

Válaszok Dr. Puskás László opponensi kérdéseire

Legelőször is köszönetemet fejezem ki Dr. Puskás Lászlónak nem csak az értekezés alapos bírálatáért, hanem az általa feltett kérdésekért, melyek nyomán a dolgozatban nem tárgyalt tématerületek is ismertetésre kerülhettek. A Bíráló kérdéseire az alábbiakban kívánok válaszolni:

1. A detektálható markerként használható plazmafehérjék esetében óriási koncentráció különbségek miatt fontos a magas szelektivitás, amely a kiépítendő diagnosztikai teszt érzékenységét is befolyásolja. Kell-e vagy használtak-e depletált plazmát a kardiális troponin I-vel kölcsönható spiegelmeres teszthei során, vagy ez a megközelítés pont az érzékenység kárára történne?

Az opponens egy olyan kérdést vetett fel, aminek tanulmányozására kutatócsoportunk rendkívül sok pénzt és energiát áldozott. Az aptamerek előállításáig mindaddig öncélú, amíg nem igazolódik róluk, hogy valódi diagnosztikai vagy terápiás potenciállal rendelkeznek, így az alkalmazhatóságukra irányuló kísérletek elengedhetetlenek. Megjegyzendő, hogy az aptamerek szakirodalmában rengeteg közlemény nem felel meg ennek a feltételnek, így számos ismert aptamer nem bír gyakorlati jelentőséggel.

Laboratóriumunk infrastrukturális adottságainak megfelelően elsősorban diagnosztikai célú aptamerek szelektívára fókuszáltunk, melyek közül többnek is kardiiovaszkuláris elváltozások során megjelenő fehérjék kimutatása a kitűzött alkalmazási területe. Ennek következtében ezekkel az aptamerekkel szemben támasztott alapvető elvárás, hogy vérérszékben, illetve plazmában is képesek legyenek a biomarkerek diagnosztikai releváns fehérjekoncentrációinak mérésére. Kutatócsoportunk ezekre a kísérletekre az értekezésben ismertetett, mosás nélküli, homogén AlphaScreen-t, illetve ennek a kimondottan szérumban és plazmában történő alkalmazásra kifejlesztett változatát, az AlphaLISA-át használta. A spiegelmereinkkel kivitelezett méréseink során ezekben az elrendezésekben a cTnI kimutatási határa 1 ng/ml-nek adódott, ami nagyságrendekkel alacsonyabb a kereskedelmi forgalomban elérhető high-sensitivity cTnI készleteknél látottaknál. Az 1 ng/ml detekciós limitet a mérési elrendezések sokrétű változtatásával - a spiegelmeres koncentrációja, illetve hozzáadási sorrendjük, inkubációs idő -, hosszas kísérletezéssel sikerült elérni. Habár az AlphaLISA 615 nanométeres emissziós maximuma nem esik egybe a hemoglobin abszorpciós maximumával, megvizsgáltuk, hogy a hemoglobin szelektív eltávolítása növeli-e a rendszer cTnI érzékenységét. Ezekhez a kísérletek a Biotech Support Group HemoVoid és HemogloBind készleteit használva először a mintákból eltávolítottuk a hemoglobint, a depletált mintákhoz adtuk ismert mennyiségű cTnI fehérjét, majd AlphaLISA-val meghatároztuk a cTnI koncentrációt. A mérési eredményeink azt mutatták, hogy a hemoglobin eltávolítása nem növeli a rendszer érzékenységét. Meglátásom szerint, a kimutatási határ további csökkentése a mérési elrendezés további optimalizálásával lenne lehetséges, a viszonylagosan alacsony érzékenység hátterében nem a hemoglobin - és az egyéb vérben magas koncentrációban jelen lévő fehérjék - állnak.

