

Harmat Veronika

■ ELTE Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium; MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport | harmatv@caesar.elte.hu

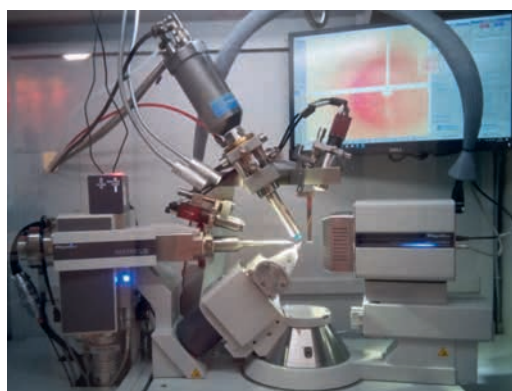
Röntgenkristallográfiai laboratórium az ELTE Kémiai Intézetében: *ELTE-Crystallab*

A kristályos anyagok röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatának (röntgenkristallográfiának) meghatározó szerepe volt a múlt század során az anyag szerkezetéről alkotott ismeretek hatalmas bővülésében, lehetővé téve az anyag fizikai, kémiai tulajdonságainak megértését és tervezését. A kémia, fizika, anyag- és környezettudomány és biológia fejlődésére is alapvető hatással volt. A módszer jelentőségét mutatja az is, hogy a 2014-es évet az ENSZ a Kristallográfia Nemzetközi Évének nyilvánította az első kristallográfiai kísérletek 100. évfordulójának alkalmából (<https://www.iycr2014.org>; Max von Laue 1914-ben kapott Nobel-díjat az első röntgendiffrakciós kísérlet elvégzéséért, egy évvel később pedig Sir William Henry Bragg és William Laurence Bragg az első kristályszerkezetek meghatározásáért).

Az anyagot alkotó atomok, ionok és molekulák térszerkezetének és kristálybeli kölcsönhatásainak atomi szintű megismerése az egykristály-diffrakciós vizsgálatok célja. Két nagy vizsgálati területe a kismolekulás kristallográfia (szerves és fémorganikus vegyületek) és a fehérjekristallográfia (stabil térszerkezettel rendelkező biológiai makromolekulák: fehérjék, nukleinsavak és komplexeik). Nemcsak az atomok térbeli elrendeződése (konstitúció, abszolút konfiguráció és konformáció) és a szerkezet geometriai paraméterei, de a molekulák kristálybeli elrendeződése és szimmetriája, a közöttük ható másodlagos kölcsönhatások is tanulmányozhatók; és megérthetők a polimorf módosulatok stabilitási viszonyai. A szupramolekuláris kölcsönhatás-hálózat felderítésével és a kölcsönhatások finomhangolásával különböző tulajdonságú anyagok tervezhetők és állíthatók elő. A fehérjekristallográfia célja annak a megértése, hogy hogyan képes egy makromolekula ellátni szerkezetbeli funkcióját molekuláris felismerés, a kölcsönhatások specifikussága, kémiai reakciók katalizálása révén, és ezek befolyásolása a fehérjék vagy ligandumok kémiai módosítása által.

Az *ELTE-Crystallab* története

Az ELTE Kémiai Intézet röntgenkristallográfiai laboratóriumát 25 éve, 1993-ban alapította Náray-Szabó Gábor és Böcskei Zsolt azzal a céllal, hogy megteremtsék a fehérjekristallográfiai vizsgálatok feltételeit Magyarországon. Az új laboratóriumban installált röntgendiffraktométer (Rigaku R-AXIS IIC típusú terdetektoros, forgóanódos diffraktométer) volt Magyarországon az első, ami alkalmas volt a kismolekula-kristályok mellett fehérjekristályok vizsgálatára is. Kutatási együttműködések létesültek a



Az *XtaLAB Synergy-R* röntgendiffraktométer

BME, az SE és az ELTE Kémiai és Biológiai Intézetei, az MTA Enzimológiai Intézet több kutatócsoportjával és a Sanofi gyógyszeripari céggel. A kezdetektől nagy hangsúlyt kapott a kutatók következő generációjának kinevelése az ELTE vegyész- és biológusképzés, valamint Kémia és Biológia doktori iskolák elméleti és gyakorlati kurzusain. A magasabb szintű gyakorlati tudás átadása, a fiatal kutatók kiképzése kutatási együttműködések keretében folyik. A laboratórium az MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és 2006 óta az ELTE Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium integráns részeként működik, amelynek vezetője Perczel András (<https://prot.chem.elte.hu>). A laboratórium alapításakor kismolekulás vizsgálatok számára az MTA Kémiai Kutatóközpontban és a Chinoinban működtek diffraktométerek, azóta a hazai készülékek száma jelentősen bővült: a Debreceni Egyetemen, az Egis gyógyszergyárban és az MTA Wigner Kutatóintézetben elsősorban kismolekulás, míg a BME és MTA TTK Enzimológiai Intézet közös laborjában és az MTA SZBK-ban elsősorban fehérjekristallográfiai kutatásokra alkalmazzák ezeket. Az ELTE laboratóriuma szempontjából kiemelkedő a BME – MTA TTK Enzimológiai Intézet laboratóriumával (<https://biostruct.org>) való együttműködés: 1) a kristallográfiai infrastruktúrák megosztott használata; 2) nyári iskolák szervezése fiatal kutatók számára; 3) közös pályázatok szinkrotron sugárforrásoknál történő mérésekhez és a magyarországi kutatóhelyeket összefogó konzorciális pályázatok szervezése.

