

## Opponensi Vélemény

*Dr. Mészáros Tamás: „Diagnosztikai felhasználásra alkalmas aptamerek fejlesztése és vizsgálata“ c. MTA doktori értekezéséről*

A modern biológiai tudomány utóbbi nyolcvan évének története a folyamatos módszertani forradalom időszakaként jellemezhető, amely a biológiai rendszerek többszintű és átfogó, rendszerszintű tanulmányozását tette lehetővé. A korai időszakban a különböző megbetegedések terápiás megoldásait azonnal követte a diagnosztika, a betegség megbízható kimutatása, a kezelés hatékonyságának nyomonkövetése. Az elmúlt időszakban a diagnosztika a terápiával egyidőben, vagy megelőzve azt fejlődik, az ún. teranosztikai módszerekkel. Ennek során nem csak a kimutatásra, hanem a gyógyszer-célpontok felderítésére is sor kerül. Az ilyen megközelítések leginkább ismeretes molekulái a monoklonális antitestek, amelyek nagy affinitással és szelektivitással képesek kimutatni és/vagy neutralizálni az adott betegségre jellemző, ott megjelenő, túltermelt vagy hibásan kifejeződő fehérjéket. A nukleinsav alapú diagnosztikai módszereket szinte kizárólag az adott patogén, patológiás szövet, sejt adott nukleinsav szekvenciájának a kimutatására alkalmazzák. Az aptamerek kifejlesztése a nukleinsavak egy merőben új alkalmazását jelentették a kismolekulák, fehérjék detektálására képesek specifikus kötődésük által. Bár a módszertan alapjait közel harminc éve dolgozták ki, és néhány kezdetleges próbálkozás volt a Szegedi Biológiai Központban RNS aptamerek szintézisére, Mészáros Tamás úttörő volt a DNS aptamerek és a spiegelmerok létrehozásában. A különböző diagnosztikában is felhasználható aptamerek magyarországi bevezetésében vitathatatlan érdemei vannak.

A jelölt az értekezésben összefoglalt eredményeit 16 nemzetközi dolgozatban közölte, amelyek közül 11 utolsó szerzős munka. Az értekezéshez 10 további közlemény kapcsolódik, melyek közül 1 első és 2 utolsó szerzős, valamint további 3 utolsó szerzős dolgozat. A jelölt eredményeihez kapcsolódó publikációi elsősorban módszertanok közzétételére és növénybiológiai témákra specializálódott folyóiratok jelentek meg, melyek közül 1 Plant Cell és 1 EMBO Journal közlemény. A megjelent közlemények mellett fontos megjegyezni, hogy

a dolgozatban bemutatott eredmények nagy része ipari munka keretén belül valósult meg, így azok publikációja nem történehetett meg.

A dolgozat nyelvezete kiváló, csak kevés, hibát, elütést tartalmaz, melyeket felsorolok, de ezek abszolút nem csorbítják a dolgozat minőségét:

- 29. oldalon PCC helyett helyesen POC
- 38. oldalon Sosztak helyett Szostak (lengyel származása miatt a kiejtéssel nekünk ellentétes s-sz)
- 41. oldalon részletekbemenően helyett részletekbe menően
- 53. oldalon voltammetria helyett voltametria
- 56. oldalon szemőbesültünk
- 57. oldalon ezek az adottak
- 106. oldalon az tény helyett az a tény
- 108. oldalon szintetizáltatuk

Megfogalmazásban túlzás a 38. oldalon írt „in vitro evolúcióval bármilyen molekulára előállítható aptamer”. Ez természetesen olyan értelemben nem igaz, hogy specifikus aptamer, mert vannak olyan extrém tulajdonsággal (méret, hidrofobicitás, oldhatóság) rendelkező molekulák, amelyre ez nem igaz (szénhidrogének, alacsony molémasúlyú alkoholok, zsírsavak).

Az irodalmi áttekintés részletes, jó értelemben vett tankönyvszerű, érthető, amely lefedi mind a diagnosztikailag fontos fehérjecélpontok termelésének és tisztításának módozatait, az ellenanyagok diagnosztikai alkalmazásait, az aptamerek történetét, szelekcióját, aptamer-ligand kölcsönhatások molekuláris hátterét. Külön öröm volt látni a külföldi eredetű szavak és kifejezések magyarban meghonosult vagy meghonosítandó precízen használt szakszavait.

Az anyagok és módszerek fejezet kurta (mindössze 3 oldal), de az akadémiai doktori dolgozatba nem is valók a közleményekben megtalálható, ott részletezett módszerek. A felsoroltak közül a bíráló nem érti, hogy miért pont az ASPV burokfehérje-specifikus aptamerek szelekciója található csak, és a kardiális troponinra és RSV-re specifikusakra vonatkozó módszertan miért nincs legalább rövidített formában jelen.