2. A dolgozat kivételes előnye, hogy az alkalmazott és ipari kutatásban is felhasználható új vírusdiagnosztikai megoldásokat fejlesztett. A dolgozat aktualitását és fontosságát mi sem bizonyítja jobban, mint a korunk új pandémiája, a COVID-19. Pont az aktualitás miatt nagy hiányérzete van a bírálónak, mert sem az irodalmi bevezetésben, sem a tárgyalásban nem tekint ki az aptamerek vagy a spiegelmeres esetleges Sars-Cov-2 diagnosztikájára és terápiájára. Dolgozott-e Tamás kutatócsoportja ezen a területen vagy van-e olyan

*információja, hogy mások kifejlesztettek-e aptamer alapú diagnosztikai eszközt? Ha nem, akkor mi lehet ennek az oka?*A bíráló kritikáját teljese mértékben elfogadom, annál is inkább, mivel az értekezés elkészítése részben a COVID-19 időszakra esett. Bennem is felmerült egy ilyen fejezet beillesztése, de végül is egyrészt terjedelmi okokból, másrészt pedig a tématerület akkori kiforrotlansága miatt elvettem ezt a gondolatot. Továbbá a COVID-19-cel kapcsolatos aptamer szakirodalom tárgyalását azért sem tartottam kiemelt jelentőségűnek, mert laboratóriumunk nem végzett SARS-Cov-2-vel kapcsolatos kutatásokat. A jelzett hiányosságot pótlandó az alábbiakban rövid áttekintését adom a SARS-Cov-2-re irányuló aptamer kutatásoknak.

2009-ben az első, a legutóbbinál sokkal kevésbé drámai következménnyel járó SARS-Cov járvány vírustörzsének N burokfehérjéjére szelektáltak RNS aptamereket. A szelektált aptamerekkel egy hibrid ELISA rendszert alakítottak ki, melyben az aptamer befogó, míg az N protein specifikus, alkalikus foszfatáz konjugált ellenanyag detektáló molekulaként szolgált. A létrehozott elrendezés a hagyományos ELISA-hoz hasonló szenzitivitással és specifitással rendelkezett. A szerzők nanolitográfiával - a vázolt hibrid ELISA logikáját követve – egy olyan nanoarray rendszert is kifejlesztettek, amely fM-os koncentráció tartományban is képes volt a célfehérje kimutatására. <https://doi.org/10.1039/B906788D> Egy másik kutatócsoportban 2011-ben a fent jelzett vírustörzs ugyanazon fehérjéjére állítottak elő DNS aptamereket, és Western blot tálal igazolták szelektivitásukat.

[10.1016/j.jbiosc.2011.08.014](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.014) A szelektált aptamerek egyikéről, illetve annak csonkolt változatáról igazolták, hogy képes SARS-Cov-2 N fehérjéjének felismerésére is.

[10.1007/s12250-020-00236-z](https://doi.org/10.1007/s12250-020-00236-z) Megjegyzendő, hogy az eddig felsorolt kísérletek mindegyikében ideális pufferekben az N protein mutatták ki, így az aptamerek valós mintákon történő alkalmazhatóságára nem vonhatók le messzemenő következtetések. A COVID-2019 megjelenésével lendületet kaptak a SARS-Cov-2 teranosztikára alkalmas aptamerek előállítására irányuló kutatások. Az N fehérjére szelektált DNS aptamerekkel hibrid (ellenanyag-aptamer) és tisztán aptamer szendvics ELISA rendszereket és hibrid laterális áramlásos teszt állítottak össze, mellyel szérumban és vizeletben is képesek voltak a fehérje 1 ng/ml koncentrációban történő kimutatására. [10.1039/DOCC03993D](https://doi.org/10.1039/DOCC03993D) A hibrid rendszer jelzett érzékenységet több mint két nagyságrenddel növelték, mikrofluidika, fluorogén szubsztrát és fluoreszcens mikroszkópos detektálás alkalmazásával.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122847>