2018-ban laboratóriumunk infrastruktúrájának teljes felújítását tudtuk megvalósítani kutatócsoportok széles körű összefogásának köszönhetően két VEKOP-pályázat keretében, melyek-



nek résztvevői az ELTE Kémiai, Biológiai és Matematikai Intézei, az MTA TTK Enzimológiai Intézet, a Semmelweis Egyetem, a BME ABÉT Tanszék, az MTA SZBK és Kineto Lab kutatócsoportjai. A projekteken belül tervezett röntgenkristallográfiai vizsgálatok egyrészt az amiloidképződéshez kapcsolódnak: modellpeptideken vizsgáljuk a β -redő-képződés feltételeit és új, 3 dimenzióban különböző kapcsolódási mintázatokat mutató peptideket tervezünk, amelyek molekuláris ragasztók alapegységei lehetnek. A másik kutatási terület a biomolekulák és biológiailag aktív molekulák kölcsönhatásainak vizsgálata. Vizsgáljuk a fehérjék betegségekkel összefüggő kémiai módosulásait (oxidáció, pontmutációk, foszforiláció); feltérképezzük az immunrendszer (komplement-rendszer proteázai) specifikus gátlására kifejlesztett peptidinhibitorok kölcsönhatás-mintázatát. Jellemezzük a molekuláris felismerés szerkezeti aspektusait csomóponti fehérjék komplexekben (pl. S100 fehérjék, MAP kinázok) és önszerveződő multimer fehérjékben. Továbbá céljaink közé tartozik bioaktív kismolekulák geometriai paraméterei és aktivitása közötti összefüggések értelmezése és a királis felismerés vizsgálata kristályos fázisban.

A laboratórium három berendezéssel bővült. Az új forgóanódos *Rigaku XtaLAB Synergy-R* típusú röntgendiffraktométer alkalmas kismolekulás és fehérjekristallográfiai mérésekre is. A hazai készülékek közül ez rendelkezik legnagyobb sugárintenzitással, így lehetővé válik a kristályok tágabb körének vizsgálata. Lehetőség van a kristályok *in situ* tesztelésére is, amelynek során diffrakciós képek készíthetők a 96 kristályosítási kísérletet tartalmazó kristályosítási tálcán nőtt bármelyik kristályról anélkül, hogy ezeket ki kellene venni a kristályosító oldatukból, így megállapítható, hogy a kristály fehérje- vagy a pufferkomponenseit tartalmazó kismolekula, illetve sókristály-e.

Míg a kismolekulák oldatából (esetleg oldószerek kombinációjával) viszonylag könnyen előállíthatók megfelelő nagyságú és minőségű kristályok, fehérjék esetén nagyon sok különböző kristályosítási körülmény kipróbálására van szükség – ennek a gazdaságos, nagy áteresztőképességű megvalósítása az újonnan installált *TTP Labtech Mosquito* típusú kristályosító robottal történik, aminek segítségével egyszerre 96 kristályosítási körülmény tesztelhető, melyek mindegyikéhez csak 50–150 nl fehérjeoldat szükséges. A páratartalom kontrollálásával elérhető a szükséges fehérjeoldat mennyiségének további csökkentése a kristályosítási kísérletek reprodukálhatóságának megtartása mellett. A kristályosítás történhet vizes oldatból vagy lipid mezofázis felhasználásával is. A nagyszámú kristályosítási kísérlet dokumentálására és kiértékelésére az új *Formulatrix Rock Imager 2* típusú félautomata mikroszkóp szolgál, amely a kristályokról UV- és látható fényvel fotókat készít, ezekből adatbázist hoz létre, és esz-közt nyújt annak elemzéséhez.

