



Vorbereitung einer Probe für die Elektronenmikroskopie: Die Forscher kühlen dabei ein wenige Millimeter großes Kupfernetz mit der Proteinelösung in flüssigem Ethan innerhalb weniger Mikrosekunden auf fast minus 200 Grad ab. So können sich keine Eiskristalle in den Zellen bilden, die die Proteine zerstören würden.

Foto: Frank Vinken

Giftspritze im Nanoformat

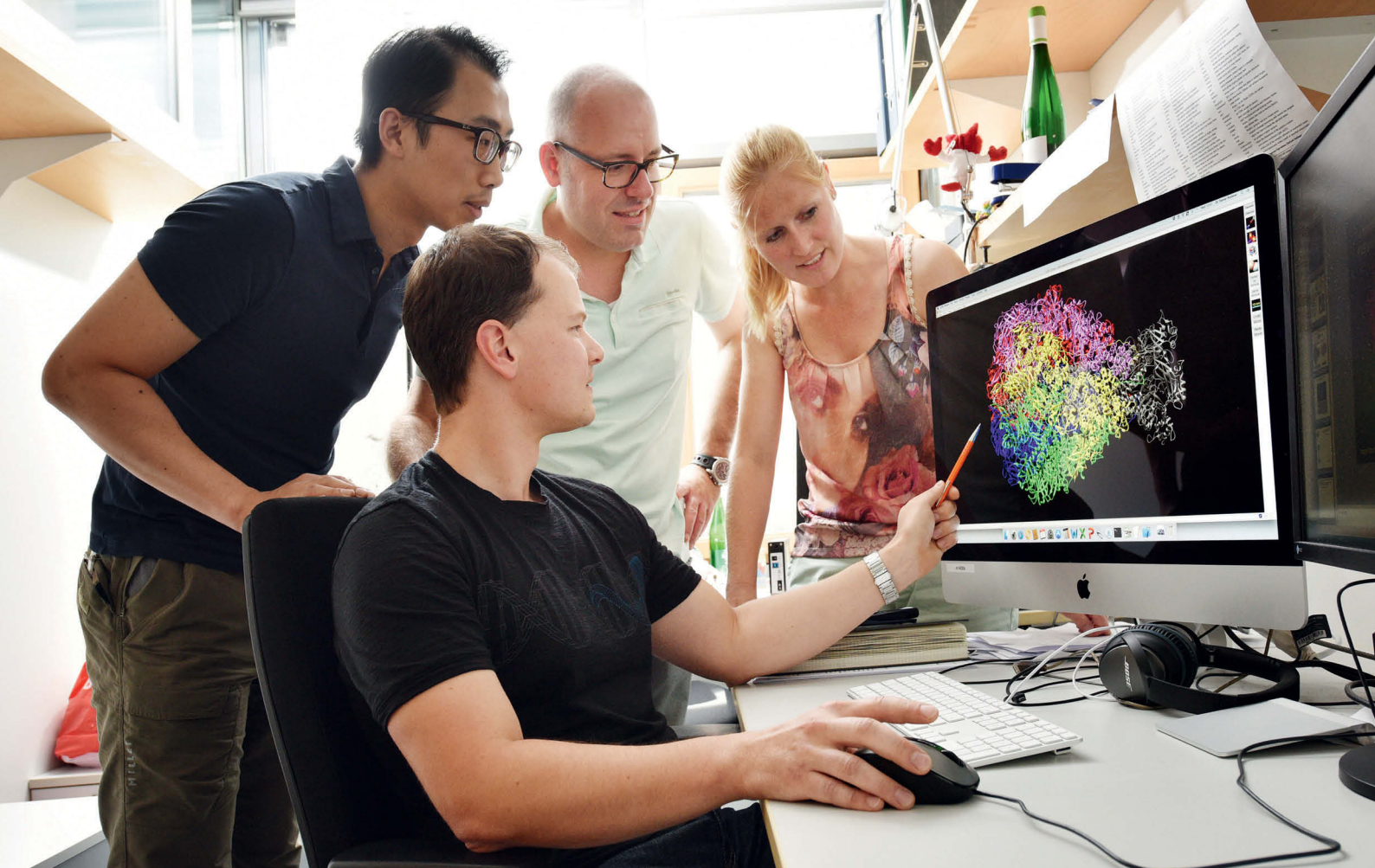
3D im Kino ist spektakulär. Auch für **Stefan Raunser** vom **Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie** in Dortmund sind dreidimensionale Bilder ein besonderes Sehvergnügen: Mit seinen Elektronenmikroskopen kann er die Position einzelner Atome sehr genau bestimmen und die räumliche Struktur von Proteinen untersuchen. Dabei stößt er mitunter auf bizarre Konstruktionen.