A vírus tüskefehérje ACE-2 kötéseért felelős doménjére szelektált 2-fluoro-pirimidin tartalmú RNS aptamerekkel sikerült a tüskefehérjét kifejező vírusszerű részecskék fertőzőképességet gátolni, és az is igazolásra került, hogy módosított nukleotidoknak köszönhetően az aptamerek szérumban tartalmú oldatban 24 órán át intaktak maradnak.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2112942118> A szerzők emellett azt is megfigyelték, hogy egy neves folyóiratban, korábban közölt tüskefehérjére szelektált aptamer a hexahisztidin jelölést hordozó fehérjékkel általánosságban kölcsön hat. [10.1021/acs.analchem.0c01394](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01394) A SARS-Cov-2 iránti hatalmas érdeklődés teoretikailag is megkérdőjelezhető kísérletek elismert lapokban történő megjelenését is magával hozta. Ennek talán legekleatásabb példája az a tanulmány, amely egy II. klinikai fázisban lévő, autoellenanyagok neutralizálására fejlesztett aptamer tüskefehérje eredetű peptidekhez történő kötődését vizsgálja NMR-rel, CD-vel és ITC-vel, és megállapítja, hogy az aptamer közel 100 μM K_D értékkel kötődik a peptidekhez.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05421>

A további három SARS-Cov-2 szelektív DNS aptamer egyikét diagnosztikai, míg a másik kettőt terápiás céllal izolálták. Az előbbi esetben a tüskefehérje prefúziós trimerjét használták szelektációs célmolekulaként, és a kapott aptamerekkel direkt ELISA elrendezést alakítottak ki

az ellenanyagot aptamerrel helyettesítve. A nazofaringiális keneteket RT-PCR-rel és az előbb leírt megközelítéssel értékelve azt találták, hogy két módszer szenzitivitása és specificitása összevethető. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.06.014> A terápiás alkalmazásra fejlesztett aptamerek esetében a tüskefehérje ACE2 receptor kötéseért felelős doménjét célozták meg a szelekciós során. A legígéretesebb aptamernek létrehozták a cirkularizált változatát, majd megvizsgálták vírusfertőzés gátló képességét. Eredményeik alapján a cirkuláris aptamer IC₅₀ értéke 0,49 nM. <https://doi.org/10.1002/ange.202100225> A másik, terápiás potenciállal rendelkező aptamerek előállítására irányuló közleményben ugyanúgy a tüskefehérje előbb taglalt doménjét használták szelekciós célmolekulaként, és ez a kutatócsoport is sikeresen izolált a vírus fertőzőképességét gátló aptamereket. A kísérletek tanúsága szerint ezek az aptamerek minden további módosítás nélkül is stabilak maradnak humán szérumban. <https://doi.org/10.1002/anie.202100345>

A SARS-Cov-2-vel kapcsolatos aptamer szakirodalom döntő része a korábban szelektált aptamerek segítségével kivitelezett különböző szenzorok fejlesztését ismerteti. Ezek részletes tárgyalása túlnyúlik szakmai kompetenciámon, így csak néhány példát szeretnék felsorolni. A kivitelezhetőség és költséghatékonyság szempontjából fontosak a laterális áramlásos tesztek. Egy, az idei évben megjelent publikáció egy olyan, arany nanorészecskékkel és biotinnal módosított aptamerek alkalmazásával összeállított tesztet mutat be, amely egy óra alatt, orrkenetből 10⁷ vírus/ml koncentráció kimutatására is használható, és a mérés becsült költsége 1 USD-nak adódott.

doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00554

A felületerősített Raman-spektroszkópia (SERS) viszonylagos költséghatékonysága magas érzékenységgel párosul, ennek következtében az aptamerek felhasználásának egy intenzíven tanulmányozott területe. Egy korábban tüskefehérjére szelektált aptamer aranyfelületre történő mobilizálásával összeállított SERS rendszer 10 PFU/ml kimutatási határral volt képes a SARS-Cov-2 detektálására.

<https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00596> Az aptamerek SERS-ben való alkalmazhatóságát igazolja az a közlemény is, amelyben három módosításmentes kölcsönhatás-vizsgálati módszert - a biolayer interferometriát, a felületi plazmonrezonanciát és a SERS-t - vetettek össze SARS-Cov-2 detektálásra. A mérési eredmények alapján a SERS nagyságrendekkel érzékenyebb volt a másik két megközelítésnél, képes volt pM alatti tüskefehérje koncentrációk mérésére. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00008>

3. Miért klónozást és baktériumkolóniák elemzési módszertanát követte, és miért nem alkalmazott szekvenálást az egyedi, már szelektált szekvenciák sorrendjének meghatározására? Bizonyára a több szekvencia adatból, és a nagyobb merítésből több, hasonló vagy jobb szelektivitású vagy kötődésű aptamer is kikerülhetett volna. Bár az eredmények magukért beszélnek, és így is kapott minden egyes alprojekt esetében több diagnosztikailag alkalmazható aptamert, néhány esetben azonban csak párat, ami a szerencsének is betudható. A nagyobb szekvenciaszámból részletesebb populáció analízist, bioinformatikai elemzést is el lehetett volna végezni, és több szerkezeti elemre, kölcsönható motívumra is felhívhatta volna a figyelmet.

