λ-exonukleáza selektivně štěpila dsDNA od 5′-konce zadního fosforylovaného primeru směrem k 3′-konci. Příprava ssDNA pomocí λ-exonukleázy musela být optimalizována. Při použití předního fluorescenčně značeného primeru docházelo ke kompletnímu rozštěpení obou řetězců dsDNA. Fluorescenční skupina na 5′-konci byla na primer navázána přes fosfátovou skupinu, která byla též dobrým substrátem pro λ-exonukleázu. Proto byl nakonec použit přední primer s 5′-OH koncem, který není

dobrým substrátem pro λ-exonukleázu. Získaná ssDNA byla před vstupem do dalšího kola *in vitro* selekce kvantifikována na agarózovém gelu (*Obr. 12*, str. 30). Pro zobrazení ssDNA v gelu bylo původně požito barvivo SYBR Green, které se má lépe vázat na ssDNA. Pro detekci ssDNA i dsDNA se ale víc osvědčilo barvivo GelReD, které bylo následně použito pro všechny detekce nukleotidů v agarózovém gelu.



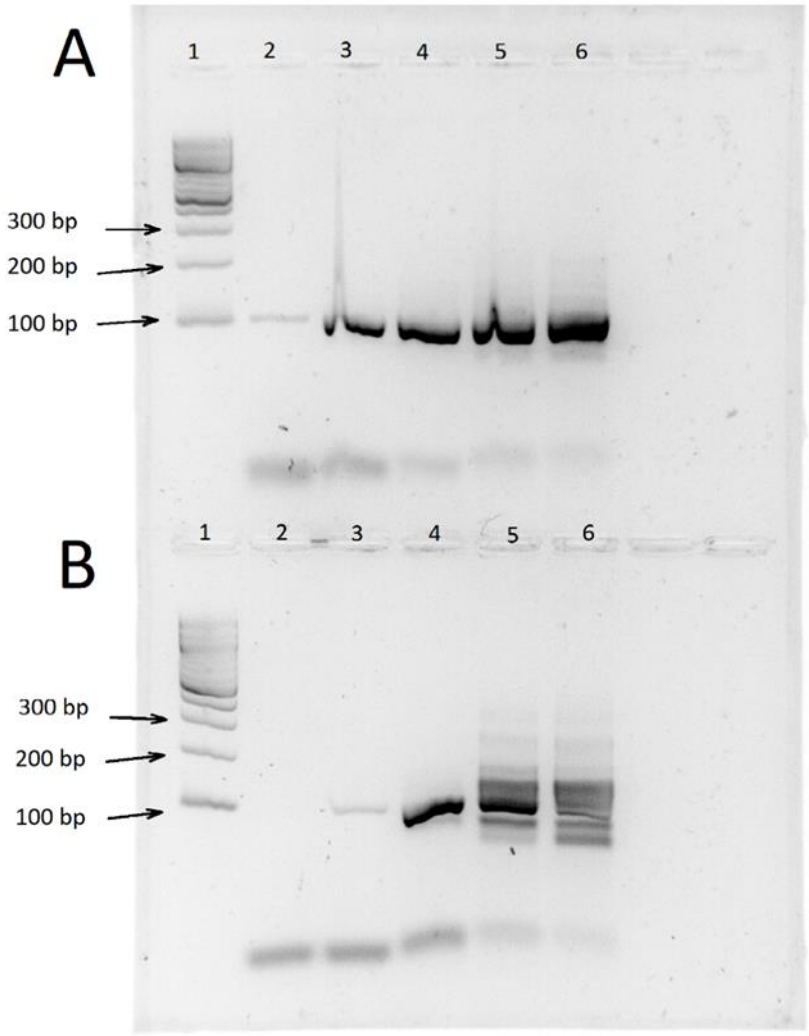
Obr. 11: PCR amplifikace DNA po desátém kole *in vitro* selekce. Nanesené vzorky byly odebírány po 5 cyklech PCR. Řada: 1 – 100 bp marker; 2 – pool po 5 cyklech PCR; 3 – reakce po 10 cyklech PCR; 4 – reakce po 15 cyklech PCR; 5 – reakce po 20 cyklech PCR; 6 – reakce po 25 cyklech PCR.