TEXT **CATARINA PIETSCHMANN**

Die Natur ist voll von Organismen mit ungewöhnlichen Lebensentwürfen: zum Beispiel ein winziger Fadenwurm namens *Heterorhabditis bacteriophora*. Zur Fortpflanzung kriecht er durch Hautöffnungen in eine Käferlarve. Dort spuckt der Wurm Bakterien aus, die in seinem Darm leben. Die Bakterien der Art *Photorhabdus lu-*

minescens produzieren ein für die Larve tödliches Gift. Dann sondern sie Enzyme ab, die den toten Käfer in seine Bestandteile zerlegen. Die Bakterien ernähren sich von den Überresten und die Fadenwürmer von den Bakterien. Einige Mikroben werden nicht verdaut, sondern überleben im Wurmdarm und dienen der nächsten Fadenwurmgeneration wieder als Waffe.

Eine etwas unappetitliche Lebensweise, aber nützlich für die Beteiligten – eben eine richtige Symbiose. Für Stefan Raunser sind das Bakteriengift und die Art, wie es die Larve tötet, faszinierend. Das Gift gehört zu den sogenannten Tc-Toxinen. Raunser hat sich den aus drei verschiedenen Proteinen bestehenden Proteinkomplex mit Hightech-Elektronenmikroskopen genau ange-



schauf und seine Struktur und Arbeitsweise enthüllt: Protein A hat die Form einer Glocke. Im Inneren der Glocke bildet das Protein einen Kanal. „Er hat einen breiten und einen schmalen Durchlass und erinnert deshalb an eine Vuvuzela, das berühmte südafrikanische Musikinstrument südafrikanischer Fußballfans“, erklärt Rauser. Zwei weitere Proteinmoleküle, B und C, bilden eine Art Kokon, der das eigentliche Gift, ein kleines Enzym am Ende des Kokonproteins C, umgibt. Der Kokon bindet an eine eigens dafür vorgesehene Stelle an Protein A.

Sobald der pH-Wert in der Umgebung sinkt oder steigt, öffnet sich die Glocke und gibt den zentralen Kanal frei. „Der Kanal wird nun wie die Kanüle einer Spritze durch die Zellmembran geschoben“, sagt Rauser. Ein kleiner Abschnitt des Kanalproteins erzeugt die dafür erforderliche Energie: Er zieht sich wie eine unter Spannung stehende Metallfeder zusammen, und die Kanalspitze schiebt sich nach vorne.

Der Kokon wird bei diesem Prozess zwischen Kanal und Glocke gezogen. Das Kokonprotein C schneidet sich das Gift an seinem Ende selbst ab und in-

jiziert es durch den Kanal in die Käferzelle. Dabei verliert das Giftmolekül seine ursprüngliche Struktur.

HOCHWIRKSAMES TOXIN

In der Zellflüssigkeit nimmt es seine reguläre Struktur wieder ein und verändert den Aufbau von Gerüstproteinen, sogenannten Aktinfilamenten. Das Zellskelett bricht zusammen, und die Zelle stirbt. „Das Gift wirkt sehr schnell. Die Zellen kollabieren innerhalb von wenigen Minuten“, erklärt Rauser.

