

# Moleküle – auf Eis gelegt

Die Kryo-Elektronenmikroskopie ermöglicht es, winzige Strukturen wie Moleküle bis aufs Atom genau abzubilden. Für ihren Beitrag zur Entwicklung dieser Technik bekamen der Brite Richard Henderson, der deutschstämmige US-Forscher Joachim Frank und der Schweizer Jacques Dubochet den Chemie-Nobelpreis 2017. Am **Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft** in Berlin war der ehemalige Arbeitsgruppenleiter Friedrich Zemlin mit dabei, als die Methode in den 1980er-Jahren ihren Platz in der Biologie eroberte.

TEXT **ELKE MAIER**

Um bis in die aller kleinsten Dimensionen des Lebens vorzudringen, legen Wissenschaftler ihre Forschungsobjekte gerne auf Eis: Sie platzieren sie auf einem winzigen Gitter und tauchen sie blitzschnell in ein minus 196 Grad kaltes Ethanbad, sodass die Probe innerhalb weniger Tausendstelsekunden erstarrt. Anschließend durchleuchten sie ihr schockgefrostetes Präparat mit Elektronenstrahlen.

Die Bilder, die sie mithilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie (griechisch kryos = kalt) gewinnen, nachdem sie am Computer Tausende von Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild verrechnet haben, sind spektakulär: Sie zeigen etwa Bakterien, die Zellen attackieren, ebenso wie feinste Strukturen auf der Oberfläche des Zikavirus oder fehlgefaltete Proteine im Gehirn von Alzheimer-Patienten. Forscher können damit sogar Moleküle in Bewegung „einfrieren“ und so die komplizierten Vorgänge im Zellinnern sichtbar machen – etwa die Herstellung von Proteinen an den Ribosomen, den Eiweißfabriken der Zelle.

Dabei glaubte lange Zeit niemand daran, dass sich das Elektronenmikroskop jemals für die Abbildung biologischer Objekte eignen würde: Damit die Elektronen ausschließlich vom Präparat abgelenkt werden, herrscht im Innern ein Hochvakuum, in dem

wasserhaltige Präparate wie Zellen normalerweise sofort austrocknen und bis zur Unkenntlichkeit schrumpeln würden. Hinzu kommt die schädigende Wirkung der Strahlung: Ernst Ruska, der Erfinder des Elektronenmikroskops, hatte damit einst sogar einen Metallfaden zum Verdampfen gebracht – keine guten Aussichten für die viel empfindlicheren Proben der Biologen!

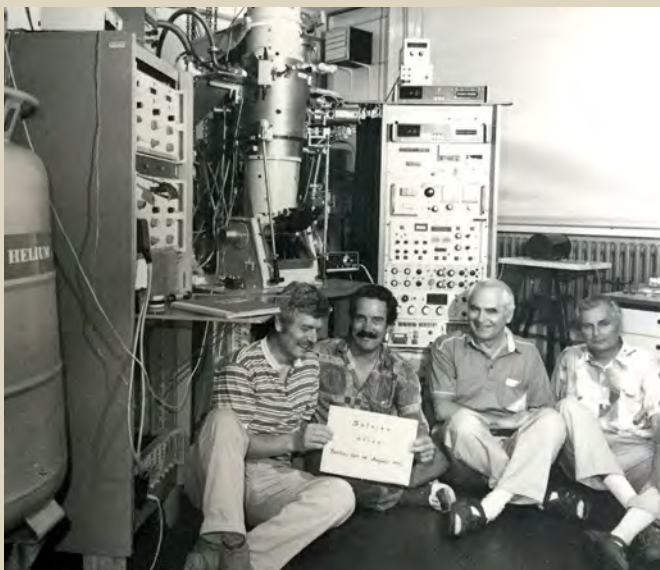
Auch Richard Henderson, der in den 1970er-Jahren am MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge an Membranproteinen forschte, zog die Elektronenmikroskopie anfangs gar nicht in Betracht. Stattdessen versuchte er, die Struktur der Proteine mittels Röntgenkristallografie zu bestimmen – damals die Methode der Wahl. Damit stieß er jedoch schon bald an die Grenzen: Manche Proteine ließen sich nicht in ausreichender Menge gewinnen, andere bildeten partout keine Kristalle. Und um die Moleküle in ihrer natürlichen Umgebung – der Zellmembran – darzustellen, blieb ohnehin nur das Elektronenmikroskop.