Obr. 12: Kvantifikace ssDNA po izolaci λ-exonukleázou: 1 – 100 bp marker; 2 – vzorek dsDNA po předchozí PCR; 3 – směs čtyř knihoven ssDNA o známé koncentraci; 4 – vzorek ssDNA po reakci s λ-exonukleázou.

5.3 Evaluace *in vitro* selekce po deseti kolech

Po deseti kolech *in vitro* selekce byla provedena kontrola úspěšnosti. Paralelně byla připravena ssDNA z prvního a desátého kola *in vitro* selekce. Koncentrace obou knihoven byly upraveny tak, aby byly navzájem identické. S těmito dvěma vzorky bylo paralelně provedeno jedno kolo afinitní selekce vůči streptavidinovým kuličkám za stejných podmínek, za jakých byla prováděna samotná *in vitro* selekce. Eluovaná DNA by amplifikována pomocí PCR reakce. Během PCR byl každý pátý cyklus odebrán vzorek (6 µl). Poté byly vzorky naneseny na 3% agarózový gel a po elektroforéze vyhodnoceny (*Obr. 13*, str. 31). Tyto kroky byly provedeny stejným postupem, jako jsou popsány v odstavci 4. 3 Použité metody (str. 21 – 23). Z *Obr. 13*, str. 31 je zřejmé, že s ssDNA z desátého kola *in vitro* selekce bylo získáno více DNA (viditelné už po pěti cyklech PCR) než s ssDNA z prvního kola. Množství eluované DNA je přesto poměrně malé a k izolaci aptamerů vůči streptavidinu by bylo nejspíše vhodné provést ještě několik kol *in vitro* selekce. Nicméně obohacení směsi knihoven po desátém kole je signifikantní a z časových důvodů byl tento vzorek použit pro vyhodnocení zastoupení jednotlivých knihoven ve směsi.

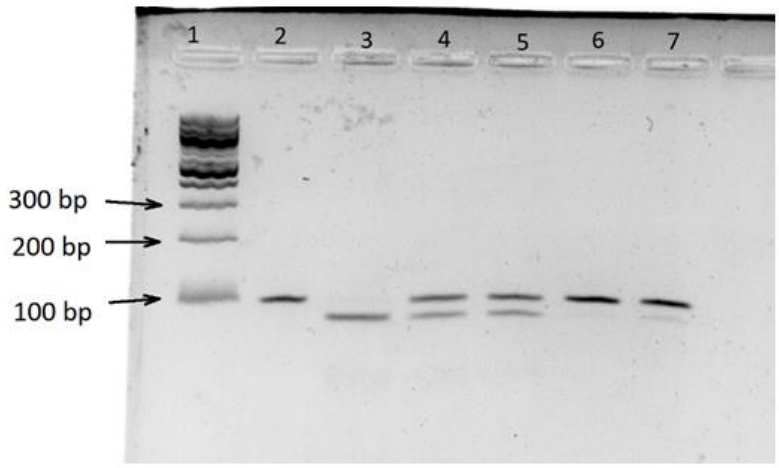


Obr. 13: PCR amplifikace DNA po afinitní selekci. **Gel A** – DNA po deseti kolech *in vitro* selekce: 1 – 100 bp marker; 2 –5 cyklů PCR; 3 –10 cyklů PCR; 4 –15 cyklů PCR; 5 –20 cyklů PCR; 6 –25 cyklů PCR. **Gel B** – DNA z počáteční knihovny: 1 – 100 bp marker; 2 –5 cyklů PCR; 3 –10 cyklů PCR; 4 –15 cyklů PCR; 5 – 20 cyklů PCR; 6 –25 cyklů PCR.