Und als ob das nicht schon raffiniert genug wäre, holt sich die Zelle das Mordinstrument auch noch selbst ins Haus. „Nachdem der Proteinkomplex an der Zellmembran angedockt hat, schnürt die Zelle dieses Membranstück in einem kleinen Bläschen nach innen ab“, erläutert Rauser. In einem solchen, Endosom genannten Bläschen sinkt der pH-Wert, sodass sich die Vuvuzela-Spritze von innen in die Membran des Endosoms bohrt und das Gift in die Zellflüssigkeit injiziert.

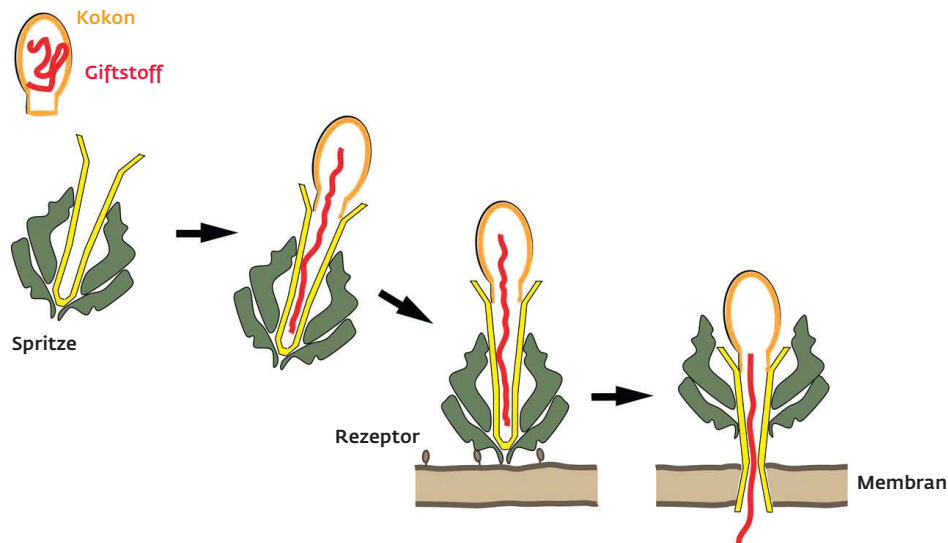
Aufklären konnte Rausers Team den tödlichen Mechanismus mittels Kryo-Transmissionselektronenmikro-

skopie. Anders als bei der klassischen Elektronenmikroskopie wird die Probe nicht in eine Art Harz eingebettet, sondern in flüssigem Ethan bei minus 196 Grad Celsius schockgefroren. „Das geht so schnell, dass sich keine Eiskristalle bilden, die Zellen oder Proteine zerstören.“

Auf ihrem Weg durch die Probe werden die Elektronen des Mikroskops von den Strukturen der Moleküle unterschiedlich stark abgelenkt: Je höher die Masse der Atome, desto stärker die Wechselwirkung. Elektronendetektoren und ein Computer erzeugen dann aus den aufgefangenen Elektronen ein zweidimensionales Bild.

Lebende Zellen lassen sich unter solchen Bedingungen natürlich nicht beobachten. „Durch das Vakuum im Mikroskop würden biologische Proben sofort ihr gesamtes Wasser verlieren und durch die starke Elektronenstrahlung schnell geschädigt werden“, erklärt Rauser.