Az ábrák, táblázatok jó minőségűek, könyvbe illőek, csak azért nem tökéletesek, mert néhány ábrarész homályos (pl. 6.30, 6.34.B, 6.44).

Dr. Mészáros Tamás akadémiai doktori értekezésében fontosabb új tudományos eredményei a következők:

1. in vitro transláció technikát alkalmazta és továbbfejlesztette, ehhez új búzacsíra kivonathoz alkalmazható vektorcsaládot hozott létre
2. Módszertani fejlesztéseket végzett különböző DNS és spiegelmer aptamerekhez, melyek közül kiemelendő a primerblokkolt aszimmetrikus PCR és a módosított nukleotidokat elfogadó polimerázok alkalmazása
3. Alma törzsgödrösödés (ASPV) és légúti óriássejtes vírus (RSV) vírusszelektív aptamerek kifejlesztése és tesztelésük
4. Kardiális troponin I-re szelektív spiegelmerek kifejlesztése és alkalmazása spiegelmer-antitest és spiegelmer-spiegelmer szendvics rendszerrel.

Kérdéseim, megjegyzéseim elsősorban a jelölt eredményeinek diagnosztikai alkalmazhatóságával, technológiai megoldásokkal kapcsolatosak.

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 spiegelmerek tesztjei során, vagy ez a megközelítés pont az érzékenység kárára történne?
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?

Kiemelendő a jelölt alapos, minden részletre kiterjedő módszertani stratégiája, ami az alkalmazott kutatások során kritikusan fontos. Munkája azért is eredményezett több diagnosztikai jelentőségű aptamert, mert több kontrollt már a szelekció során is beépített (pl. kontra-szelekció). Az aptamer szelekciók után kapott szekvenciák száma esetében azonban a

bírálóban felmerült, hogy miért csak (maximum 100) szekvencia meghatározása történt – ez több esetben jóval kevesebb volt. (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.

A szekvencia információval kapcsolatos, jövőbe mutató kérdésem (4), 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?

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?

A technikai fejlesztések, a sikeres alkalmazások, és az új tudományos problémák felvetése alapján elmondhatjuk, hogy a dolgozat magas tudományos értéket képvisel, és tartalmi szempontból is megfelel a doktori követelményeknek. Külön kiemelendő a dolgozatban bemutatott eredmények nemcsak lehetséges felhasználása került igazolásra, ami egy alapkutató végállomása szokott lenni, hanem a befejezett munkák során kidolgozott aptamerek már igazoltan közvetlen ipari alkalmazást is nyertek. Ezt a jelölt számos példán keresztül bizonyította.

A jelölt több helyen is utalt a különböző fajta aptamerek hátrányaira és azokat célzó megoldásokra, a bírálóban még is maradt egy kismértékű kétely azzal kapcsolatban, hogy 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 (6), miközben kitérne arra, hogy milyen új, aptamerekkel kapcsolatos stratégiák, újítások (akár saját, akár irodalmi) vannak, amelyek alternatív megoldást jelentenek a vírusdiagnosztikában és terápiában. Részben ehhez kapcsolódóan megkérdezném (7), hogyan látja a jelölt a diagnosztikai aptamerek szabadalmaztathatóságát? Mivel az alapműszerek többsége már több mint húsz éve történt, ezért a technológia mellett maguk a szelektált aptamerek és azok szekvenciái védhetők-e szabadalommal?

Az utóbbi kérdések nem érinti a dolgozat tudományos értékét, de a bíráló ezt különösen fontosnak tartja az új biomarkerek diagnosztikai alkalmazására irányuló fejlesztésekben, és azok klinikai használhatóságában.

Bírálatomat összefoglalva megállapítom, hogy Dr. Mészáros Tamás doktori disszertációja mind formai, mind tartalmi szempontból teljes mértékben kielégíti, az MTA doktori cím megítéléséhez szükséges kritériumokat. Értekezésében bemutatott munka számos izgalmas és fontos technológiai újítást tartalmaz, és egy olyan kutatási sorozatot ír le, amelynek szerteágazóan eredményes szeletei kiválóan bizonyítják a jelölt munkásságának diagnosztikai alkalmazhatóságát, és számos eredeti és tudományos eredményhez vezető eredményességét. Ezek alapján javaslom a nyilvános vita kitűzését, és a sikeres védést követően az MTA doktori cím megadását.

Szeged, 2022. március 22.

  
Dr. Puskás László, az MTA doktora