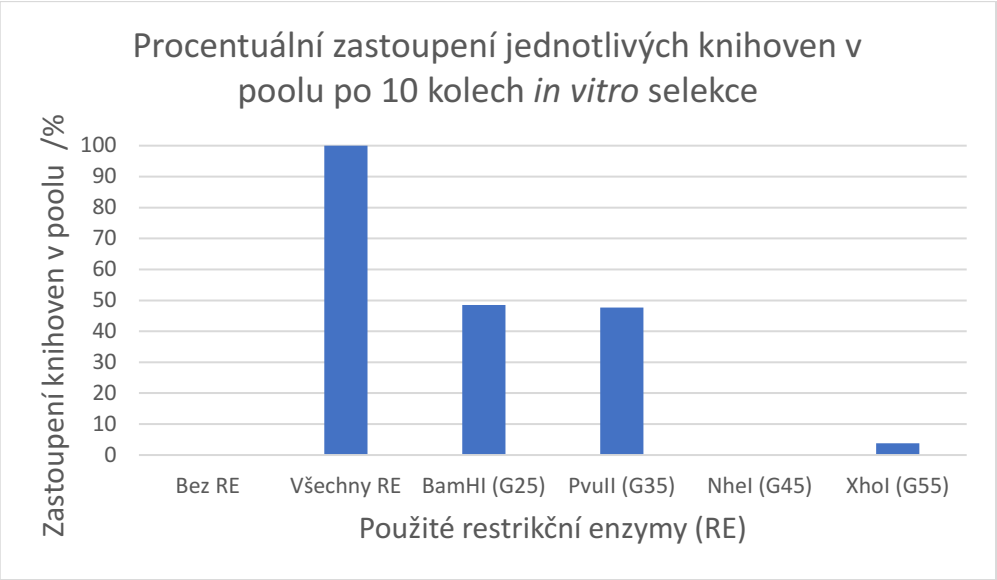
5.4 Vyhodnocení funkčnosti knihoven při *in vitro* selekci

DNA izolovaná po 10 kolech *in vitro* selekce byla štěpena pomocí čtyř různých restrikčních endonukleáz. Každá z knihoven s různým obsahem guaninu obsahuje restrikční sekvenci specifickou pro danou endonukleázu. Konkrétně *BamHI* - G25, *PvuII* - G35, *NheI* - G45 a *XhoI* - G55. Tímto způsobem lze rozlišit ve směsi knihoven jejich poměrné zastoupení. Vyhodnocení experimentu s RE bylo provedeno pomocí gelové elektroforézy (*Obr. 14*, str. 32). U kontrolního vzorku bez RE nebylo dle očekávání pozorováno žádné štěpení a kontrola se všemi čtyřmi RE ukázala téměř kompletní štěpení DNA s pouze velmi zanedbatelným podílem neštěpené DNA. Při reakci s endonukleázami *BamHI* a *PvuII*, které odpovídají knihovnám s podílen guaninu 25 % a 35 %, došlo k výraznému štěpení DNA.