Damit die Forscher aus den zweidimensionalen Bildern den räumlichen Aufbau des Proteinkomplexes rekonstruieren können, müssen sie Tausende von Aufnahmen aus unterschiedlichen Blickwinkeln machen. Da ist es von Vor-



- Links | Yan Nie, Daniel Roderer, Stefan Raunser und Meike Schulte (von links) analysieren die Mikroskopdaten am Computer. Oft sehen die Forscher die Resultate ihrer Experimente erst Monate später.
- Oben | Das Tc-Toxin von *Photorhabdus luminescens* ist wie eine klassische Spritze aus mehreren Teilen aufgebaut: Zwei Proteine bilden einen Kokon (orange) mit dem eigentlichen Giftstoff (rot). Ein dritter Proteintyp formt eine äußere Hülle (dunkelgrün) und einen zentralen Kanal (gelb), der als Kanüle funktioniert. Bindet das Toxin an Rezeptoren auf der Zellmembran und ändert sich der pH-Wert, werden Kokon und Kanal nach vorne geschoben, und der Kanal durchsticht die Membran. Nun wird der Giftstoff in die Zelle injiziert.

teil, dass die Moleküle in der Probe völlig zufällig angeordnet sind: Manche liegen auf dem „Rücken“, andere auf dem „Bauch“, und wieder andere sind von oben oder unten zu sehen. „Am wichtigsten sind für uns die Seitenansichten. Es ist wie bei Fotos von einem Menschen: Aus der Frosch- und Vogelperspektive allein kann man eine Person kaum identifizieren“, so Raunser. Ein Computer errechnet anschließend aus Tausenden von Schnappschüssen die dreidimensionale Struktur des Proteins.

Aber nicht nur die Mikroskopie selbst, auch die Vorbereitung der Proben ist eine Kunst für sich. Eine ruhige Hand und viel Geschick sind nötig, um ein knapp fünf Millimeter breites rundes Kupfernetz, das mit einem dünnen Kohlefilm benetzt ist, mit Protein zu beladen. Dann muss das Ganze schnell in das vorgekühlte flüssige Ethan getaucht und eingefroren werden. „Es dauert fast ein Jahr, bis neue Mitarbeiter alle Techniken von der Präparation bis zur Bildbearbeitung beherrschen“, beschreibt Raunser das aufwendige Präparationsverfahren, das nur von wenigen Laboratorien auf der Welt beherrscht wird.

Eine solche Behandlung überlebt kein Bakterium, geschweige denn eine Käferlarve. Wie das Bakteriengift seine tödliche Wirkung entfaltet, können die Forscher deshalb nur mit einem Trick verfolgen: Sie imitieren den Abfall des pH-Werts, wie er bei der Abschnürung eines Endosoms auftritt, und frieren die Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. So können sie die verschiedenen Zwischenzustände des Toxins festhalten und die einzelnen Etappen des Vergiftungsprozesses dokumentieren. Der komplette Ablauf lässt sich dann wie ein Daumenkino aus einzelnen Bildern abspielen.

EINE TECHNIK FEIERT IHR COMEBACK

Mit der 3D-Kryotechnik erfährt die Elektronenmikroskopie nach Jahren des Niedergangs derzeit wieder eine Renaissance (s. Kasten S. 50). Und wie zu ihrer Anfangszeit ist Deutschland auch jetzt wieder einer der führenden Standorte für diese Technik. Rausers Mikroskope in Dortmund zählen zu den leistungsstärksten weltweit. Kein Wunder, dass der 39-jährige Pfälzer

mit den von ihm weiterentwickelten Methoden hochkarätige Entdeckungen in Serie veröffentlicht.

Raunser studierte Chemie und Biologie in Mainz und promovierte am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt. Nach einem Forschungsaufenthalt an der Harvard Medical School in Boston kam er als Leiter einer Forschungsgruppe ans Max-Planck-Institut nach Dortmund. 2013 erhielt er vom Europäischen Forschungsrat mehr als zwei Millionen Euro für die Erforschung des bakteriellen Toxins. Nach einem kurzen Abstecher an die Freie Universität Berlin kehrte er 2014 ans Max-Planck-Institut zurück und leitet seitdem die Abteilung Strukturbiochemie.

