

Röntgenblitzlicht für komplexe Moleküle

Freie-Elektronen-Laser liefern Schnapsschüsse von Proteinkristallen und Viren.

Für die Chemie und die Biologie ist es unerlässlich, die atomare Struktur komplexer Moleküle zu kennen. Die Methode der Wahl besteht gegenwärtig darin, die Struktur von Einkristallen an modernen Synchrotronstrahlungsquellen zu bestimmen. Seit 1997 wurde der Chemie-Nobelpreis viermal für Arbeiten dieser Art verliehen, zuletzt 2009. Allerdings ist es sehr schwer, größere Einkristalle aus großen biologischen Komplexen herzustellen, z. B. den besonders wichtigen Membranmolekülen. Zudem schädigt die Strahlung die Kristalle, sodass sich dieses Verfahren seinen Grenzen nähert. Hier können die neuen Freie-Elektronen-Laser (FEL) im Röntgenbereich helfen. Sie liefern bei Wellenlängen von 100 bis 0,1 nm extrem intensive, lateral kohärente Strahlung in Pulsen, die zwischen 20 und 300 Femtosekunden kurz sind. Dabei enthält ein 50 fs kurzer Puls genauso viele Photonen, wie die besten Synchrotronstrahlungsquellen in einer Sekunde liefern, nämlich 10^{12} bis 10^{13} [1–3]. Röntgenpulse dieser extremen Intensität zerstören die zu untersuchenden Moleküle. Modellrechnungen zeigten jedoch, dass es möglich

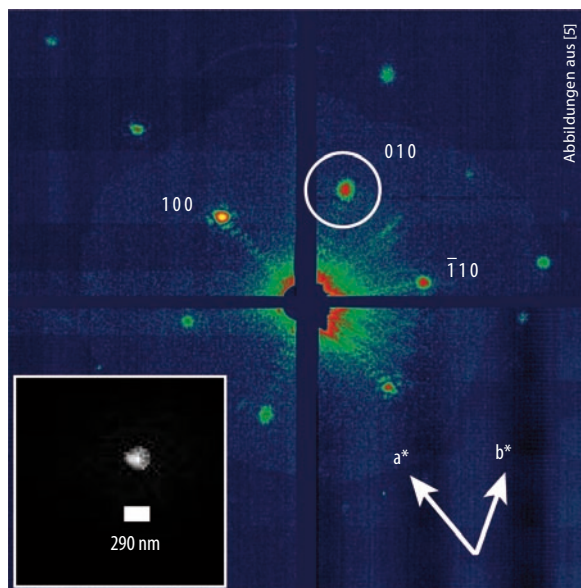


Abb. 1 Mit extrem intensiven Röntgenstrahlen in Vorwärtsrichtung aufgenommene Einzelschuss-Beugungsbilder (logarithmisch aufgetragene Falschfarben-Skala) enthüllen die Struktur eines Nanokristalls (Inset^{+) eines komplexen Moleküls (Photosystem I), das eine wichtige Rolle bei der Photosynthese spielt.}

ist, die Streubilder des ungestörten Moleküls und damit die Strukturinformation zu erhalten, bevor es unter Strahlenschäden leidet bzw. explodiert [4]. An der Linac Coherent Light Source (LCLS) am SLAC in Stanford ist es kürzlich gelungen, auf diese Weise Beugungsbilder sehr kleiner Proteinkristalle aufzunehmen [5] bzw. Schnapsschüsse eines Virus [6].

Bereits 2006 gelang es am FLASH-Laser beim DESY in Hamburg zu zeigen, dass das Verfahren

der Einzelschuss-Abbildung prinzipiell funktioniert [7]. Als Objekt diente dabei eine „Figurengruppe“, die in eine 20 nm dicke SiN_3 -Folie gefräst war. Mit einem einzelnen Puls der Wellenlänge 32 nm ließ sich das Streubild aufnehmen und daraus mit etablierten Methoden zur Phasenrekonstruktion das ursprüngliche Bild vollständig reproduzieren. Die Leistungsdichte des 25 fs kurzen und auf 20 μm Durchmesser fokussierten Pulses betrug $4 \times 10^{13} \text{ W cm}^{-2}$. Das Target erreichte dadurch geschätzte 60 000 K und verdampfte vollständig.

Am SLAC gelang es nun, mit einzelnen Schüssen die Streubilder von 100 bis 1000 nm kleinen Kristallen aufzunehmen (Abb. 1) [6]. Solch kleine Kristalle lassen sich sehr viel leichter herstellen als größere, wie sie das klassische Verfahren voraussetzt. Zudem scheinen sie auch von besserer Qualität zu sein. Daher erlaubt es diese Methode, die Grenzen der klassischen Proteinkristallographie zu überwinden. Bei dem „proof of principle“-Experiment am SLAC diente als Objekt ein komplexes Membranproteinmolekül („Photosystem I“), das in der oxygenen Photosynthese Lichtenergie in chemische Energie umwandelt. Dabei kreuzte der FEL-Strahl einen feinen Wasserstrahl, der vollständig hydra-

+) Die im Inset gezeigte Form des Nanokristalls wurde anhand des eingekreisten Bragg-Reflexes berechnet. Die Interferenzen zwischen den Bragg-Reflexen sind ein direktes Maß für die Anzahl der Einheitszellen im Kristall entlang einer bestimmten Raumrichtung.

