

Zastosowanie aptamerów w diagnostyce encefalopatii gąbczastych zwierząt

ADAM SZPECHCIŃSKI, ALEKSANDRA STĘPIEŃ, MAGDALENA IZDEBSKA,
ALINA GRZANKA, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego UMK w Toruniu,
Collegium Medicum w Bydgoszczy, ul. Karłowicza 24

*Katedra Weterynarii Rolniczej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wojska Polskiego 52, 60-625 Poznań

Szpechciński A., Stępień A., Izdebska M., Grzanka A., Jaśkowski J. M.
Implementation of aptamers in the diagnosis of prion diseases

Summary

Prion diseases are a group of neurodegenerative conditions affecting both humans and animals. Among the methods used in prion disease diagnosis, immunoenzymatic tests as well as immunohistochemic and fluorescence analysis are distinguished. Currently, aptamers, which are single-stranded RNA or DNA oligonucleotides, are implemented with the above-mentioned methods. They play the role of artificial ligands that may be applied instead of widely used antibodies.

Keywords: aptamers, prion diseases

Encefalopatie gąbczaste

Pasażowalne encefalopatie gąbczaste (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*, TSE) stanowią grupę kilkunastu spokrewnionych chorób neurozwyrodnieniowych, występujących zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Ich przebieg jest zwykle różny u poszczególnych gatunków. Natomiast wspólną cechą jest etiologia, długi okres inkubacji (od kilkunastu miesięcy do kilkudziesięciu lat), letalność oraz charakterystyczny dla całej grupy chorobowej patomorfologiczny obraz zmian w mózdzku i korze mózgowej, przypominający porowatą strukturę gąbki, będący następstwem zaniku neuronów i gliozy (20). Ze względu na możliwość przeniesienia się czynnika patogenego między osobnikami, a niekiedy też pokonywania bariery międzygatunkowej przez niektóre jego warianty, neurozwyrodnienia te określa się jako pasażowalne, czyli zakaźne. Do grupy zwierzęcych TSE zalicza się, między innymi: scrapie u owiec, kóz i muflonów, encefalopatię gąbczastą bydła (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE), przewlekłą chorobę wyniszczającą zwierzyny płowej (*Chronic Wasting Disease*, CWD), encefalopatię gąbczastą kotów (*Feline Spongiform Encephalopathy*, FSE) oraz pasażowalną encefalopatię nerek (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME) (4).

Podstawowe objawy zwierzęcych TSE są podobne: drżenie i niedowład tylnych kończyn, powodujące trudności w poruszaniu się, niezdolność ruchowa oraz nadpobudliwość przechodząca w agresję. Zwierzęta stopniowo tracą kondycję, odczuwają silny świąd i ocierają

się o pobliskie objekty, co jest powodem licznych skaleczeń skóry. W końcowej fazie dochodzi do porażeń, zalegania i zejścia śmiertelnego (2).

W latach 1988-1997 odnotowano w Wielkiej Brytanii dziesiątki tysięcy przypadków BSE rogacizny. BSE, jako samoistna choroba bydła, mogła istnieć nierozpoznawana przez wieki. Najprawdopodobniej to skarmianie mączek pochodzenia zwierzęcego doprowadziło do przełamania bariery gatunkowej i przeniesienia czynnika patogenego z populacji owiec na bydło i inne gatunki hodowlane. Znacznie bardziej niepokojący jest fakt wyróżnienia w 1996 r. tzw. wariantu CJD (Creutzfeldt-Jakob Disease variant, vCJD), będącego wynikiem przepasażowania BSE na człowieka (26).

Białkowe cząsteczki infekcyjne

Hipoteza Stanleya Pruisinera – tylko białko zakłada, że priony są strukturami pozbawionymi kwasu nukleinowego, składającymi się wyłącznie ze zmodyfikowanej izoforny PrP (Prion Protein), określanej jako PrP^{sc} (8). Za swoje nowatorskie badania oraz sformułowanie teorii prionów jako zakaźnego białka, Pruisiner został w 1997 r. uhonorowany Nagrodą Nobla (12).

