

Az első magyar krio-elektronmikroszkópos címlapsztori

Beszélgetés Perczel András professzorral

MTA.HU/SZIGETI TAMÁS



A világ egyik vezető kémiai folyóirata az ELKH–ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és a Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium munkatársainak felfedezését tette a tavaly év végén megjelent szám címlapjára. Ebben a kutatásban egy univerzális jelentőségű, de eddig ismeretlen alakú fehérje térszerkezetét határozták meg. Perczel András akadémikus, az ELKH–ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és a Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium vezetője szerint az eredmény egyúttal a molekuláris szerkezet-meghatározás új, de máris egyik uralkodó módszerében, a krio-elektronmikroszkópiában rejlő lehetőségeket is jól mutatja. Az interjút az MTA honlapja nyomán közöljük.¹

Miért éppen ennek a fehérjének a térszerkezetét vizsgálták?

Az acilaminoacil-peptidáz (AAP) enzim minden élőlényben megtalálható, a legegyszerűbb baktériumoktól az emberig. Ennek ellenére eddig senkinek sem sikerült meghatároznia az enzim emlősökben fellelhető variánsainak térszerkezetét. Korábban csak a bakteriális AAP-változat térszerkezete volt ismert. Nem most kezdünk ezzel foglalkozni, hiszen térszerkezet-kutatásaink immár 25 éves múltra tekintenek vissza: az egyik első, ebbe az enzimcsaládba tartozó fehérje szerkezetmeghatározását is a mi laborunk initiálta. Ez az enzimcsalád egyszerre fontos és izgalmas. Szerkezeti szempontból is, mert a funkcionális formát általában nagy fehérje-oligomerek alkotják, és gyakorlati szempontból is, hiszen ezek az enzimek részt vesznek például szervezetünk cukorháztartásának szabályozásában, hormonok, neuropeptidek lebontásában. Az AAP a fehérje-minőségbiztosítás folyamatainak fontos szereplője, részt vesz a sérült fehérjék lebontásában. Ezenkívül az AAP felelős azért, hogy egy pszichés zavarok és epilepszia ellen szedett gyógyszer (valproát) hatékonyságát bizonyos antibiotikumok (pl. meropenem) befolyásolhatják, és együttes alkalmazásuk veszélyforrásokat rejt magában. Mostani eredményeinkkel már meg tudjuk magyarázni, hogy az enzim hogyan vesz részt e keresztreakcióban. A gyógyszerhatások molekuláris szintű megértéséhez mindenképpen ismernünk kell a részt vevő fehérjék térszerkezetét, de a korábban elterjedt módszerekkel sajnos nem mindet tudjuk vizsgálni.

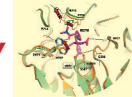
Miért nem tudta eddig senki meghatározni az emlős-AAP szerkezetét?

Ennek oka, hogy nem lehet elég jól kristályosítani, márpedig a klasszikus röntgendiffrakciós mérésekhez kristályos fehérjékre

¹ https://mta.hu/tudomany_hirei/az-első-magyar-krio-elektronmikroszkopos-címlapsztori-112687



van szükség. Ezért meg kellett várnunk annak a technológiának a megjelenését, amelynek segítségével nem csupán a kristályosítható, hanem gyakorlatilag szinte minden nagyobb fehérje térszerkezete vizsgálható: ez pedig a krio-elektronmikroszkópia. A vizsgálati módszer kifejlesztői jogosan kaptak 2017-ben Nobel-díjat, hiszen az utóbbi évtizedben az eljárás felnőtt arra a szintre, hogy ma már ugyanolyan részletgazdag 3D képet kapunk vele a molekuláról, mint a röntgendiffrakciós módszerrel. Az AAP fontossága mellett részben a krio-elektronmikroszkópia újszerű-



sége és forradalmi jelentősége indokolja, hogy a legújabb tanulmányunkat a címlapján mutatta be a Royal Society of Chemistry kiadásában megjelenő *Chemical Science*.²

Milyen eszközökkel lehet ma molekula-térszerkezetet meghatározni?

Ahhoz, hogy releváns információkat gyűjtsünk egy molekula működéséről, atomi felbontású képet kell róla készítenünk. Ez egy-két angströmös felbontást jelent. Az ilyen felvételeken már atomi részletességgel látható a fehérjemolekula térbeli alakja, és például a fehérjékhez kötődő gyógyszerek helyzete is egyértelműen azonosíthatóvá válik, ami a megértés és tervezés alapját képezi. Jelenleg három vizsgálati módszer létezik, amely ilyen nagy felbontásra képes: a mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR), a röntgendiffrakció (XRD) és legújabban a krio-elektronmikroszkópia (krio-EM). Az ELTE-n három NMR-készülékkel dolgozunk; ennek köszönhetően az ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és a Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium az egyik legnagyobb NMR-kapacitással rendelkező csoport Magyarországon. Emellett van egy igen korszerű röntgen-diffraktométerünk is, hozzá pedig robotikai apparátus, ami igen hatékonyá teszi a kristálynövesztést.

Miben áll a krio-elektronmikroszkóp előnye a többi eljáráshoz képest?