Hendersons Lieblingsprotein war das Bacteriorhodopsin – ein rotes Pigment, das in der Zellwand des salzliebenden Einzelllers *Halobacterium salinarum* vorkommt und manchmal ganze Salinen rot färbt. Um das Protein im Originalzustand abzubilden, legten er und sein Kollege Nigel Unwin die ganze Membran ins Mikroskop und wählten die Strahlendosis so gering wie nur irgend möglich. Der Clou dabei war eine Zuckerlösung, mit der die Forscher ihr Präparat benetzten und die sich als wirksamer Schutz gegen Austrocknung erwies. Weil das Protein so regelmäßig geformt ist, klappte es selbst mit den kontrastarmen Aufnahmen, seine Struktur in 3D zu rekonstruieren.

Das Bild erschien 1975 im Fachblatt NATURE und zeigt, wie sich die Proteinkette des Moleküls siebenmal durch die Zellwand schlängelt. Die Auflösung beträgt 0,7 Nanometer (milliardstel Meter) – etwa die Länge von sieben aneinandergelagerten Atomen. Es war damals die beste Darstellung eines Proteins, die jemals mit einem Elektronenmikroskop erzielt worden war.

Richard Henderson war damit aber noch nicht zufrieden. Er wollte sein Molekül bis aufs Atom genau abbilden. Vor allem die Arbeit eines Teams der Abteilung Elektronenmikroskopie am Fritz-

Abschied von SULEIKA: Friedrich Zemlin und sein Team versammeln sich ein letztes Mal vor der Kryo-Apparatur, mit der die nobelpreiswürdigen Aufnahmen des Bacteriorhodopsins gelangen. Das exzellente Objektiv wurde anschließend ausgebaut und in ein moderneres Mikroskop integriert. Von links: Friedrich Zemlin, Rolf Meilicke, Erich Beckmann und Klaus Heinrich.





Werdegang eines Virus: Für eine 3D-Ansicht von *Herpes simplex* nehmen die Forscher ihr Objekt aus unterschiedlichen Blickwinkeln auf. Diese 2D-Aufnahmen verrechnen sie dann zu einem Gesamtbild. Zu sehen sind eine Mikroskopaufnahme (links), das rekonstruierte und entrauschte Tomogramm (Mitte) sowie eine 3D-Rekonstruktion (rechts).

Haber-Institut (FHI) der Max-Planck-Gesellschaft in Berlin überzeugte ihn, dass noch Luft nach oben war: Im Jahr 1984 hatten Elmar Zeitler und Friedrich Zemlin gemeinsam mit Kollegen von der University of Arizona die Struktur des Klapperschlangengifts Crotoxin mit einer Auflösung von 0,35 Nanometern veröffentlicht.

„Wir hatten am Institut ein ganz hervorragendes Mikroskop“, sagt Friedrich Zemlin. „Vor allem das heliumgekühlte, supraleitende Objektiv, das die Physikerin Isolde Dietrich bei Siemens in München entwickelt hatte, war fantastisch. Es war Teil eines Laboraufbaus, den wir am FHI zusammengebaut und dem wir den Namen SULEIKA gegeben haben – supraleitende Kryo-Apparatur.“ Richard Henderson reiste von 1984 an immer wieder nach Berlin, um mit SULEIKA zu arbeiten.

Auf der anderen Seite des Atlantiks, am New York State Department of Health, tüftelte Joachim Frank bereits seit mehreren Jahren an Algorithmen für die Bildbearbeitung. Der in Deutschland geborene Forscher, der später die amerikanische Staatsbürgerschaft annahm, hatte als Doktorand am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München gearbeitet, dem

**DIE ZEIT VOM 22. Januar 1982**



**Tiefsttemperatur-Mikroskopie und Tiefstgefrieren, so scheint es, kündigen ein neues Kapitel der Molekularbiologie an: die direkte Beobachtung der elementarsten Lebensvorgänge unterm Mikroskop.**

Vorläufer des Martinsrieder Max-Planck-Instituts für Biochemie. Sein Mentor war Walter Hoppe, ein Experte auf dem Gebiet der Röntgenkristallografie, der Anfang der 1970er-Jahre zur Elektronenmikroskopie umgeschwenkt war.

Hoppes Spezialität war die 3D-Rekonstruktion von komplexen molekularen Strukturen wie etwa Enzymen. Dafür nahm er ein und dasselbe Objekt tomografisch aus unterschiedlichen Blickwinkeln auf und kombinierte die Aufnahmen am Computer zu einem dreidimensionalen Gesamtbild. Problematisch dabei war vor allem, dass sich durch die Mehrfachaufnahmen auch die schädliche Strahlendosis addierte.