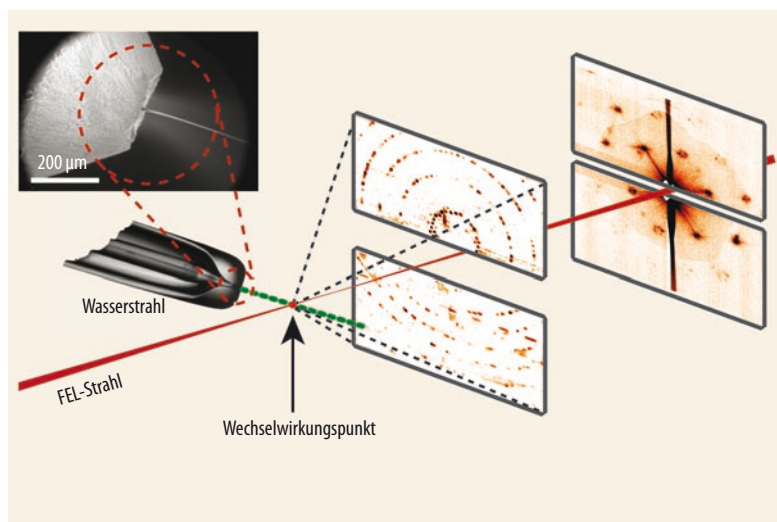


Abb. 2 Nanokristalle in ihrer Pufferlösung werden mit Gaslinsen auf einen Strahldurchmesser von 4 μm fokussiert und kreuzen den FEL-Strahl am Wechselwirkungspunkt. Zwei pnCCD-Flächendetektoren, die jeweils geteilt sind und den direkten Strahl durchlassen, nehmen die

Streustrahlung auf. Der weiter entfernte Detektor misst die Vorwärtsstreuung, der näher am Wechselwirkungspunkt positionierte Detektor mit seinen asymmetrisch zum direkten Strahl aufgestellten Hälften misst die Bragg-Reflexe bis zum höchsten erreichbaren Impulsübertrag.

tisierte Kristalle von Photosystem I enthielt (Abb. 2). Drei Millionen Einzelschuss-Beugungsbilder wurden aufgenommen, bei unterschiedlichen Randbedingungen.

Da die FEL-Strahlung lateral kohärent ist, zeigen die in Vorwärtsstreuung aufgenommenen Beugungsbilder eine Fülle zusätzlicher Informationen, aus denen sich unter anderem die Größe und Form des streuenden Kristalls rekonstruieren lässt. Da jeder Kristall unterschiedlich groß ist, variiert die Intensitätsverteilung der Bragg-Reflexe im reziproken Raum. Anders als bei der klassischen Strukturbestimmung lässt sich die benötigte integrale Reflektivität nicht durch Drehung des Kristalls ermitteln. Jedes Einzelschuss-Beugungsbild zeigt also nur einen Teil der integralen Reflektivität der angeregten Bragg-Reflexe. Hinzu kommt, dass die Intensität der heutigen FELs von Puls zu Puls um etwa zehn Prozent schwankt. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurden in jedem der vielen Einzelschuss-Beugungsbilder die Reflexe indiziert und die Intensitäten zu jedem Index aufsummiert. Monte-Carlo-Verfahren integrierten dann über das Reflexvolumen im reziproken Raum, die Verteilung der Kristallformen und Orientierungen sowie die Variationen in der Einfallsintensität. Dieser Ansatz funktioniert nur, wenn das System hinreichend überbestimmt

ist. Bei dem Experiment waren etwa 100 000 interpretierbare Beugungsbilder notwendig, deren Aufnahme etwa fünf Stunden dauerte. Bei der Wellenlänge von 0,69 nm und dem vorgegebenen pnCCD-Flächendetektor [8] betrug die erreichbare Auflösung 0,85 nm. Die damit berechnete Elektronendichte des Photosystem-I-Moleküls stimmte sehr gut mit den Ergebnissen der klassischen Strukturbestimmung überein (Abb. 3). Inzwischen erreichten LCLS-Messungen mit harter Röntgenstrahlung (0,085 nm) eine Auflösung von 0,3 nm (am Photosystem I).

Zu erwarten ist, dass die Nano-Kristallographie mit intensiven fs-Röntgenblitzen einen weiteren Durchbruch in der Strukturbestimmung ermöglicht, mit besonderer Bedeutung für die Strukturbiologie. Eine verbesserte Fokussierung sollte die Strahlungsdichte um bis zu fünf Größenordnungen steigern, sodass die Vermessung noch sehr viel kleinerer Kristalle und die Untersuchung chemischer Reaktionen in Reichweite rücken. Damit bietet sich erstmalig die Möglichkeit, Struktur und Dynamik von Materie mit atomarer Längen- und Zeitauflösung zu untersuchen.