Einer der Gründe für den neuerlichen Siegeszug der Elektronenmikroskopie ist die unglaublich hohe Auflösung, die damit erreicht werden kann. „Wir können damit beinahe einzelne Atome sichtbar machen“, sagt Raunser. Zudem lassen sich mit Elektronenmikroskopen relativ leicht Komplexe aus mehreren Proteinen untersuchen.

Hochleistungselektronenmikroskope sind wahre Kolosse: Die neueste Generation ist vier Meter hoch und wiegt

GESCHICHTE DER ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Elektronenmikroskopie ist eine Erfindung aus Deutschland: 1926 legte Hans Busch den Grundstein und bewies, dass Magnetspulen einen Elektronenstrahl im Vakuum ähnlich gut bündeln wie eine Linse das Licht. Ernst Ruska und Bodo von Borries entwickelten 1932 an der Technischen Hochschule Berlin eine elektromagnetische Linse. Fließt Strom durch die Spule, entsteht ein Magnetfeld, durch das der Elektronenstrahl abgelenkt werden kann. Durch Änderung des Linsenstroms lässt sich die Stärke des Magnetfelds und dadurch die „Brekraft“ der Linse stufenlos variieren.

Von 1937 an treiben Ruska und von Borries die Entwicklung von Elektronenmikroskopen bei Siemens & Halske, dem heutigen Siemens, in Berlin voran. Siemens und Zeiss produzieren die ersten Elektronenmikroskope weltweit.

Der wissenschaftliche Durchbruch der Methode, die wegen der geringeren Wellenlänge des Elektrons eine 1000-mal höhere Auflösung als das Lichtmikroskop erlaubt, gelingt Anfang der 1940er-Jahre. Helmut Ruska, Mediziner an der Charité Berlin und jüngerer Bruder Ernst Ruskas, macht mit der auch Übermikroskopie genannten Technik erstmals Mikroorganismen wie den Tabakmosaikvirus, Pockenviren und Bakteriophagen sichtbar – damals eine Sensation.

Nach dem Zweiten Weltkrieg forschen Ernst und Helmut Ruska unter anderem bei der neu gegründeten Max-Planck-Gesellschaft. Ernst Ruska leitet von 1949 bis 1974 die Elektronenmikroskopie am Fritz-Haber-Institut in Berlin-Dahlem.

In den 1960er-, 1970er- und 1980er-Jahren nutzen Biologen die Technik routinemäßig zur Untersuchung von Zellen.

Fast jedes Institut hat seine eigene Elektronenmikroskopie-Abteilung. Die Mikroskope verändern das Bild vom Leben grundlegend: Sie machen das Innere einer Zelle mit einer bis dahin unerreichten Genauigkeit sichtbar.

1986 erhält Ernst Ruska den Nobelpreis – als Einziger der Beteiligten, sein Bruder Helmut und von Borries sind zu dem Zeitpunkt bereits gestorben.

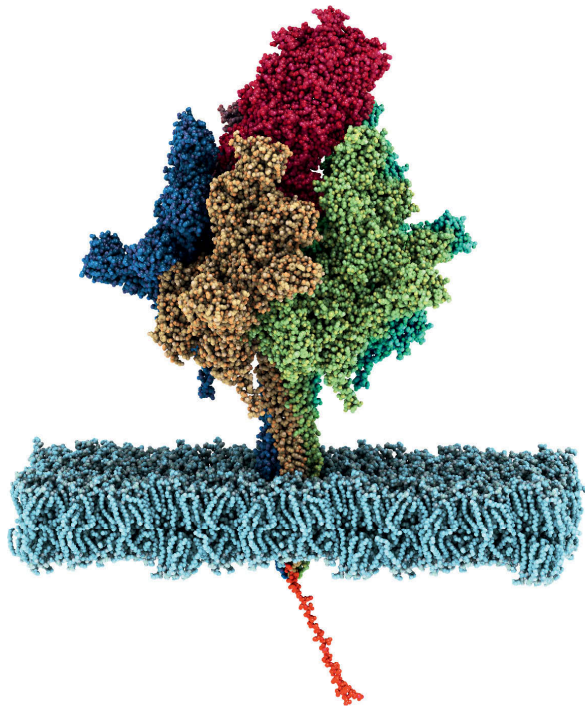
In den 1990er-Jahren verliert die Elektronenmikroskopie dann stark an Bedeutung. Neue Methoden treten an, die Biologie zu revolutionieren: die konfokale Mikroskopie und die Zweiphotonenmikroskopie. Mit Laserlicht tastet sich die Wissenschaft immer weiter an die Auflösungsgrenze heran und kann, anders als mit dem Elektronenmikroskop, nun auch lebende Zellen untersuchen. Viele Vorgänge lassen sich jetzt live und „in Farbe“ verfolgen.