Egyre több kutatócsoport határozza meg az aptamerjelöltek szekvenciáját nagy áteresztőképességű szekvenálással (HTS), így a kérdés felvetése nagyon időszerű. Laboratóriumunk is alkalmazta ezt a megközelítést, azonban több okból kifolyólag egyelőre nem használjuk rutinszerűen. Elsőként azt emelném ki, hogy a jelenleg elérhető, aptamerszelekció HTS adatainak kiértékelésére kifejlesztett programok döntő része csak szekvencia klaszteranalízist, és bizonyos programok esetében motívumkeresést foglal

magába. Az utóbbi időben megjelentek olyan kódok is, amelyek a szabadentalpia számításával a lehetséges másodlagos szerkezetek kialakulását is figyelembe veszik az analízis során, így nagyobb eséllyel jósolják meg a valóban funkcionális aptamereket. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.009> Ismereteim szerint azonban olyan kód nem elérhető, amely az aptamerekben általánosan megjelenő G-quadruplexet is számításba veszi, mint lehetséges másodlagos szerkezetet, így prediktív értéke ezeknek a programoknak is korlátozott. Mindezek figyelembevételével ezek a módszerek legfeljebb az aptamerjelöltek in silico szűrésére alkalmasak. A bevett gyakorlat szerint az in silico kiértékelés alapján legígéretesebb jelöltek közül néhányat szintetizálnak, majd kísérletes megközelítésekkel részletesen karakterizálják őket. Végző soron a rendelkezésre álló nagyszámú szekvencia nem egyenlő azzal, hogy sok aptamert vizsgálnak, ezért szekvenciák plusz ismerete nem jelent előnyt. Emellett hátránya is van a HTS-sel történő aptamerszekvencia meghatározásnak, nevezetesen az egyedi aptamerek fizikailag nem állnak rendelkezésre, így minden egyes aptamert kémiai szintézissel kell előállítani a további vizsgálatokhoz.

E tényezők fényében úgy láttuk, hogy minél nagyobb számú aptamer kísérletes karakterizálása jobb eséllyel eredményezheti valóban funkcionális aptamerek azonosítását. Kutatócsoportunk jelenlegi rutin eljárása, hogy a bakteriális kolóniákból Sanger szekvenálással meghatározzuk az aptamerek szekvenciáit, ugyanakkor a kolóniákból az értekezésben ismertetett aszimmetrikus PCR-rel előállítjuk a kísérletes karakterizáláshoz szükséges oligonukleotidokat, melyeket az AlphaScreen alkalmazásával szűrünk. Az utóbbi időben egyre több kutató ismeri fel, hogy az aptamerszelekció sikeréhez nagyban hozzájárul a nagy áteresztőképességű kísérletes szűrés alkalmazása.

<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00724>

4. A szekvencia információval kapcsolatos, jövőbe mutató kérdésem, hogy a jelölt reálisnak tartja-e azt a teljesen in silico megoldást, melynek során az adott célmolekula nagyfelbontású (mondjuk röntgenkristallográfiai) adatok ismeretében jósolhatók-e a jövőben potenciális aptamer molekulák. Mivel az aptamerek építőkövei egyszerűbbek a fehérjéknél, ezért elvileg kisebb számítási kapacitással specifikus aptamer szekvenciák a jelölt szerint szelekció nélkül, pusztán számításokkal azonosíthatóak lehetnek-e?

