

MTA doktori értekezés bírálata*Szalai Csaba***Mészáros Tamás: Diagnosztikai felhasználásra alkalmas aptamerek fejlesztése és vizsgálata.**

Mészáros Tamás MTA doktori értekezésében a 2004 és 2020 között megjelenő 16 publikációjának főbb eredményeit foglalja össze. Az értekezés, tartalom-, rövidítés- és irodalomjegyzékkel, illetve köszönetekkel együtt összesen 147, ezek nélkül 115 oldal.

Az értekezés minden fontosabb fejezetet tartalmaz, az eredmények ismertetése összevonásra került az értékelésükkel. Én egy fejezetet hiányoltam, amelyben a jelölt ismerteti, esetleg pontokba foglalva felsorolja azokat az eredményeket (téziseket), amelyekkel hozzájárult a nemzetközi tudományos ismeretekhez. Ha jól tudom azonban, ilyen formai követelmény nincs, így ennek hiánya inkább csak a bírálók értékelését nehezíti. Ezek alapján megállapítom, hogy formai szempontokból a disszertáció megfelel az MTA doktori dolgozatokkal szemben támasztott követelményeknek.

Bár a dolgozat beadásának időpontjára vonatkozó adataim nincsenek, a bíralat idején (2022. 01. 14.) a jelölt független idézeteinek a száma 1522, ami jóval meghaladja a minimumkövetelményeket, illetve a 16 cikkben, amelyre a dolgozat épül, a jelölt 11-ben terminális szerző, amely szintén meghaladja a követelményekben megadott minimum 10-et. Ezek alapján megállapítom, hogy szcientometriai szempontból Mészáros Tamás teljesíti az MTA doktori cím elnyeréséhez szükséges feltételeket.

A dolgozat nyelvezete olvasható és tudományos, néhány (elkerülhetetlen) elütéssel, ezekre néhány példa: 22. oldal: kezdeményezes; 34.: lehasadtnak; 56.: szem6besültünk; 61.: hiányoságként; 81.: eredményeink; 84.: közzölt. Ilyen valószínű elütés még, a 21. oldalon található citokinin, amely egy növényi hormon, de a dolgozatban a plazmafehérjék között szerepel. Ezek az elütések azonban ritkák és nem zavarják a dolgozat érthetőségét, így az értekezés a tudományos nyelvezet, illetve érthetőség szempontjából is megfelelő.

Az értekezés bevezetése három fejezetre tagozódik, amelyben a későbbi érthetőséget segítő irodalmi összefoglalókat találunk a fehérjeszintézis lehetséges módozatairól, a plazmaproteinek diagnosztikájáról és a dolgozat fő témájáról az aptamerekről. Ebben a részben, akárcsak a dolgozat egészében meggyőződhetünk, hogy Mészáros Tamás az aptamerekhez kapcsolható kutatásaiban, ismereteiben a világ vezető szakemberei közé tartozik.

A „Célkitűzések” fejezetben a jelölt 8 pontban foglalja össze az elmúlt évek során megfogalmazott kutatási célokat, amelyek aztán a publikációk és az „Eredmények” fejezetben leírtak alapján meg is valósultak.

Az „Anyagok és módszerek” fejezetben a jelölt, szerintem helyesen csak azokat a molekuláris biológiai módszereket ismerteti, amelyek általánosan kevésbé ismertek, de kutatócsoportjukban rendszeresen használnak. A molekuláris biológiában rutinszerűen használt módszerek nem kerülnek bemutatásra. Hozzá kell tenni, hogy mivel a jelölt tudományos munkájának jelentős része módszertani fejlesztéseket is magában foglal, ezekről természetesen az eredmények között találunk leírást.

Az „Eredmények” a dolgozat leghosszabb, legérdekesebb és egyben leginformatívabb része. Az eredmények első része a búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszer alkalmazásáról és továbbfejlesztéséről szól. Itt a sejtciklus szabályozás tanulmányozására irányuló kísérleteikkel igazolták, hogy a búzacsíra alapú, sejtmentes transzláció hatékonyan alkalmazható olyan eukarióta fehérjék gyors és költséghatékony előállítására, melyek termeltetése a prokarióta sejt rendszerében csak nagyon körülményesen, vagy egyáltalán nem kivitelezhető. A célfehérjék kódoló vektor létrehozásából származó nehézségek orvoslására bevezették a ligálás-független klónozást, illetve a fehérjék tisztításához affinitástisztításra alkalmas címkével látták el azokat. A kidolgozott módszerrel előállították és tisztították a GLUT10 transzportfehérjét. Az *in vitro* transzlációból származó proteoliposzómával kivitelezett rapid filtrációs kísérletekkel elsőként bizonyították, hogy a GLUT10 fehérje a dehidroaszorbát transzportjáért felelős. Emellett még *in vitro* transzlációval több más fehérjét is előállítottak.