Frank versuchte, dies zu umgehen, indem er eine einzige Aufnahme von vielen gleichartigen Teilchen in einer Lösung anfertigte. Die Strahlenbelastung blieb so viel geringer. Umso komplizierter war dafür die Bildanalyse, denn die Teilchen lagen kreuz und quer durcheinander und hoben sich oft nur schlecht vom Hintergrund ab. Hinzu kamen auch noch Verunreinigungen – eine riesige Herausforderung, vor allem bei der geringen Rechenleistung der damaligen Computer.

Trotzdem gelang es Frank, Algorithmen auszuarbeiten, um die bunt verstreuten Partikel nach wiederkehrenden Strukturen zu durchsuchen und daraus ein scharfes dreidimensionales Gesamtbild der Struktur zu errechnen. Gemeinsam mit dem Physiker Marin van Heel, der später ebenfalls am FHI forschte und als Pionier in der Darstellung von Einzelmolekülen gilt, veröffentlichte Frank im Jahr 1981 die ersten Programme. Im selben Jahr kam Franks Softwarepaket SPIDER heraus, ein umfassendes Werkzeug für die computergestützte Bildanalyse.

Blieb noch zu klären, wie man biologische Proben im Vakuum des Elektronenmikroskops vor dem Austrocknen schützen sollte. Richard Henderson verwendete in seinen Bacteriorhodopsin-Studien eine Zuckerlösung, was sich jedoch längst nicht für alle Präparate eignete. Manche Forscher hatten auch schon versucht, ihre Proben einzufrieren. Dabei bildeten sich jedoch Eiskristalle, welche die filigranen Strukturen der Probe sprengten und obendrein auch noch den Elektronenstrahl ablenkten.

Dass der Weg über das Eis trotzdem der richtige war, bewies Jacques Dubochet, der damals am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg an genau diesem Problem forschte. Eine Idee war, die Probe so schnell abzukühlen, dass für die Bildung von Eiskristallen keine Zeit blieb. Viele Kollegen hielten das für utopisch, denn dafür musste die Probe innerhalb einiger Tausendstelsekunden eine Temperatur von weniger als minus 150 Grad Celsius erreichen – eine Kühlrate von mehr als 10 000 Grad Celsius pro Sekunde.

Doch Dubochet schaffte das scheinbar Unmögliche. Dafür kühlte er Wasser in Sekundenbruchteilen in einem eiskalten Ethanbad ab, sodass die Flüssigkeit als glasartige Masse erstarrte – ein Zustand, den Forscher als vitrifiziertes Wasser bezeichnen. Die Methode erwies sich als bestens geeignet, um biologische Präparate im Vakuum des Elektronenmikroskops vor Austrocknung zu bewahren: Vitrifiziertes Wasser bildet keine zerstörerischen Eiskristalle und lässt die Elektronen ungehindert passieren; die niedrige Temperatur schützt zudem vor Strahlungsschäden. „Mithilfe der Kryotechnik ist es uns Mitte der 1980er-Jahre gelungen, Paraffinmoleküle elektronenmikroskopisch abzubilden“, sagt Friedrich Zemlin. „Das war ein echter Durchbruch, denn die langen Kohlenwasserstoffketten sind gegenüber Elektronenstrahlen extrem empfindlich.“

Wenig später eroberte das Elektronenmikroskop auch in der Biologie seinen festen Platz. Die erste Darstellung eines Proteins in atomarer Auflösung veröffentlichten Richard Henderson und seine Kollegen im Jahr 1990: Nach jahrelanger Tüftelei war es den Forschern schließlich gelungen, das Bacteriorhodopsin in einer Auflösung von 0,35 Nanometern abzubilden. Dafür hatten sie Hunderte von Einzelaufnahmen im Computer zu einer hochauflösenden 3D-Struktur verrechnet; die meisten davon stammten von SULEIKA. Friedrich Zemlin und sein Mitarbeiter Erich Beckmann sind unter den Co-Autoren dieser Pionierarbeit.

Das legendäre Objektiv, mit dem die Aufnahmen gelangen, wurde später in ein moderneres Philips-Mikroskop eingebaut und befindet sich heute am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Institutsdirektor Holger Stark, ehemals Doktorand bei Friedrich Zemlin und Marin van Heel am FHI, hatte das Gerät „geerbt“ und mitgenommen, als er 2001 nach Göttingen umzog. Noch mehrere Jahre war es dort erfolgreich im Einsatz.