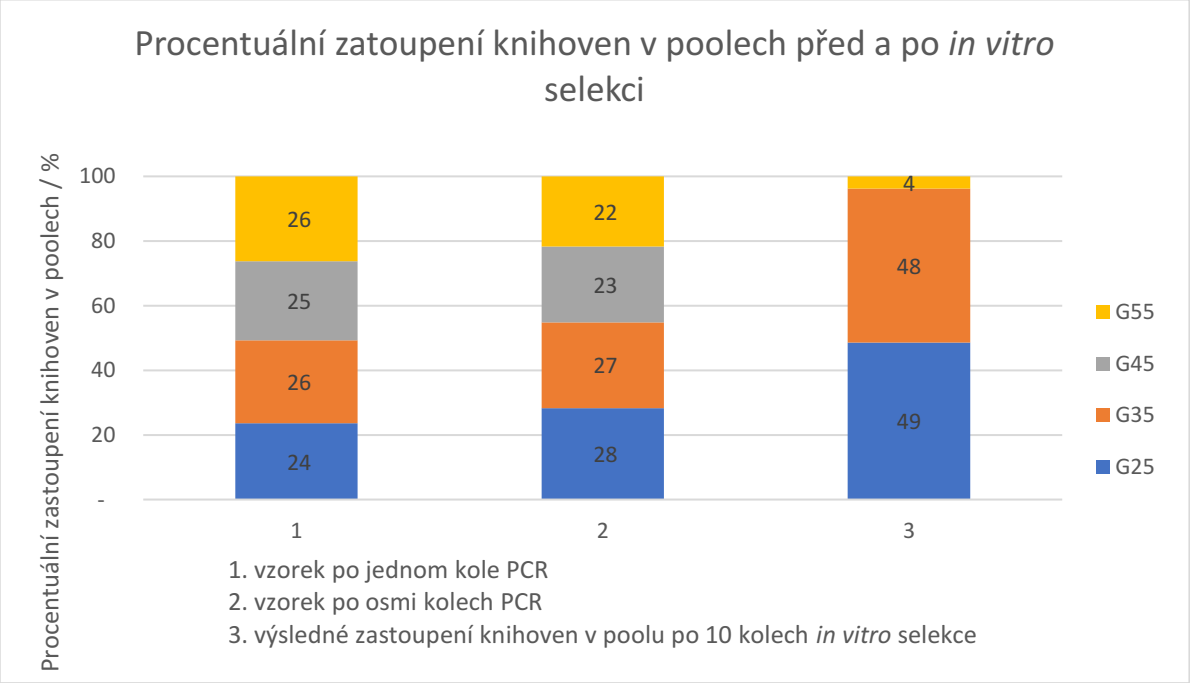
Naopak reakce s endonukleázami *NheI* a *XhoI*, které odpovídají knihovnám s podílen guaninu 45 % a 55 %, nevykazovali výrazné známky štěpení. Po kvantifikaci pomocí programu ImageJ (*Obr. 15*, str. 33) bylo zjištěno, že restrikční endonukleázy *BamHI* a *PvuII* rozštěpily přibližně 49 % a 48 % z DNA po deseti kolech *in vitro* selekce. Endonukleáza *NheI* nevykazovala žádné štěpení a *XhoI* se podílela na štěpení zhruba ze 4 %. Porovnání experimentů s RE pro počáteční směs knihoven, směs knihoven po osmi kolech PCR amplifikací a po deseti kolech samotné *in vitro* selekce je na *Obr. 16* (str. 33). Z této analýzy je zřejmé, že po *in vitro* selekci vůči streptavidinu došlo k výraznému obohacení knihoven s podílem guaninů 25 % a 35 % a naopak potlačení knihoven s 45 % a 55 % guaninů v náhodných sekvencích. Tento fakt nasvědčuje tomu, že knihovny náhodných sekvencí s vysokým obsahem guaninů nejsou efektivnější k získávání aptamerů při nejmenším u ligandů, které nepreferují aptamery s G-kvadruplexy jako je streptavidin. Nicméně lze předpokládat, že u ligandů, u kterých *in vitro* selekce poskytla aptamery s vysokým podílem guaninů (G-kvadruplexů) by G-bohaté knihovny mohly vést k efektivnějšímu a rychlejšímu získávání těchto aptamerů. Obecnější závěr, který lze učinit z těchto výsledků je, že aptamery, které obsahují G-kvadruplexy jako strukturní prvky jsou vhodné pouze pro některé strukturní typy ligandů. Zběžný pohled na G-bohaté aptamery a jejich ligandy nasvědčuje tomu, že malé molekuly, které obsahují aromatické kruhy jsou dobrými ligandy.



Obr. 14: vyhodnocení zastoupení knihoven pomocí RE: 1 – 100 bp marker, 2 – vzorek bez RE, 3 – vzorek se všemi RE, 4 – vzorek s *BamHI* (G25), 5 – vzorek s *PvuII* (G35), 6 – *NheI* (G45), 7 – *XhoI* (G55).



Obr. 15: Kvantifikace zastoupení jednotlivých knihoven po *in vitro* selekci.



Obr. 16: Porovnání poměrů knihoven před *in vitro* selekci (1), po amplifikacích knihovny bez afinitní selekce (2) a po deseti kolech *in vitro* selekce.