A következő fejlesztésekben a búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs vektorcsaládot bővítették. Az újonnan létrehozott vektorokkal olyan fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tudtak igazolni, melyek a korábbi változatok alkalmazásával nem voltak láthatók.

A dolgozat hátralevő részében a jelölt fő kutatási témája, a különböző aptamerekkel kapcsolatos vizsgálatok, módszerfejlesztések, illetve változatos célú aptamerek előállítása és funkcionális vizsgálata kerül bemutatásra.

Az aptamerek tulajdonságai közül az egyik legfontosabb a célmolekulájukkal alkotott komplexük disszociációs állandója (K_D), melynek meghatározására beállítottak egy ALPHA elnevezésű lumineszcens, gyöngyöket használó vizsgálatot, amelyről megállapították, hogy megfelelő alternatívája lehet a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikai vizsgálatára leginkább elfogadott SPR módszernek.

Nagyon érdekesnek és ötletesnek találtam, az aptamerszelekcióhoz szükséges nagyszámú, megfelelő mennyiségű és minőségű egyszálú DNS előállítására kidolgozott primerblokkolt aszimmetrikus PCR kidolgozását, amely összehasonlításokban sokkal jobban teljesített, mint az eredeti aszimmetrikus PCR, sőt alacsonyabb időigényének és jobb költséghatékonyságának köszönhetően a λ exonukleáz-kezelésnél is előnyösebbnek tűnt. A fontosabb módszertani cikkek általában sok idézetet kapnak. Meglepetésemre, ez a kiválóan tűnő módszert bemutató cikk eddig csak 9 független idézetet kapott. Mennyire terjedt el ez a módszer? Tesztelték-e mások is?

Mészáros Tamás kutatócsoportjának az ALPHA módszer és a PBA-PCR kombinálásával olyan aptamereket sikerült azonosítani, amelyek az SPR mérések alapján 10 nM körüli K_D értékkel rendelkeznek, így jó eséllyel alkalmazhatók diagnosztikai fejlesztésre.

Az aptamerek egyik gyengéje lehet a nukleázok iránti érzékenység. Ezért nukleázrezisztensebb módosított nukleotidokat tartalmazó aptamereket használnak. Az aptamerek szelektálásához használt SELEX egyes ciklusaiban a dúsuló oligonukleotidokat a módosított nukleotidok megtartásával kell PCR-rel amplifikálni, így megkerülhetetlen a mesterséges nukleotidokat is beépítő termofil DNS polimerázok kiválasztása. Ehhez 8 termofil DNS polimeráz közül a TAdUTP beépítésére a KOD XL nevű bizonyult a legjobbnak. A nem kívánatos DNS-fragmentek felszaporodását meggátolására olaj-víz emulziós PCR-t állítottak be.

A következő részben a diagnosztikai potenciállal rendelkező aptamerek szelektációjáról és alkalmazásáról olvashatunk. Egyes élelmiszerekben komoly problémát okozhat az egyes *Aspergillus* és *Penicillium* penészgombák által termelt ochratoxin A mikotoxin. Ennek a kimutatására kiválasztott A08 kódjelű aptamer több publikáció tanúsága szerint máshol is alkalmazásra került és alkalmazhatóságát két különböző metodikai megközelítéssel is igazolták.

A vírusok aptamerekkel történő azonosítására elsőként az alma törzsgödrösödés vírus (ASPV) két fehérjére szelektáltak ki két aptamert és tanulmányozták gyakorlati alkalmazhatóságukat. A két aptamer, dot blot eljárásban, 3 növényvírus közül szelektíven azonosította az ASPV-t. Ezután antitesteket használó szendvics ELISA mintájára a két aptamer segítségével kidolgozták a double oligonucleotide sandwich ELONA, azaz DOS-ELONA eljárást és bizonyították, hogy az új módszerek nem csak helyettesíthetők, de érzékenységben akár felül is múlhatják az antitesteken nyugvó víruskimutatási metodikákat. Eredményeik igazolják, hogy az aptamerek potenciális receptormolekulái lehetnek a vírusdiagnosztikai eljárásoknak.

Ebben a részben, volt egy számomra nehezen értelmezhető rész. A szövegben szerepelt, hogy a DOS-ELONA rendszer 100 ng/ml koncentrációig lineárisan detektálta a PSA-H kapszidfehérjét. Az eredmény bemutatására hivatott 6.33. ábrán viszont az X tengely 0-25 $\mu\text{g/ml}$ terjedelmű, azaz a 100 ng/ml = 0,1 $\mu\text{g/ml}$ csak az X tengely legelején található nagyon kis sáv. Valóban csak ezen a kis részen lineáris az összefüggés, vagy nem egy az egyben kell a linearitást és az ábrát értelmezni? Az ehhez az eredményhez és ábrához megidézett 273-as számú cikk számomra nem erről szól. Jelent meg publikáció a DOS-ELONA módszerről?