A kérdésre csak nagyon visszafogottan válaszolnék. Egyrészt a felvetés adekvát tárgyalása messze túl van a szakmai kompetenciámon, másrészt látva a Google Deep Mind és az EMBL összefogásából született fehérjeszerkezet jósoló AlphaFold sikerét elképzelhető, hogy az aptamerek in silico tervezésénél is robbanásszerű fejlődésnek lehetünk tanúi a közeli jövőben.

Az AlphaFold alapját a gépi tanuláshoz felhasználható több százezer kísérletesen meghatározott fehérjeszerkezet adja, ezeket a már ismert szerkezeteket felhasználva nagy biztonsággal képes megadni az ismeretlen fehérjeszerkezeteket az elsődleges fehérjeszerkezetből kiindulva. Az aptamerek esetében ez a megközelítés jelenleg elképzelhetetlen, mivel legfeljebb néhány tucatnyi aptamernek ismerjük a kísérletesen meghatározott szerkezetét, aptamer szerkezeti adatbázisról nem beszélhetünk. A fehérjékkel összevetve az aptamerkutatók gyerekcipőben jár, egyelőre csak olyan adatbázis érhető el, amely listázza az eddig közölt aptamerek szekvenciáit, szelekciós körülményeit és disszociáció állandójukat. Az adott fehérjékre szelektív aptamerek in silico azonosítását tovább nehezíti az a megfigyelés, hogy az aptamerek a fehérjével történő kölcsönhatás során veszik fel térbeli szerkezetüket. Ennek következtében az oldatban lévő, szabad aptamerek szabadentalpia számításával jósolt szerkezete nem jelent igazi segítséget.

Ismereteim szerint jelenleg nincs olyan törekvés, amely az aptamerek teljes mértékű in silico tervezésére irányul. Néhány közlemény adott oligonukleotid szekvenciák fehérjével történő kölcsönhatását jósolja különböző algoritmusokkal, de ezek egyikében sem erősítik meg a számított eredményeket kísérletes mérésekkel, így gyakorlati jelentőségük megkérdőjelezhető. <https://github.com/nedaemami/AptaNet>

5. Az aptamerek szelekciója során vagy már ismert szekvenciák ismeretében érdemesnek látja-e a jelölt több mutáció beépítését a szekvenciákba, akár véletlenszerűen is egy utolsó fázisban, és ezek után új szelekcióval hatékonyabb aptamereket nyerni? Van-e erre irodalmi hivatkozás és milyen módszerek jöhetnek szóba a mutációk létrehozására?

Habár ez a megközelítés távolról sem általános, a szakirodalomban található néhány példát az aptamerek ily módon történő optimalizálására. Alapvetően két módon lehetséges a mutációs rátát növelni a PCR során: i.) A DNS polimeráz által elfogadott, nukleozid analóg (pl. 8-oxo-dG) reakció elegyhez adásával mismatch-et hozunk létre.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0049> ii.) Error prone polimerázt alkalmazunk a PCR során. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0803s51> Mindezek mellett a Mg, illetve Mn ionok koncentrációjának növelésével is emelhető a reakció mutációs rátája.

<https://doi.org/10.1101/gr.2.1.28>

Laboratóriumunk nem alkalmazta ezt a módszert, így ezzel kapcsolatos személyes tapasztalatokat nem tudok megosztani, de az eljárást alkalmazó közlemények elenyésző száma jelezheti, hogy a szelekciót követő mutagenézis nem növeli szignifikánsan az aptamerek célmolekula-kötőképességét. Habár jóval költség- és időigényesebb, az igazán célravezető módszer, hogy az aptamer-célmolekula szerkezetét meghatározzuk, és ennek ismeretében célzottan módosítják a nukleinsav-szekvenciát.

6. Az aptamerek jelenlétének bő két évtizede alatt miért eredményezett csak egy klinikai megoldást és a COVID-19 pandémia idején miért nem nyúltak az aptamerekhez a fejlesztők akár a diagnosztika, akár a terápia területén. Kíváncsi lennék a jelölt kritikai véleményére, miközben kitérne arra, hogy milyen új, aptamerekkel kapcsolatos stratégiák, újítások (akár saját, akár irodalmi) vannak, amelyek alternatív megoldást jelentenek a vírusdiagnosztikában és terápiában.

