

## **Indoklás a STORM szuper-rezolúciós alapelvvel működő, élősejtes vizsgálatokra alkalmas biológiai képalkotó rendszer közbeszerzési eljárás jogalapjának alátámasztására**

A Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete (MTA KOKI) a közbeszerzési eljárásra a Kbt. 98. § (4) bekezdés a) pontját jelölte meg jogalapként, tekintve, hogy a beszerezni kívánt élősejtes szuper-rezolúciós mikroszkóp konstrukció nincs kereskedelmi forgalomban, hanem kifejezetten az MTA KOKI kutatóinak speciális kutatási igényei szerinti egyedi konfigurációban készül. Ennek alátámasztására jelen indoklás mellé csatoljuk a NIKON CEE GmbH, a NIKON Corporation leányvállalatának nyilatkozatát is.

Az elnyert VEKOP-2.3.3-15-2016-00013 pályázatban az MTA KOKI kutatócsoportjai (összesen 12 kutatócsoport) azt vállalták, hogy élősejtes farmakológiai vizsgálatokat végeznek STORM szuper-rezolúciós képalkotás segítségével. Erre a világon korábban senki sem volt képes. Az MTA KOKI kutatói által megtervezett módszertani megközelítés azonban új utakat nyithat a farmakológiai, gyógyszerhatástani folyamatok molekuláris szintű megértésében. Az egyes kutatócsoportok kizárólag a saját felfedező kutatási témáik megoldására fogják használni a beszerezni kívánt műszert. Céljuk többek között az idegrendszeri betegségek, mint például az epilepszia, a skizofrénia, az agyi érkatasztrófák vagy a kóros kövérség hátterében álló molekuláris mechanizmusok felfedezése.

A klasszikus optikai fénymikroszkópos képalkotás elméleti felbontási határa oldalirányban ( $x$ - $y$ ) 250 nanométer (nm), tengelyirányban ( $z$ ) 600 nm. Ez a fizikai törvényeken alapuló korlát az elmúlt 100 évben lehetetlenné tette a molekuláris folyamatok képalkotáson alapuló közvetlen vizsgálatát, mert a sejten belüli jelátviteli folyamatokban résztvevő sejtstruktúrák mérettartománya mindössze 10-50 nm, az MTA KOKI kutatói által vizsgálni kívánt jelátviteli folyamatokban résztvevő makromolekuláris szerkezetek mérete pedig ennél is kisebb. Ezért hagyományos optikai mikroszkópok (fénymikroszkóp, fluoreszcens mikroszkóp, konfokális mikroszkóp) alkalmatlanok a kutatási célok elérésére.

Az elméleti felbontási határt azonban az elmúlt néhány évben új alapelveken nyugvó eljárások segítségével sikerült megkerülni. Ezeket az alapelveket alkalmazó eljárásokat összefoglaló néven szuper-rezolúciós mikroszkópiai technikáknak nevezik. Az áttörés jelentőségét mutatja, hogy 2014-ben mindössze 6 évvel a felfedezésük után az első alapelvek kidolgozói megkapták a kémiai Nobel-díjat.

A Nobel-díj óta a szuper-rezolúciós alapelveken nyugvó négy eljárás (PALM, SIM, STED, STORM) közül a Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia (STORM) emelkedett ki. Az élettudományok kutatói számára három szempont miatt jelent előnyt ez az eljárás. Egyrészt a gyakorlatban egy nagyságrenddel nagyobb lokalizációs pontosságot lehet elérni, mint a többi alapelvvel, másrészt sokkal egyszerűbb a STORM alapelven működő rendszer mindennapi használata, ezért sokkal több kutató számára teszi lehetővé, hogy kutatásaiban felhasználja. Végül, de nem utolsósorban a cilindrikus lencse torzításával elért ellipszis alakú pontfüggvény alkalmas a 3 dimenziós képalkotásra is. Az alternatív alapelveken nyugvó rendszerek a térbeli 3 dimenziós képalkotást csak több nagy teljesítményű lézer együttes alkalmazásával tudják megvalósítani, ezért jelentősen drágábbak, mint a STORM alapelvvel működő mikroszkóprendszerek.

A STORM alapelvet a Harvard Egyetem kutatói dolgozták ki, a szabadalmi megegyezés alapján a STORM alapelven működő mikroszkóprendszerek az egész világra szóló kizárólagos forgalmazási jogaival pedig a Nikon Corporation rendelkezik.

A VEKOP-2.3.3-15-2016-00013 pályázat előkészítése során az MTA KOKI kutatói megvizsgálták, hogy kísérleti céljaik megvalósításához a piacon elérhető szuper-rezolúciós mikroszkópos technikák közül melyik felel meg.