Viele Forschungseinrichtungen schließen in der Folge ihre Elektronenmikroskopie-Abteilungen – nur um sie kurz nach der Jahrtausendwende wieder zu öffnen. Denn nach der Entschlüsselung des menschlichen Erbguts rückt das Proteom, die Gesamtheit aller Proteine, ins Zentrum der Forschung. Proteine ordnen sich oft zu größeren Komplexen zusammen, die dann wie molekulare Maschinen lebenswichtige Funktionen ausführen. Und die lassen sich nur mit Elektronenmikroskopen mit der erforderlichen Auflösung untersuchen.

Heute ist Deutschland wieder ein weltweites Zentrum für die Elektronenmikroskopie. Hergestellt werden die Geräte jedoch inzwischen von japanischen und amerikanischen Unternehmen.

Für die 3D-Kryo-Elektronenmikroskopie müssen die Proben schockartig tiefgefroren werden: Philine Hagel entnimmt flüssigen Stickstoff aus einem Tank (1) und kühlt damit das Gefäß mit dem Ethan (2).





Fünf Moleküle von Protein A bilden den Injektionskanal und die äußere Hülle des Toxin-Komplexes (hier vier sichtbar). Im Innern liegt der Injektionskanal, durch den der Giftstoff (rot) in die Zelle injiziert wird (Zellmembran hellblau). Der Kokon aus Protein B und C ist dunkelrot dargestellt.

mehr als fünf Tonnen. Da sie extrem empfindlich auf mechanische und elektromagnetische Schwingungen reagieren, müssen solche Geräte in speziell ausgestatteten Kellerräumen untergebracht werden.

ELEKTRONENMIKROSKOPIE ERFORDERT GEDULD

Das Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie verfügt über zwei Elektronenmikroskope für Standardaufgaben. „Damit sehen wir unsere Proben durch

und wählen die besten aus.“ Diese untersuchen die Wissenschaftler dann an einem der beiden Hochleistungs-Kryo-Elektronenmikroskope.