PrP normalnie występujące w komórkach ssaków jest zakotwiczoną w błonie komórkowej monomeryczną glikoproteiną – PrP^c (Prion Protein Cell), pełniącą najprawdopodobniej rolę w transdukcji sygnałów oraz/lub utrzymaniu odpowiedniej koncentracji jonów miedzi. Ulega ono potranslacyjnej konwersji w PrP^{sc} (Scrapie Prion Protein) podczas procesu, w którym część struktury α -helikalnej białka ulega przemianie do postaci

β -harmonijki. Ta przemiana konformacyjna związana jest z całkowitą zmianą właściwości fizykochemicznych PrP (3, 20). Jedną z dwóch najistotniejszych jest częściowa oporność PrP^{Sc} na działanie proteaz, stąd też określane są również mianem PrP^{res} (protease-resistant) (2). Traktowanie PrP^c proteinazą K powoduje całkowite zniszczenie białka, podczas gdy PrP^{Sc} jest jedynie skręcany w regionie aminoterminalnym, w wyniku czego powstaje cząsteczka o masie 27-30 kD, zachowująca zdolność zakażenia. Jest ona charakterystyczna dla wszystkich chorób prionowych i z tego względu stosowana szeroko w diagnostyce (6).

Hipoteza tylko – białko jest wciąż przedmiotem żywej dyskusji. Sugeruje się, że do zakażenia przez priony niezbędna jest dodatkowa informacja, której źródłem są nie zidentyfikowane dotychczas cząsteczki. Za jeden z dowodów podaje się wyniki eksperymentu, w którym wykazano, że BSE może być przeniesiona na myszy z wyłączeniem formowania PrP^{Sc} (14).

Za najczęściej występującą drogę zakażenia się chorobą prionową (pasażowania) uważa się drogę pokarmową. Po spożyciu zakażonego pokarmu priony dostają się do światła jelita, skąd są wchłaniane do naczyń limfatycznych, którymi docierają do śledziony, węzłów limfatycznych i migdałków, gdzie ma miejsce ich replikacja. Ostatnim etapem jest tzw. neuroinwazja, czyli „dotarcie” szlakiem prowadzącym przez włókna nerwowe do rdzenia kręgowego i mózgu, gdzie zachodzi kumulacja i tworzenie tzw. agregatów PrP^{Sc} (1). Uważa się, że w rozprzestrzenianiu prionów w obrębie układu limfatycznego oraz w ich neuroinwazji kluczową rolę odgrywają limfocyty B (13). Istotny jest fakt, że infekcji prionowej nie towarzyszy odpowiedź układu immunologicznego, gdyż chorobotwórcze PrP^{Sc} jest rozpoznawane przez organizm jako własne (29).

Diagnostyka TSE

Ostateczna diagnoza choroby prionowej, zarówno u zwierząt, jak i u ludzi (CJD), oparta jest na wykrytej *post mortem* obecności PrP^{Sc} w preparatach histologicznych z tkanki mózgowej zainfekowanego osobnika. U bydła chorego na BSE akumulacja agregatów chorobotwórczych form PrP z reguły ograniczona jest właśnie do obszaru CNS. Natomiast u owiec chorych na scrapie odkładanie depozytów PrP^{Sc} ma miejsce najpierw w tkance limfatycznej, a dopiero później w CNS. U tych zwierząt możliwa jest zatem diagnostyka *ante mortem* w oparciu o materiał biopsyjny pobrany przyżyciowo z migdałków (29).

Detekcję PrP^{Sc} w materiale tkankowym przeprowadza się najczęściej metodą immunohistochemiczną (IHC), wykonując reakcje barwne na skrawkach, bądź za pomocą tzw. testów szybkich, bazujących na analizie western blotting (WB) lub teście immunoenzymatycznym (ELISA). Bardzo przydatna jest również mikroskopia elektronowa (EM), stosowana do wykrywania fibrylarnych złogów prionowych (scrapie-associated fibrils, SAF). Procedurą rutynowo wykonywaną

w diagnostyce TSE jest histologiczna ocena mikroskopowa tkanki mózgowej chorego osobnika pod kątem opisanych zmian patomorfologicznych. Obiecującą metodą diagnozowania TSE są opracowywane obecnie testy wykorzystujące fluorescencję jako kryterium różnicowania PrP^c i PrP^{Sc} (7).

Badania ostatnich lat ujawniły obecność cząsteczek PrP^{Sc} również w płynach ustrojowych ciała, nawet w stadiach przedobjawowych choroby. Trwają intensywne próby nad opracowaniem nieinwazyjnego testu na obecność prionów we krwi i moczu, który mógłby być wykonywany przyżyciowo. Jednakże ilość PrP^{Sc} poza CNS jest wielokrotnie mniejsza niż w mózgu, zatem konieczne może być stosowanie metod amplifikacji *in vitro* PrP^{Sc} lub wprowadzenia nowych, ultraczułych technik detekcji biomolekuł (3).