Az elérhető technikák összehasonlításánál a következő szempontokat vették figyelembe:

- A technika képes legyen 3 dimenziós képalkotásra, hiszen a biológiai minták kizárólag 3 dimenzióban értelmezhetőek. Az idegrendszeri szinapszisok méreteinek megfelelően az x-y laterális lokalizációs pontosság legalább 10-20 nm-es legyen és az axiális irányban is legalább 40-50 nanométer felbontás szükséges. A rendszer képes legyen egyszerre legalább háromféle jelátvitelben részt vevő molekula egymáshoz viszonyított térbeli helyzetének vizsgálatára és a kísérleti beavatkozással asszociált térbeli pozíció megváltozásának mérésére. Kulcsfontosságú, hogy a kísérletekben az egyedi molekulákat szükséges vizsgálni, ezért úgynevezett egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia (single molecule localization microscopy) alapelvek jöhetnek szóba (STORM vagy PALM). Ezek a feltételek kizárják az egyébként jelentősen drágább STED és SIM alapelveken nyugvó mikroszkópos eljárásokat, mert azok csak foltszerűen a molekulák egy populációjáról adnak információt és a vállalt lokalizációs pontosságuk is egy nagyságrendszerrel rosszabb.
- Antitesttel történő immunjelölésre alkalmas technika legyen, amivel mesterséges genetikai beavatkozás nélkül lehet jelölni a sejtek által termelt saját, endogén fehérjéiket. Ez kiemelten fontos feltétel, mert a VEKOP pályázat egyik kiemelt célja, hogy a terjedőben lévő monoklonális antitest terápiákban potenciálisan alkalmazható antitestek hatásmechanizmusait élősejtes farmako-mikroszkópiai megközelítéssel tesztelje. Ez a feltétel kizárja a PALM szuper-rezolúciós alapelvet, amely mesterséges genetikai beavatkozással módosított fehérjéket alkalmaz antitestek használata helyett.
- Egy adott jelátviteli folyamat általában a sejtek megfelelő szubcelluláris kompartmentumaiban térben elkülönítve játszódik le. Ezért alapvető feltétel volt, hogy a szuper-rezolúciós képalkotás a molekulák lokalizációjáról korrelálható legyen egy konfokális mikroszkópos képpel amely megjeleníti a megfelelő szubcelluláris kompartmentumot. Ráadásul a szubcelluláris kompartmentumok is csak 3 dimenzióban értelmezhetőek, ezért a beszerezni rendszer képes kell legyen az egyes szuper-rezolúciós és konfokális képek összeillesztésére mindhárom dimenzióban. Erre a technikailag nehéz feladatra csak a legújabb generációs STORM alapelven működő rendszerek képesek.
- Végül, de nem utolsósorban az élősejtes farmakológiai vizsgálatokban lényeges szempont a képalkotás minél nagyobb sebessége. Az első generációs STORM alapelven nyugvó mikroszkópokhoz képest az új generációs STORM rendszerek tízszer gyorsabb képalkotási sebességet tesznek lehetővé.

A KOKI kutatói a pályázat előkészítése során megállapították, hogy a pályázatban tervezett farmako-mikroszkópiai kutatási célok megvalósításához egyedül a STORM alapelven működő mikroszkópos rendszerek alkalmasak. Azonban az is kiderült, hogy a NIKON Corporation által forgalmazott, piacon elérhető STORM szuper-rezolúciós mikroszkópok sem megfelelőek minden szempontból az élősejtes, 3 dimenziós, nagy lokalizációs pontosságú farmako-mikroszkópiai képalkotásra. Ezért Budapestre látogatott a NIKON Corporation

három mérnöke, Dr. Kenji Takatsuka, Dr. Ichiro Sase and Dr. Ilya Burda, hogy megvizsgálják milyen hardware és software megoldások szükségesek az egyedi funkciók beépítésére a KOKI kutatóinak igényei szerint. A NIKON mérnökeivel történő konzultáció után a NIKON Corporation vállalta egy olyan piaci forgalomban nem elérhető, STORM alapelveken működő egyedi mikroszkóprendszer összeállítását, amely lehetővé teszi 3 dimenzióban a szuper-rezolúciós képalkotást a kívánt nanométeres nagyságrendű lokalizációs pontossággal, 3 dimenziós léptető hardware és képösszeillesztő szoftver modullal kiegészítve. Ez a rendszer alkalmas lesz továbbá többszörös immunjelölésre azaz számos különböző molekula egyidejű vizsgálatára, valamint élősejtes vizsgálatokra is a gyorsabb képalkotás következtében.

A mellékelt hivatalos nyilatkozatban a NIKON Corporation kijelenti, hogy a termék kutatás céljára előállított a KOKI kutatóinak szakmai igényei szerint. A KOKI kutatói pedig kijelentik, hogy a beszerezni kívánt mikroszkóprendszert az alapkutatási céljaik elérésére, többek között az idegrendszeri betegségek molekuláris alapjainak felderítésére fogják használni. A termék egy példányban fog készülni, ezért a mennyiség nem alapozza meg a termék piacképességét és nem fedezi a kutatásfejlesztés költségeit.

A szintén mellékelt és az Auroscience Kft. által kiadott kizárólagossági nyilatkozat a Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia (STORM) szuper-rezolúciós mikroszkópos eljárás ALAPELVÉRE vonatkozik. A STORM alapelveken alapuló mikroszkóprendszerek gyártásának és forgalmazásának kizárólagos joga a NIKON Corporation birtokában van. A NIKON Corporation által gyártott optikai mikroszkópok kizárólagos magyarországi forgalmazója pedig az Auroscience Kft. Ez a nyilatkozat alátámasztja, hogy miért csak egy ajánlattevő meghívására van lehetőség, mivel csak az Auroscience Kft forgalmaz Magyarországon STORM szuper-rezolúciós mikroszkópai eljárás alapelveken működő mikroszkópot.

Budapest 2017. November 8.

  
Dr. Oberfrank Ferenc  
MTA KOKI