A következő részben a gyermekkori fertőzésekben, asztma hajlamosságban illetve asztma extracerebrációban is jelentős RSV vírus kimutatására alkalmas aptamerek szelektációjának leírásáról, majd a legígéretesebben működő aptamer részletesebb vizsgálatáról olvashatunk. Eredményeik igazolták, hogy teljes vírusra kivitelezett SELEX olyan aptamert eredményezett, amely valós minták RSV-analízisére is jól alkalmazható.

A spiegelmerok a természetes nukleinsavakban található D-cukrok L enantiomer párját tartalmazó oligonukleotidok, legfontosabb előnyük, hogy a nukleázok számára felismerhetetlenek. A dolgozatban példaként a kardiális troponin I-re szelektív spiegelmerok kiválasztásáról és

vizsgálatáról olvashatunk. Eredményeik bizonyították, hogy a SELEX-ben használt építőp racionális tervezésével és a spiegelmerjelöltek szűrésével fiziológias eredetű mintákban is jól alkalmazható spiegelmerek lehet szelektálni. Kidolgoztak egy eljárást a doménalapú spiegelmerszelekcióra, és ennek segítségével elsőként sikerült diagnosztikai potenciállal rendelkező spiegelmereket azonosítani. Paramétereik alapján a spiegelmerek a kardiális troponin I diagnosztikában jelenleg alkalmazott ellenanyagoknál kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkeznek.

Kidolgoztak kardiális troponin I mérésére alkalmas spiegelmer-antitest és spiegelmer-spiegelmer szendvics rendszereket. A rendszerek szelektivitása megfelelőnek bizonyult, vészsérumban is alkalmazhatóak voltak, a közeli homológ vázizom troponinnal nem mutat keresztreaktivitást, de érzékenységük messze elmaradt a napjainkban rutinszerűen alkalmazott cTnI-koncentrációt meghatározó módszerekétől.

A dolgozat következő része az összefoglaló, amelyben talán előnyösebb lett volna kicsit jobban kiemelni a saját fejlesztéseket, eredményeket.

Az irodalmi jegyzékben néhány cikk adatai hiányosan szerepelnek, pl. 38, 39, 227, 228, 229, 231, 241.

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim:

1. Milyen jövőjét látja az aptamerek vagy a spiegelmerek alkalmazásának terápiás és diagnosztikai eljárásokban?
2. Milyen előnyei lehetnek az aptamer alapú vírusdiagnosztikának a PCR (RT-PCR) alapú módszerekkel szemben?
3. Milyen diagnosztikai célokra javasolna DOS-ELONA módszert, kizoríthatja-e esetleg valahol az ELISA-t?
4. A fehérjeszintézisben használt búzacsíra-alapú rendszernél van-e lehetőség a humán szervezetre jellemző poszttranszlációs módosításokra?
5. Immunogének-e az aptamerek/spiegelmerek?

Az értekezés és a megadott publikációk alapján a következőket fogadom el a jelölt és kutatócsoportja tudományos eredményeként:

1. Igazolták, hogy a búzacsíra alapú, sejtmentes transzláció hatékonyan alkalmazható eukarióta fehérjék gyors és költséghatékony előállítására. Bevezették a ligálás-független klónozást. A kidolgozott módszerrel előállították és tisztították a GLUT10 transzportfehérjét. Elsőként bizonyították, hogy a GLUT10 fehérje a dehidroaszorbát transzportjáért felelős.
2. Bővítették a búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs vektorcsaládot.

3. Az aptamerszelekcióhoz szükséges nagyszámú, megfelelő mennyiségű és minőségű egyszálú DNS előállítására kidolgozták a primerblokkolt aszimmetrikus PCR-t.
4. Azonosítottak módosított nukleotidokat tartalmazó aptamerek szintézisére alkalmas termofil DNS polimerázokat.
5. Kidolgozták a DOS-ELONA eljárást és bizonyították, hogy nem csak helyettesítheti, de érzékenységben akár felül is múlhatja az antitesteken nyugvó víruskimutatási metodikákat.
6. A SELEX módszer segítségével több különböző, fehérje- és vírusspecifikus aptamert és spiegelmert fejlesztettek ki. Ezen fejlesztések egy részét publikálták és több, ipari együttműködések keretében kifejlesztett molekula gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata jelenleg is folyamatban van.
7. Kidolgoztak kardiális troponin I mérésére alkalmas spiegelmer-antitest és spiegelmer-spiegelmer szendvics rendszereket.

Összefoglalva megállapítom, hogy Mészáros Tamás MTA doktori értekezése rendkívül magas színvonalú, számos nemzetközileg is jelentős kutatómunka és fejlesztés leírását tartalmazza. Az értekezés és a publikációk alapján Mészáros Tamás az aptamerkutatásban vitán felül a világ élvonalába tartozik. Mindezek alapján a doktori értekezés elfogadását, a nyilvános védés kitűzését és az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2022. 01. 17.



Dr. Szalai Csaba, MTA doktora, egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem, Genetikai Sejt és Immunbiológiai Intézet

Heim Pál Kórház