W okresie ostatnich 20 lat wyprodukowano bardzo wiele różnych przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych, skierowanych przeciwko cząsteczce PrP. Niestety, żadne z nich nie pozwala na skuteczne rozróżnienie PrP^c i PrP^{Sc}, pomimo tego, że izoformy te mają bardzo odmienne struktury przestrzenne i w związku z tym powinny prezentować różne epitopy. W konsekwencji, immunologiczne metody wykrywania prionów (western blotting i ELISA) wymagają czynności wstępnych, mających na celu usunięcie lub zniszczenie frakcji PrP^c w próbce. Konieczność wstępnego przygotowania próbek wydłuża czas analizy i zwiększa jej ogólne koszty, a co najważniejsze, obniża dokładność pomiaru i uniemożliwia stosowanie testów immunologicznych *in vivo*. W świetle ograniczonego zastosowania przeciwciał aptamery stanowią alternatywne podejście do problemu skutecznej detekcji prionów, opartej na wiązaniu specyficznego ligandu (7).

Definicja aptameru

Aptamery to kilkunasto- lub kilkudziesięcionukleotydowe sekwencje RNA lub DNA, pełniące rolę ligandów wiążących specyficznie inne molekuly (16). Ich nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *aptus*, oznaczającego dosłownie: dopasowany, przyczepiony. Zawdzięczają ją niezwykle dopasowaniu struktury przestrzennej do budowy cząsteczki docelowej, osiąganemu w toku kombinatorycznego procesu syntezy i cyklicznej selekcji *in vitro*. Wśród cząsteczek chemicznych, dla których wyselekcjonowano wiążące je aptamery, są m.in.: jony metali, barwniki organiczne, aminokwasy, witaminy, antybiotyki, nukleotydy, lipidy, peptydy, a przede wszystkim białka (10). Precyzyjne wiązanie się aptameru ze ściśle określoną biomolekułą możliwe jest dzięki bardzo wysokiemu powinowactwu (od mikromolarnych do niskich pikomolarnych wartości stałej K_d) i specyficzności, które wynikają z niepowtarzalnej sekwencji nukleotydowej i konformacji przestrzennej każdego ligandu (11).

Aptamery pozwalają rozróżniać nawet bardzo podobne strukturalnie molekuly (11). Stosunkowo łatwo, w porównaniu do przeciwciał, podlegają chemicznym

modyfikacjom, jak znakowanie radioaktywnymi izotopami (9), koniugowanie z barwnikami fluorescencyjnymi (28) czy poprawianie biostabilności (18). Ze względu na swoje właściwości aptamery mogą konkurować z przeciwciałami o miano uniwersalnych receptorów i być powszechnie wykorzystywane jako narzędzie rozpoznania molekularnego w metodach diagnostycznych (10).

SELEX

Aptamery generuje się w procesie określanym jako selekcja *in vitro* lub SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment). Polega on na identyfikacji i wybiórczej amplifikacji cząsteczek o pożądanym właściwościach spośród bardzo licznej puli (10^{14} - 10^{15}) krótkich, jednoniciowych sekwencji DNA (27). Każdy taki oligonukleotyd składa się z: (i) fragmentu środkowego – o przypadkowej sekwencji nukleotydów, (ii) fragmentów flankujących końce 5' i 3' – o sekwencjach stałych oraz (iii) regionu promotorowego dla polimerazy RNA na końcu 5'. Do sekwencji stałych przyłączają się startery w reakcji PCR, wykorzystywanej do amplifikacji biblioteki DNA. Zastosowanie polimerazy RNA umożliwia, na drodze enzymatycznej transkrypcji, otrzymanie analogicznej biblioteki oligonukleotydów RNA (30). Podczas selekcji całą pulę oligonukleotydów (DNA lub RNA) inkubuje się z unieruchomioną na nośniku cząsteczką docelową w ściśle ustalonych warunkach pH, temperatury i składu buforu (27). Oligonukleotydy niezwiązane z cząsteczką docelową wypłukuje się z nośnika. Z kolei populację aptamerów wykazujących powinowactwo do cząsteczki docelowej amplifikuje się metodą PCR (biblioteka DNA) lub PCR sprzężoną z reakcją odwrotnej transkrypcji (biblioteka RNA) w celu uzyskania dwuniciowego DNA, które posłuży jako matryca do syntezy kolejnej, zawężonej puli oligonukleotydów.