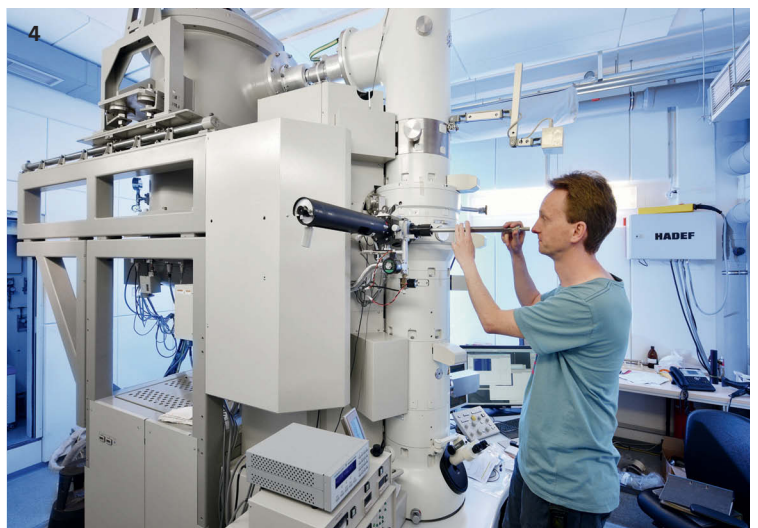
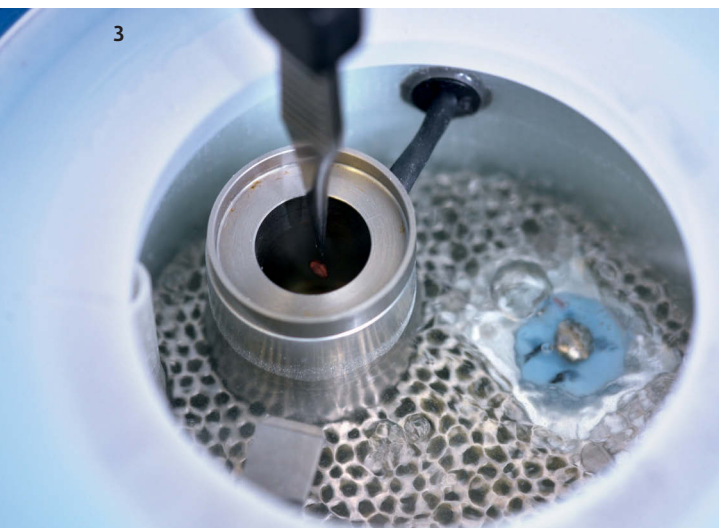
Die dafür erforderliche Rechnerkapazität nimmt allein einen eigenen Raum ein. Zahlreiche Ventilatoren müssen das elektronische Gehirn kühlen, wenn es Tausende von Datensätzen gleichzeitig verarbeitet. Ein langwieriger Prozess. Doktorarbeiten in Rausers Gruppe sind deshalb nichts für Ungeduldige. „Allein drei Monate gehen fürs Mikroskopieren drauf, die Bildverarbei-

tung braucht dann häufig noch einmal 18 Monate. Danach geht es wieder zurück ans Mikroskop“, sagt Rauser.

Der Wissenschaftler will mit der Aufklärung von Proteinstrukturen immer auch die Medizin voranbringen: Auf diese Weise möchte er Ansatzpunkte für neue Medikamente liefern. Er untersucht etwa das Zusammenspiel von Aktin- und Myosinproteinen in Muskelzellen – Proteine, die bei Erkrankungen des Herzmuskels eine Rolle spielen. Darüber hinaus interessiert ihn, wie Cholesterin im Körper reguliert wird. >

In dieses Gefäß wird die Probe getaucht (3) und dann ins Elektronenmikroskop eingebracht – hier von Oliver Hofnagel (4).

Fotos: Frank Vinken (2), Grafik: Steffan Rauser/MPI für molekulare Physiologie





- 1 | Die Analyse der Bilder aus dem Elektronenmikroskop erfordert immense Rechenleistung. Alexander Fieroch kontrolliert daher regelmäßig die Arbeit des Computerclusters.
- 2 | Klärt die Arbeitsweise der molekularen Maschinen in der Zelle auf: Stefan Rauser am Dortmunder Max-Planck-Institut.

Drei Proteine messen, ob ausreichend Cholesterin im Körper vorhanden ist. Ist dies nicht der Fall, kurbeln sie die Produktion in der Zelle an. Rauser will herausfinden, wie diese Proteine zusammenarbeiten.

WIRKSAMER ANGRIFF AUF BAKTERIEN

Auch das Bakteriengift von *Photorhabdus luminescens* könnte medizinisch wichtig sein, obwohl es auf den ersten Blick nicht so scheint. Mit derartigen Giften hat die Natur nämlich auch Mikroorganismen ausgestattet, die uns Menschen gefährlich werden. Zum Beispiel Salmonellen oder den Erreger der Lungen- und Beulenpest *Yersinia pestis*.