A röntgendiffrakciós mérések sikerének szűk keresztmetszete a kristályosítás: az egykristályokban az elemi cellák legókockák módjára egymás mellé rendeződnek, és „erősítőként” teszik lehetővé a sikeres felvételek készítését. Ha nem tudunk elég jó egykristályt előállítani egy kis vagy nagy molekuláról, akkor nem érhetünk el nagy felbontást. Viszont vannak anyagok, amelyekből egyszerűen nem lehet jó egykristályt növesztetni. Ilyen az emlős-AAP is, hiszen mi minden elképzelhető trükköt megpróbáltunk az elmúlt évek során, de 5–6 angströmnél jobb felbontást nem tudtunk elérni. Ez nem alkalmas például a gyógyszerhatóanyag-AAP komplexek vizsgálatához, az NMR-módszerek pedig a fe-

hérje nagy mérete miatt nem alkalmazhatók. Itt jön a krio-elektronmikroszkópia hatalmas előnye: nem igényel egykristályt. A fehérjemolekulák vizes oldatának egyetlen cseppjét – nagy sebességgel – cseppfolyós etánban lefagyaszttjuk, úgy mond, „belőjük” a fagyasztó vagy kriogén közegbe, majd cseppfolyós nitrogénben tároljuk az 1 µm vékony, üvegszerű tisztaságúvá fagyott, ablakszerűen átlátszó mintát.

És az így előkészített mintát helyezik az elektronmikroszkóp alá?

Igen, ez a fagyasztott minta úgy működik, mintha a fénymikroszkóp üveg tárgylemeze lenne, csak természetesen itt nem fotonok, hanem vákuumkamrában nagy sebességre, akár a fénysebesség 70%-ára gyorsított, fókuszált elektronok hatolnak át rajta. Tehát transzmissziós elektronmikroszkópiáról van szó. Az üveghez ha-



Krio-EM-minta fagyasztása (NIH, USA)

sonló fagyasztás azért fontos, mert így a vizes közeg nem fogja kristályként szórni az elektronokat, és az az effektus, ami a mérési eredményekben megjelenik, kizárólag a mintához köthető. Ugyanakkor a fagyasztás abban is különbözik a kristálynövesztéstől, hogy itt nincs meghatározva, milyen orientációban álljanak a molekulák. Így a felvételen a legkülönbözőbb orientációkról kapunk képet: a háromdimenziós térszerkezet kétdimenziós vetületeit láthatjuk. Nagyon sok egyedi fehérjéről nagyon sok orientációban gyűjtünk összeségében sok terabájt mérési adatsort: hiszen a fehérjékről minden szemszögből képet kell készítenünk a sikeres 3D rekonstrukcióhoz. Ezeket a „felvételeket” egy ugyan-

csak Nobel-díjjal jutalmazott matematikai eljárás segítségével egymásra illesztjük, és egy bonyolult, szűrési és képtisztítási eljárással követően határozzuk meg a krio-EM térképet, majd ennek alapján a fehérje térszerkezetét.

Mostani sikeres kutatásaitak nem a saját krio-elektronmikroszkópjukkal végezték, mivel az ELTE-n még nincs ilyen.

Így van, külföldi partnereknek kellett kiküldenünk a mintát, majd ők visszaküldték nekünk a mérés nyers eredményeit tartalmazó hatalmas adatsort. Ez óriási adatmennyiség: hat-nyolc terabájt, ami csak a nagyobb winchesterekre fér rá, és még másolni is sok-sok óráig tart, nemhogy feldolgozni. Gondolhatjuk, hogy ekkora adatmennyiségnek a feldolgozása sem egyszerű, de ezt már megoldottuk önerőből az ELTE-n, hiszen mindazokkal a szoftverekkel és számítógépekkel rendelkezünk, amelyek az elemzés hazai elvégzéséhez szükségesek. Ezután következik az eredmények értelmezése, a modellépítés, amiben sokat segít a csoportunk több évtizedes krisztallográfiai tudása, Harmat Veronika, Karancsiné Menyhárd Dóra és újabban Kiss-Szemán Anna komoly jártassága, a kristályosított molekulák vizsgálatával kapcsolatos tapasztalataink. Ha idevesszük még Jáklai Imre több évtizedes informatikai szakértelmét, akkor a csoportunkban minden adott a még ennél is szenzációsabb, fagyasztott mintán végzett elektronmikroszkópos felfedezésekhez, kivéve, hogy nincs (még) krio-elektronmikroszkópunk. Így jelenleg a külföldi kutatók szíveségére kell támaszkodnunk. Ez alkalommal a kutatásban a krio-EM készülékeket áruló japán és amerikai gyártócégeket kértük fel, hogy mintegy a berendezéseik képességeit demonstrálják, mérjék le nekünk a mintáinkat. Hatalmas ugrás lesz tehát az egész Kárpát-medence számára, ha a napokban támogatást nyert Pécsi Tudományegyetemen felépülő krio-EM Kompetencia Központ megkezdte működését, ezzel lehetővé téve már itthon is a hatékony adatgyűjtést, a krio-EM technika bevonását a hazai szerkezetkutatás művelésébe és oktatásába.

Milyen karriert futhat be a krio-elektronmikroszkópia a jövőben?

Ez az eszköz át fogja írni (vagy inkább már napjainkban is átírja) a biokémiát, az immunológiát, a genetikát, szinte minden biomolekuláris tudományágat. Egyszerűen megszűnnek azok a korlátok, amelyek a korábbi módszereknél meghatározták, hogy mely molekulák térszerkezetét lehet, és melyeket nem lehet vizsgálni. A krio-elektronmikroszkóppal mindenről lehet felvételt készíteni, csak nagy és tiszta legyen a fehérje. Ezért lenne szükség egy ilyen készülékre az ELTE-n! Hiszen a krio-EM néhány éven belül úgy elterjed majd szerte a világon, mint annak idején a személyi számítógépek: kezdetben úri huncutságnak tündek az asztali komputer, ma pedig már minden róluk szól a tudomány berkeiben. Egy krio-elektronmikroszkóp új pályára állítaná az ELTE oktatását, kutatását és rajta keresztül az egész ország tudományos fejlődését.

² <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/sc/d2sc05520a>