W kolejnych cyklach selekcji stopniowo zaostrza się warunki reakcji i powtarza się opisaną wyżej procedurę, a stosunek sekwencji aktywnych, tj. wiążących cząsteczkę docelową, do nieaktywnych w mieszaninie sukcesywnie wzrasta (10). Po kilku lub kilkunastu cyklach osiąga się stan, w którym populacja oligonukleotydów składa się w większej części z sekwencji najlepiej wiążących cząsteczkę docelową. Gdy to nastąpi, aptamery klonuje się w komórkach bakteryjnych i sekwencjonuje, celem poznania unikalnej struktury każdego z nich. Produkcja aptamerów o znanej sekwencji odbywa się na drodze syntezy chemicznej (10). W ostatnich latach proces selekcji *in vitro* w pełni zautomatyzowano, co pozwoliło zwiększyć wydajność i skrócić czas generowania aptamerów do zaledwie kilku dni (5).

Generowanie aptamerów niezależnie od organizmów żywych lub jakichkolwiek warunków *in vivo* istotnie redukuje koszty ich produkcji. Szacuje się, że koszt wytworzenia 1 grama aptamerów wynosi 1000 dolarów, podczas gdy produkcja 1 grama przeciwciała pochłania od 1000 do 10 000 dolarów (15). Poza tym

manipulowanie warunkami selekcji *in vitro* umożliwia otrzymanie aptamerów o pożądanym właściwościach, zdolnych do działania w danym środowisku reakcji (10).

Aptamery wiążące PrP

Wśród molekuł, dla których wyselekcjonowano wiążące je aptamery, bez wątpienia, najwięcej jest białek, m.in. enzymatycznych, regulatorowych, błonowych, czynników wzrostu i innych. Aptamery z powodzeniem wykorzystano zarówno do detekcji tych białek, jak również do modulowania bądź blokowania ich funkcji *in vivo* (10). Białkowa natura prionów, a zwłaszcza ich unikalne właściwości fizykochemiczne, czynią je wyśmienitym celem dla nukleinowych ligandów.

Pierwsze doniesienie naukowe o wyprodukowaniu aptamerów o strukturze RNA, skierowanych przeciwko białkowej cząsteczce infekcyjnej pochodzi z 1997 r. (19). Cząsteczkę docelową w procesie SELEX stanowiło rekombinowane białko prionowe (rPrP^C) z chomika syryjskiego, inkubowane z mieszaniną oligomerów RNA. Analiza sekwencyjna aptamerów (oznaczonych Ap1 i Ap2) wiążących specyficznie cząsteczkę rPrP^C ujawniła obecność tzw. kwartetów guaninowych w ich strukturze, biorących udział w tworzeniu wiązań aptamer-cząsteczka docelowa. Podobne motywy strukturalne posiadają m.in. ligandy wiążące się z trombiną i integrazą HIV-1 (17). Natomiast region białkowy, aktywnie oddziałujący z aptamerem zlokalizowano w aminoterminalnym odcinku rPrP: od 23 do 52 aminokwasu. Należy podkreślić, że aptamery wykazywały wysoką specyficzność wiązania również względem natywnej formy rPrP^C z homogenatów mózgowych chomika, myszy i krowy. Fakt ten mógłby potwierdzać tezę o zachowawczej naturze N-końcowej sekwencji rPrP^C wśród ww. gatunków zwierząt (25).

Ponieważ PrP, poprzez koniec N, może oddziaływać z szeregiem innych molekuł, w tym kwasów nukleinowych, specyficzność działania aptamerów Ap1 i Ap2 budziła wątpliwość. Z tego względu w następnych badaniach zamiast rPrP, użyto do SELEXu fibrylarnych złogów prionowych (SAF), które teoretycznie zawierają wszelkie warianty konformacyjne PrP (21). Wyselekcjonowany aptamer wiązał się zarówno z natywnym SAF, jak i z materiałem poddanym działaniu proteinaazy K. Testy z użyciem rekombinowanych PrP wykazały, że powinowactwo aptameru SAF-93 do form β -fałdowych było niemal 10-krotnie większe, niż do form α -helikalnych białka. Wskazuje to na istnienie dwóch miejsc wiązania w cząsteczce PrP: pierwszego, znajdującego się w N-końcowym odcinku każdego PrP, odpowiedzialnego za niespecyficzne wiązanie RNA oraz drugiego, umiejscowionego w C-terminalnym, β -fałdowym odcinku PrP, specyficznie rozpoznawanego przez SAF-93. „Preferowanie” przez aptamer białek o strukturze β -fałdowej, typowej dla PrP^{Sc}, pozwoliło na skuteczną inhibicję konwersji prionowej *in vitro*, w modelu bezkomórkowym (cell-free conversion of PrP) (21). Wydaje się, że SAF-93 będąc istotnym li-