Die von Rausers Team gewonnenen Erkenntnisse werden helfen, auch die Wirkungsweise solcher Bakterien besser zu verstehen. Darüber hinaus könnten die Tc-Toxine auch als Nanospritzen in der Medizin eingesetzt werden. Medikamente ließen sich so in Körperzellen spritzen. So könnten auch Krebszellen gezielt attackiert werden.

„Im Moment suchen wir auf der Zellmembran nach dem Rezeptor für das Gift. Wenn wir ihn gefunden haben und die Bindung an die Zelloberfläche verstehen, wollen wir diesen Bereich des Proteins gezielt verändern, sodass er

Krebszellen erkennt. Damit könnte man ein Killerenzym ausschließlich in Tumorzellen injizieren“, erklärt Rauser.

Außerdem versucht er mit seinem Team andere Wirkstoffe in den Proteinkokon zu stecken – der Giftkocher eines Bakteriums als hochempfindlicher Wirkstofftransporter sozusagen. Der Kokon könnte aber auch genutzt werden, um Reparaturenzyme einzuschleusen und kranke Zellen zu heilen.

Gartenbesitzer nutzen übrigens schon längst die Symbiose zwischen *Photorhabdus luminescens* und Fadenwurm, ohne von der raffinierten Giftspritze etwas zu ahnen – als natürliches Insektizid. Ein Tütchen davon ins Gießwasser, und das Toxin ihrer Symbionten vernichtet zuverlässig die nimmersatten Larven von Dickmaulrüssler, Gartenlaub- und Junikäfer, die sich so gern über die Wurzeln von Pflanzen hermachen. ◀

AUF DEN PUNKT GEBRACHT

- Die Auflösung von Elektronenmikroskopen ist heute so hoch, dass Forscher damit die räumliche Struktur von Proteinen sichtbar machen können. So lassen sich vor allem Proteine untersuchen, die sich zu großen Komplexen zusammenlagern.
- Proteinkomplexe arbeiten wie molekulare Maschinen in der Zelle. Tc-Toxine aus Bakterien beispielsweise bilden komplizierte Injektionsapparate, mit denen die Mikroben ein Gift in Zellen spritzen können.

GLOSSAR

Endosomen sind winzige Membranbläschen, die von der Zellmembran nach innen abgeschnürt werden. So kann die Zelle Proteine aus ihrer äußeren Hülle ins Innere transportieren. Sie sind Teil eines Transportsystems aus unterschiedlichen Vesikeln. Auf einem dieser Transportwege verschmelzen die Endosomen mit sogenannten Lysosomen, in denen der Vesikelinhalt verdaut wird.

Röntgenstrukturanalyse: Ein Verfahren, mit dem ebenfalls der Aufbau von Proteinen untersucht werden kann. Dabei werden Röntgenstrahlen durch die Proteine gebeugt. Aus den Beugungsmustern lässt sich dann die räumliche Struktur der Proteine berechnen. Dazu müssen diese allerdings in Kristallform vorliegen, was mitunter schwierig ist. Große Proteinkomplexe lassen sich nur schwer kristallisieren.

Wer begleitet mich auf meinem Karriereweg?

Die Antwort:
academics.de,
der führende
Stellenmarkt für
Wissenschaftler

academics.de - das Ratgeber-Karriereportal mit Stellenangeboten, Themen-Spezialen und Services für die berufliche Laufbahn in Wissenschaft und Forschung. Inklusive Ratgeberinformationen zu Berufseinstieg, Gehälter in der Wissenschaft, Promotionsberatung, Alternative Karrierewege für Forscher u.v.m.

Sie suchen neue Mitarbeiter?

Informieren Sie sich jetzt unter academics.de/arbeitgeber

 **academics.de/maxplanck**
Das Karriereportal für Wissenschaft & Forschung