Eine der faszinierendsten Anwendungen sind Einzelschussaufnahmen der Struktur einzelner Biomoleküle mit dem Ziel, aus einer Folge solcher Bilder einen Film

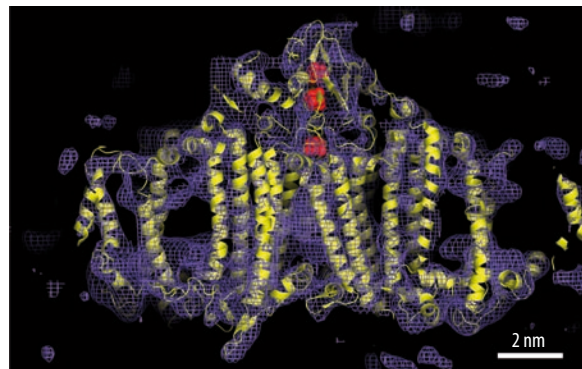


Abb. 3 Hier ist ein Ausschnitt der Elektronendichte des Photosystem I-Moleküls sehen. Sie wurden aus den Einzelschuss-Beugungsbildern berechnet, die am LCLS Freie-Elektronen-Laser von SLAC in Stanford mit einer Wellenlänge von 0,69 nm und bei Pulslängen von 70 fs aufgenommen wurden.

zu rekonstruieren, der molekulare Maschinen bei der Arbeit zeigt. Als weiterer Schritt auf diesem Weg gelangen ebenfalls an der LCLS Einzelschuss-Aufnahmen des Mimivirus, des größten heute bekannten Virus mit einem Durchmesser von 0,45 μm [6]. Im Unterschied zur Elektronenmikroskopie der äußeren Hülle des Virus zeigen die rekonstruierten Einzelschuss-Bilder Dichtefluktuationen in seinem Inneren. Die geschätzte räumliche Auflösung beträgt 32 nm. Gegenwärtig ist unklar, wie reproduzierbar die inneren Strukturen dieses Virus sind und ob es sich dabei überhaupt um Strukturen handelt, die in jedem Exemplar identisch sind. Messungen bei kürzeren Wellenlängen und damit besserer Auflösung sowie mit intensiveren Pulsen sollen diese offenen Fragen beantworten. Die Fortschritte sind beeindruckend, aber es dürfte noch ein langer Weg sein, bis sich die Dynamik einzelner Biomoleküle mithilfe von FEL-Einzelschuss-Aufnahmen untersuchen lässt.

Jochen R. Schneider

KURZGEFASST

■ Doppler-Effekt umgekehrt

In Materialien mit negativen Brechungsindex kann sich der Doppler-Effekt umkehren: Bewegt sich eine Lichtquelle in einem solchen Material von uns fort, so erhöht sich ihre Frequenz, statt sich zu verringern. Das haben nun chinesische Forscher um Min Gu erstmals mit infrarotem Licht an einem zweidimensionalen photonischen Kristall beobachtet, der die Form einer Raute mit 5 mm Seitenlänge hat. Der Kristall bestand dabei aus zahllosen 50 μm langen und 2 μm dicken Siliziumstäbchen im Abstand von jeweils 5 μm .

Bei ihrem Experiment benutzten die Forscher einen CO_2 -Laser mit der Wellenlänge von 10,6 μm , für die der berechnete Brechungsindex $n = -0,7$ be-

trägt. Um den Doppler-Effekt hervorzuheben, setzten die Forscher den Kristall auf eine Plattform, die ihn mit einigen hundertstel Millimetern pro Sekunde senkrecht zum einfallenden Strahl auf den Detektor zu bewegte. Aufgrund des negativen Index brach der Kristall den Strahl in Bewegungsrichtung. Vor dem dort platzierten Detektor führten die Wissenschaftler das Licht mit einem vorher ausgekoppelten Referenzstrahl wieder zusammen und vermaßen die sich ergebende Schwebung. Der Doppler-Effekt wäre sonst unterhalb der Nachweisgrenze geblieben. Wie erhofft stellte sich die umgekehrte Frequenzabhängigkeit ein, die Gegenprobe lieferte ein „normales“ Zinkselenidprisma. Jiabi Chen et al., Nature Photonics, doi:10.1038/nphot.2022.17 (2011)

- [1] W. Ackermann et al., Nature Photonics **1**, 341 (2007)
- [2] P. Emma et al., Nature Photonics **4**, 641 (2010)
- [3] J. Feldhaus et al., Physik Journal, April 2008, S. 37
- [4] R. Neutze et al., Nature **406**, 752 (2000)
- [5] H. N. Chapman et al., Nature **470**, 73 (2011)
- [6] M. M. Seibert et al., Nature **470**, 78 (2011)
- [7] H. N. Chapman et al., Nature Physics **2**, 838 (2006)
- [8] L. Strüder et al., Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A **614**, 483 (2010)

Prof. Dr. Jochen R. Schneider, Center for Free-Electron Laser Science CFEL, Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY, Notkestr. 85, 22607 Hamburg