Ez a kérdés azt hiszem, sokunkban felmerül, és talán nem is lehet rá egyértelmű választ adni. Amint az értekezésem is jelzi, én személy szerint hiszek az aptamerek teranostikai potenciáljában, és a gyakorlati alkalmazásuk fájdalmasan nagy hiátusának hátterében elsősorban piaci tényezőket vélek felfedezni. Az alap kutatásban az aptamerek népszerűsége töretlen, évente ezres nagyságrendben jelennek meg a tématerülethez kapcsolódó publikációk. Az aptamer kutatás hangsúlya az utóbbi években a szelekcióról eltolódott a szenzorfejlesztésekben történő alkalmazásuk felé. E kísérletek eredményeként számos rendkívül nagy érzékenységű és szelektivitású elektrokémia, illetve optikai szenzor került kifejlesztésre. Számomra talány, hogy ezek miért nem keltik fel a vállalatok érdeklődését, miért nem jelennek meg a piacon.

Számos olyan közlemény jelenik meg, amely a szelekciós térfogat minimalizálását, illetve kevesebb szelekciós lépés alkalmazását teszi lehetővé. Figyelembe véve a SELEX anyagigényét és idejét, az aptamer előállítási folyamatnak ez a lépés költségben és időben is csak a töredékét teszi ki. A korábbiakban már említettem, hogy meglátásom szerint a SELEX-hez kapcsolódó fejlesztések közül azok az igazán jelentősek, amelyek az aptamerjelöltek nagy áteresztőképességű, kísérletes szűrését teszik lehetővé. Ezt az igényt

szem előtt tartva fejlesztettük, ki az értekezésben ismertetett PBA-PCR és kombináltuk az AlphaScreen módszerrel.

Az aptamerek terápiás potenciálját a 2021-es helyzet szerint közel húsz I. és II. klinikai fázisban lévő aptamer és spiegelmer igazolja. <https://doi.org/10.3390/life11030193> Az aptamer alapú gyógyszerfejlesztéseknél az egyik fő kihívás a farmakokinetikai tulajdonságok optimalizálása. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566322002081> Amint a 2. kérdésre adott válaszom illusztrálja, a COVID-19 pandémia idején intenzíven folytak a SARS-Cov-2-re történő aptamerszelekciók és a kapott aptamerekkel történő diagnosztikai fejlesztések. A SARS-Cov-2 kutatásokkal kapcsolatos eredmények egy további magyarázattal szolgálhatnak az aptamer gyakorlati alkalmazásokban való alacsony penetrációjára. Az ott látott tüskefehérjére szelektált kis specificitású aptamer közleményben történő megjelenése valószínűleg nem egyedi eset. Számos olyan közlemény jelent meg, amelyben a szelektált aptamereket optimális pufferben, néhány lehetséges kereszt kölcsönható alkalmazásával karakterizálták, minek következtében gyakorlati alkalmazásokban gyakran nem tudnak bizonyítani. Ezek a közlemények sokat ártottak az aptamerek kredibilitásának, és minden bizonnyal számos fejlesztőt bizonytalanítottak el.

7. Megkérdezném, hogyan látja a jelölt a diagnosztikai aptamerek szabadalmaztathatóságát? Mivel az alpmódszerek többsége már több mint húsz éve történt, ezért a technológia mellett maguk a szelektált aptamerek és azok szekvenciái védhetők-e szabadalommal?

A SELEX leírói Tuerk and Gold 1990-ben levédtek az eljárást, de a szabadalmi védelem 2012-ben lejárt, így a módszer szabadon használható. Néhány vállalat jelenleg is fenntartja szabadalmat az általa kifejlesztett módosított SELEX módszerekre, de általánosabb az egyes aptamerek szekvenciáinak a védelme. Ezek a szabadalmak hasonlatosak az ellenanyagoknál láthatóhoz, amennyiben egy-egy aptamerszekvencia megjelölt alkalmazásokra történő használata védett.

Végül ismételtén szeretném kifejezni köszönetemet a bírálatért és különösképpen a motiváló kérdésekért.

Budapest, 2022. június 7.



Mészáros Tamás