Röntgenkristallográfiai mérések lehetőségei, kitekintés

Az új kristallográfiai infrastruktúra a Magyarországon eddig elérhetőnél gyorsabb röntgendiffrakciós mérésekre ad lehetőséget a mikrofókuszált sugárzás, érzékeny detektor és gyors goniométer kombinációjával: ún. shutterless mérési módban a mérés idő jól szóró kristályok esetén a kristályszimmetriától függően akár 7–10 percre is csökkenhet (kismolekulás kristályok és lizozim fehérjekristály); a tipikus mérési idő fehérjekristályoknál azonban 0,5–1 nap. A mérési idő alatt is zajlik az adatfeldolgozás és kismolekuláknál az automatikus szerkezetmegoldás. A foton számlá-

ló HPC (hybrid photon counting) detektor gyengén szóró kristályokról is jó minőségű diffrakciós adatokat szolgáltat. Adott az alacsony hőmérsékleten való mérés lehetősége is, ami a kismolekulás vizsgálatoknál hasznos, fehérjekristályoknál követelmény.

A kristályosító robot és félautomata mikroszkóp segítségével a fehérjekristályosítás első lépése, a kristályosítási körülmények előzetes szűrése automatizáltan történik, igen kis mennyiségű minta felhasználásával. Emellett az elérhető kristályosítási módszerek bővülése és a kristályok *in situ* röntgendiffrakciós vizsgálata is nagyban hozzájárul a fehérjekristallográfiai kutatások sikeréhez.

Napjainkban a kismolekulás vizsgálatok a modern laboratóriumi diffraktométerekkel rutinszerűen elvégezhetőek, emellett a mai felhasználóbarát szoftvercsomagokkal általában az adatok feldolgozása és a szerkezetmegoldás is gyors. A sugárforrás befolyásolja, hogy milyen típusú minták vizsgálatára a legalkalmasabb a készülék. A *XtaLAB Synergy-R* készülék rezonódot tartalmaz, ami ideális sok könnyű- és kevés nehézatomot tartalmazó szerkezetek vizsgálata esetén; gyengén szóró kristályokhoz; és akkor, ha a molekula abszolút konfigurációjának meghatározása is cél.

A fehérjekristályok szóróképessége gyengébb, mint a kismolekulás kristályoké, ezért sok esetben laboratóriumi diffraktométerrel nem lehetséges megfelelő minőségű (felbontású) diffrakciós adatkészletet gyűjteni. Ilyenkor a több nagyságrenddel nagyobb fényességgel rendelkező röntgenforrásokhoz – szinkrotronokhoz vagy röntgen szabadelektron-lézerehez (XFEL) célszerű folyamodni (pl. az ESRF és az Európai XFEL fényessége a laboratóriumi sugárforrásokénál kb. 12, illetve 16 nagyságrenddel nagyobb; <https://www.esrf.eu>; <https://www.xfel.eu>). Ezeknél a nagy infrastruktúráknál a kísérletek elvégzésére a kutatási célt és a rendelkezésre álló kristályok jellemzését is magában foglaló pályázatok elbírálása után van lehetőség – a sikeres pályázathoz pedig elengedhetetlen a kristályok előzetes tesztelése (elemi cella, szimmetria, várható felbontás); a sikeres mérések elvégzéséhez pedig az, hogy a kristályokat a szóróképesség szempontjából is optimalizáljuk. A laboratóriumi diffraktométerek mindezekre alkalmasak. Az *XtaLAB Synergy-R* készülékben a mikrofókuszált forrás és leszűkíthető sugárnyaláb lehetővé teszi problémás – nagy elemi cellával rendelkező vagy nagyon kis fehérjekristályok vizsgálatát is.

Köszönetnyilvánítás. A VEKOP-2.3.2-16-2017-00014 és VEKOP-2.3.3-15-2017-00018 projektek keretében folyó kutatásokat az Európai Unió és Magyarország Kormányja támogatta az Európai Regionális Fejlesztési Alap hozzájárulásával. A kutatásokat az MTA MedInProt programja támogatta.

Az *ELTE-Crystallab* új infrastruktúrájának bemutatása

2019. január 3-án lesz, ahová minden érdeklődőt várunk. Ezt követően félnapos bevezető szintű gyakorlati tanfolyamokat tartunk, kémikus és biokémikus háttérű érdeklődő kutatóknak, doktoranduszoknak. A tanfolyamok tervezett programja a következő: a) Kismolekulás kristallográfia: A kristály felszerelésének, a röntgendiffrakciós mérésnek és adatfeldolgozásnak a bemutatása jól szóró kristályok segítségével; automatikus szerkezetmegoldás bemutatása a készülék vezérlőszoftverével („What is this”); a szerkezetmegoldás lépései, a szerkezet validálása (értékelés); gyakorlás: egy vagy két „kedvenc kristály” vizsgálata. b) Fehérjekristallográfia: kristályok tesztelése, a röntgendiffrakciós mérés és adatfeldolgozás bemutatása és gyakorlása demó kristályokon (lizozim); igény szerint a kristályosító robot programozása és használata, a kristályosítási kísérletek kiértékelése. További információk a <https://prot.chem.elte.hu/news> oldalon található. Jelentkezés: crystallab@chem.elte.hu