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda zavedení G-bohaté knihovny zvýší efektivitu metody *in vitro* selekce DNA aptamerů. Cílovým ligandem byl zvolen streptavidin. K získání odpovědi byla připravena směs z ekvimolárního množství čtyř náhodných knihoven ssDNA o různém zastoupení guaninu v sekvenci (25 %, 35 %, 45 %, 55 %). Bylo ověřeno, že opakovanou PCR amplifikací této směsi nedochází ke změně poměrů jednotlivých knihoven. Dále byla tedy tato směs použita pro *in vitro* selekci proti streptavidinu. Po deseti kolech *in vitro* selekce bylo pozorováno, že získaná ssDNA má vyšší afinitu ke streptavidinovým magnetickým kuličkám než původní směs. Tato DNA po deseti kolech *in vitro* selekce byla použita pro určení zastoupení jednotlivých knihoven pomocí restrikčních endonukleáz (*BamHI*, *PvuII*, *NheI* a *XhoI*). Největší aktivitu štěpení vykazovaly endonukleázy s nižším zastoupením guaninu *BamHI* a *PvuII* (25 a 35 % G), které přibližně rozštěpily 49 % a 48 % specifické DNA. *NheI* (45 % G) nevykazovala žádnou aktivitu a *XhoI* (55 % G) štěpila DNA jen ze 4 %. Došlo tedy k obohacení knihoven s nižším podílem guaninů, a naopak k redukci knihoven s jeho vyšším zastoupením. Zavedení G-bohatých knihoven tedy pravděpodobně není univerzální způsob ke zvýšení efektivity *in vitro* selekce.

Seznam použité literatury

1 Roxo, C., Kotkowiak, W. and Pasternak, A. (2019) G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* **24**.

2 Batey, R. T., Rambo, R. P. and Doudna, J. A. (1999) Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2326–2343.

3 Sun, H. and Zu, Y. (2015) A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules* **20**, 11959–11980.

4 Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510.

5 Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822.

6 Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**, 850–852.

7 Paige, J. S., Wu, K. and Jaffrey, S. R. (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* **333**, 642–646.

8 Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L. and Breaker, R. R. (2002) Genetic Control by a Metabolite Binding mRNA. *Chem. Biol., Elsevier* **9**, 1043–1049.

9 Serganov, A. and Nudler, E. (2013) A Decade of Riboswitches. *Cell*, **152**, 17–24.

10 Garst, A. D., Edwards, A. L. and Batey, R. T. (2011) Riboswitches: Structures and Mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**. a003533

11 Sefah, K., Phillips, J. A., Xiong, X., Meng, L., Simaeys, D. V., Chen, H., Martin, J. and Tan, W. (2009) Nucleic acid aptamers for biosensors and bio-analytical applications. *Analyst* **134**, 1765–1775.

12 Yüce, M., Ullah, N. and Budak, H. (2015) Trends in aptamer selection methods and applications. *Analyst* **140**, 5379–5399.

13 Nimjee, S. M., Rusconi, C. P. and Sullenger, B. A. (2005) Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu. Rev. Med.* **56**, 555–583.

14 Dunn, M. R., Jimenez, R. M. and Chaput, J. C. (2017) Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* **1**, 0076.

15 Byun, J. (2021) Recent Progress and Opportunities for Nucleic Acid Aptamers. *Life* **11**, 193.

16 Chen, Y.Yang, D. (2012) Sequence, Stability, Structure of G-Quadruplexes and Their Drug Interactions. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **50**:17.5.1–17.5.17

17 Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R. and van der Meel, R. (2021) The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **16**, 630–643.

18 Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007) SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **24**, 381–403.

19 Bochman, M. L., Paeschke, K. and Zakian, V. A. (2012) DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 770–780.

20 Huppert, J. L. (2011) Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *FEBS J.* **277**, 3452–3458.

21 Davis, J. H. and Szostak, J. W. (2002) Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **99**, 11616–11621.

22 Ruff, K. M., Snyder, T. M. and Liu, D. R. (2010) Enhanced Functional Potential of Nucleic Acid Aptamer Libraries Patterned to Increase Secondary Structure. J. Am. Chem. Soc. **132**, 9453–9464

23 Apta-Index™ (Aptamer Database) - Library of 500+ Aptamers. APTAGEN LLC. Dostupné z URL: <https://www.aptagen.com/apta-index/>, [cit. 6. 1. 2022]

24 Mikulčák, J. (2007) *Matematické, fyzikální a chemické tabulky a vzorce pro střední školy*, Praha, Prometheus.

25 Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335-350.

26 Ruigrok, V. J. B., van Duijn, E., Barendregt, A., Dyer, K., Tainer, J. A., Stoltenburg, R., Strehlitz, B., Levisson, M., Smidt, H. and van der Oost, J. (2012) Kinetic and stoichiometric characterisation of streptavidin-binding aptamers. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **13**, 829–836.

27 Green, N. M. (1975) Avidin. *Advances in Protein Chemistry* **29**, 85-133.