gandem dla PrP może przyczynić się do odkrycia niezidentyfikowanych dotychczas konformacji PrP. W jednej z najnowszych publikacji ten sam zespół badawczy informuje o syntezie nowej formy aptameru, która zachowując specyficzną konformacyjną, została zredukowana do nadającej się do syntezy chemicznej. Wydaje się, że zastosowanie tej formy aptameru, nazwanej przez autorów SAF-93 (1-34, 35bioU, 36-60) umożliwi detekcję izoform PrP *in vivo* (24).

Aptamery w testach immunologicznych

Standardowe testy IHC, WB i ELISA w diagnostyce TSE przeprowadza się wykorzystując istnienie fizykochemicznych różnic pomiędzy normalną a chorobotwórczą formą PrP. Jedną z najistotniejszych jest częściowa oporność PrP^{Sc} na działanie proteaz (PrP^{Sc} bywa określane tu mianem PrP^{res} – od protease-resistant). Traktowanie PrP^C proteinazą K powoduje całkowite strawienie białka, podczas gdy PrP^{Sc} jest jedynie skracany w regionie aminoterminalnym, w wyniku czego powstaje cząsteczka o masie 27-30 kD (tzw. PrP27-30), zachowująca zdolność zakażenia (2).

Chociaż PrP27-30 jest markerem powszechnie stosowanym w diagnostyce TSE, pojęcie PrP^{Sc} nie może być jednak definiowane jedynie na podstawie oporności na trawienie proteazą i nie jest ono równoznaczne z określeniem PrP^{res}. Wykazano, że podczas choroby cząsteczki PrP^C mogą ulegać takim modyfikacjom strukturalnym, które nie wywołują zmiany w oporności na trawienie proteazą (23). W innym eksperymencie, u ponad 55% myszy, na które z powodzeniem przepasażowano BSE, nie wykryto PrP^{res} (14). W świetle tych doniesień najbardziej wiarygodnym wydaje się test diagnostyczny wykrywający niewielkie ilości patogennych form PrP bez konieczności działania proteinazą.

Ostatnio odkryto, że cząsteczki PrP^C i PrP^{Sc} odmiennie reagują na działanie czynnika denaturującego, np. hydrochlorku guanidyny (Gdn-HCl). Wykorzystywane w tzw. teście CDI (conformation-dependent immunoassay) przeciwciała detektorowe rozpoznaje epitop, który w przypadku PrP^C odsłonięty jest w każdych warunkach, natomiast w PrP^{Sc} eksponowany jest jedynie po denaturacji. Stąd obecność chorobotwórczej izoformy PrP w homogenacie tkankowym może być zidentyfikowana i zmierzona ilościowo poprzez porównanie wiązania przeciwciała do natywnej i zdenaturowanej formy białka prionowego (22).

Podsumowanie

Wdrożenie efektywnych metod w terapii chorób prionowych nastęrcza szereg trudności wynikających z natury cząsteczki infekcyjnej, jej struktury, sposobu replikacji oraz mechanizmu patogeny. Obecnie zainteresowanie badaczy na świecie wzbudzają aptamery, z którymi wiąże się duże nadzieje dotyczące ich wykorzystania w celach diagnostycznych i terapeutycznych. Liczne publikacje na temat aptamerów wskazują na ich uniwersalizm, a jednocześnie na wysoką specyficzną

wiązanych cząstek docelowych. Najnowsze doniesienia ujawniają możliwość zastosowania tych struktur w rozpoznawaniu chorób prionowych już *in vivo*, redukując tym samym czas oraz koszt stosowanych dotychczas metod diagnostycznych.

Piśmiennictwo

1. Aguzzi A.: Blood simple prion diagnostics. *Nat. Med.* 2001, 7, 289-290.
2. Aguzzi A., Heppner F. L.: Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ.* 2000, 7, 889-902.
3. Bennion B. J., Daggett V.: Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. *Clin. Chem.* 2002, 48, 2105-2114.
4. Chakraborty C., Nandi S., Jana S.: Prion disease: a deadly disease for protein misfolding. *Cur. Pharm. Biotechnol.* 2005, 6, 167-177.
5. Eulberg D., Buchner K., Maasch C., Klussmann S.: Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, e45.
6. Fournier J. G., Grigoriev B.: Prion diseases: contribution of high-resolution immunomorphology. *J. Cell. Mol. Med.* 2001, 5, 367-377.
7. Gofflot S., El M. B., Zorzi D., Melen L., Roels S., Quatpers D., Grassi J., Vanopdenbosch E., Heinen E., Zorzi W.: Immuno-quantitative polymerase chain reaction for detection and quantitation of prion protein. *J. Immunoassay Immunochem.* 2004, 25, 241-258.
8. Harris D. A.: Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbio. Rev.* 1999, 12, 429-444.
9. James W.: Aptamers, [w:] Meyers R. A. (red.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2000, 4848-4871.
10. Jayasena S. D.: Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* 1999, 45, 1628-1650.
11. Jenison R. D., Gill S. C., Pardi A., Polisky B.: Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers. *J. Bio. Chem.* 1994, 269, 32051-32054.
12. Kelly J. W.: The environmental dependency of protein folding best explains prion and amyloid diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 930-932.
13. Klein M. A., Frigg R., Flechsig E., Raeber A. J., Kalinke U., Bluethmann H., Bootz F., Suter M., Zinkernagel R. M., Aguzzi A.: A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997, 390, 687-690.
14. Lasmezas C. I., Deslys J. P., Robain O., Jaegy A., Beringue V., Peyrin J. M., Fournier J. G., Hauw J. J., Rossier J., Dormont D.: Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997, 275, 402-405.
15. McCarthy A.: Archemix. *Nucleic Acids platforms. Chem. Biol.* 2002, 9, 663-665.
16. Maclean D., Baldwin J. J., Ivanov V. T., Kato Y., Shaw A., Schenider P., Gordon E. M.: *Glossary of Terms Used in Combinatorial Chemistry*. Pure Appl. Chem. 1999, 71, 2349-2365.
17. Phan A. T., Kuryavyy V., Ma J. B., Faure A., Andreola M. L., Patel D. J.: An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: a potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 634-639.
18. Pieken W. A., Olsen D. B., Benseler F., Aurup H., Eckstein F.: Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* 1991, 253, 314-317.
19. Proske D., Gilch S., Wopfner F., Schatzl H. M., Winnacker E. L., Famulok M.: Prion-protein-specific aptamer reduces PrP^{Sc} formation. *ChemBiochem.* 2002, 3, 717-725.
20. Prusiner S. B.: Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 13363-13383.
21. Rhie A., Kirby L., Sayer N., Wellesley R., Disterer P., Sylvester L., Gill A., Hope J., James W., Tahiri-Alaoui A.: Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 39697-39705.
22. Safar J. G., DeArmond S. J., Kociuba K., Deering C., Didorenko S., Bouzamondo-Bernstein E., Prusiner S. B., Tremblay P.: Prion clearance in bigenic mice. *J. Gen. Virol.* 2005, 86, 2913-2923.
23. Safar J. G., Scott M., Monaghan J., Deering C., Didorenko S., Vergara J., Ball H., Legname G., Leclerc E., Solfrosi L., Serban H., Groth D., Burton D. R., Prusiner S. B., Williamson R. A.: Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 1147-1150.
24. Sayer N. M., Cubin M., Rhie A., Bullock M., Tahiri-Alaoui A., James W.: Structural determinants of conformationally selective, prion-binding aptamers. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 13102-13109.
25. Schatzl H. M., Da Costa M., Taylor L., Cohen F. E., Prusiner S. B.: Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 1995, 245, 362-374.
26. Schonberger L. B.: New variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Infec. Dis. Clin. North Am.* 1998, 12, 111-121.
27. Tuerk C., Gold L.: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990, 249, 505-510.
28. Unruh J. R., Gokulrangan G., Wilson G. S., Johnson C. K.: Fluorescence properties of fluorescein, tetramethylrhodamine and Texas Red linked to a DNA aptamer. *Photochem. Photobiol.* 2005, 81, 682-690.
29. Weissmann C., Aguzzi A.: Approaches to therapy of prion diseases. *Ann. Rev. Med.* 2005, 56, 321-344.
30. Wilson D. S., Szostak J. W.: In vitro selection of functional nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.* 1999, 68, 611-647.

Adres autora: mgr inż. Aleksandra Stępień, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: a_stepien@cm.umk.pl