

β provided $\alpha > \beta^2$. If $\alpha < \beta^2$ there is just 1 maximum at $y=0$. If the higher-order cumulants are sufficiently large the point $\mathbf{u}=\mathbf{x}$ need not be an absolute maximum and the question as to whether the probability density function may be better described as a sum of probability densities from more than one probability density function may only be resolved by comparing the results so obtained.

References

- BIRSS, R. R. (1964). *Selected Topics of Solid State Physics, Vol. II, Symmetry and Magnetism*. Amsterdam: North Holland.
- CRAMER, H. (1946). *Mathematical Methods of Statistics*. Princeton Univ. Press.
- JOHNSON, C. K. (1970). In *Thermal Neutron Diffraction*, edited by B. T. M. WILLIS, chap. 9. Oxford Univ. Press.

Acta Cryst. (1974). A31, 337

Indirekte Lichtbeugungsversuche an Stäbchenaussengliedern des Frosches

VON J. ROSENKRANZ

Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Zellmorphologie, D-463 Bochum, Postfach 2148, Gebäude NDEF 05, Deutschland (BRD)

(Eingegangen am 29. Oktober 1973; angenommen am 26. November 1974)

Light diffraction and image reconstruction experiments have been done with photomicrographs obtained from two different objects: one type of object was an electron micrograph taken from ultrathinly sectioned rod outer segments of the retina of the frog *Rana esculenta*. (The outer segments are the biological structures by which light is converted into electrical excitation.) The other type of object was a photo-reproduction of a model drawing. This model represents an essentially unmodified version of a working hypothesis put forward earlier as an interpretation of (the direct lattice of) electron micrographs from freeze-etched rod outer segments. The comparison of the reciprocal lattices of the two types of object leads to good agreement as far as any comparison between a biological organelle and a geometrical model allows; the same is true for the comparison between the original electron micrograph and its reconstruction by double light diffraction. Hence the working hypothesis on the fine structure of the rod outer segment is further supported.

Einführung

Die Stäbchenaussenglieder (Stäbchen) stellen diejenigen Strukturen in der Wirbeltiernetzhaut dar, in denen das einfallende Licht in elektrische Erregung umgewandelt wird. Das Stäbchen ist im Prinzip ein Zylinder aus über tausend aufeinandergestapelten Schichten von insgesamt 50 μm Länge und 6 μm im Durchmesser. Die Stäbchenquerschnittsfläche ist rosetten- oder kleeblattartig gegliedert. Jedes einzelne im Querschnitt kleeblattförmige Segment des Stäbchens kann als Parakristall angesehen werden, weil einerseits Teile der Schichten aus einem – in Grenzen – regelmässigen Fibrillengeflecht zu bestehen scheinen und andererseits die übereinander gestapelten Schichten nicht starr miteinander verbunden sind: aufgrund des hohen Wassergehaltes im Stäbchen müssen sie vielmehr als in einer Matrix schwebend vorgestellt werden. Aus diesem Grunde erfüllen die Bestimmungstücke der Elementarzellen im Laufe der Zeit eine Statistik; das elektronenmikroskopische Bild spiegelt nur eine Momentaufnahme einer keinesfalls statischen biologischen Struktur wider.

Die Aussage, die Stäbchen des Frosches *Rana esculenta* seien im Prinzip parakristallin aufgebaut, wurde als Arbeitshypothese aufgestellt (Rosenkranz, 1970) und in weiteren Untersuchungen (Hauser & Rosenkranz, 1971; Rosenkranz & Hauser, 1972; Rosenkranz, 1973) in wesentlichen Teilen abgesichert. Eine weitere Prüfung der Arbeitshypothese stellen die Ergebnisse der Lichtbeugungsversuche dar, die an elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Stäbchen und an Modellzeichnungen durchgeführt wurden, sowie die Rekonstruktionen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Über diese Ergebnisse soll kurz berichtet werden.

Versuche

An einem umgebauten Diffraktometer der Firma Polaron Equipment (Watford, England) konnten noch Periodizitäten im Objekt mit ihrer ± 2 . Ordnung nachgewiesen werden, deren Gitterkonstante $a=0,22$ nm betrug, entsprechend, im vorliegenden Falle, 40 Å im elektronenmikroskopischen Präparat. Mit diesem Gerät wurden zwei Reihen von Lichtbeugungsversuchen vorgenommen: einmal dienten als Objekt für die

Lichtbeugung elektronenmikroskopische Aufnahmen von fixierten, eingebetteten und ultradünn geschnittenen Stäbchen, zum anderen Reproduktionen von gezeichneten Modellstrukturen.

Das Diffraktometer bestand aus einer optischen Bank, auf der gemäss Fig. 1 ein HeNe-Laser 'Model 80' (Fa. Coherent Radiation, Palo Alto, California, USA), $\lambda = 6328 \text{ \AA}$, montiert war, sowie eine Blende von $70 \text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser, eine Plankonvexlinse von $f = 14 \text{ cm}$ Brennweite, ein Verschluss, das Objekt, eine Konvexplanlinse von $f = 14 \text{ cm}$, eine Okularlinse von $f = 1,6 \text{ cm}$, ein drehbares Polarisationsfilter 58 ES (Fa. B. & W.-Filterfabrik J. Weber, Wiesbaden), ein Messauge eines Mikro-Belichtungsmessers Microsix-L (Fa. Leitz, Wetzlar) und eine Filmplatte zur Aufnahme des reziproken Gitters. Zur Herstellung der Rekonstruktion wurde an die Stelle der Filmplatte eine Lochmaske gesetzt, unmittelbar gefolgt von zwei plankonvexen Linsen, 14 cm im Durchmesser und mit Brennweiten von je 100 cm , sowie im grösseren Abstand gefolgt von einer Okularlinse mit $f = 1,6 \text{ cm}$; das sekundäre Bild wurde dann wieder auf einer Filmplatte registriert. Das Diffraktometer wurde mit einem Eichobjekt bestehend aus zwei Punkten von je 1 mm Durchmesser im Abstand von $7,4 \text{ mm}$ justiert, d.h. es wurden scharfe, dunkle Interferenzstreifen im Airy-Scheibchen eingestellt. Der Rekonstruktionsteil des Diffraktometers wurde mit einem Kupfergitter der Maschenweite $0,90 \text{ mm}$ justiert.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen [Fig. $i(a)$, $i = 2, 3, 4$] wurden wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben hergestellt (Rosenkranz, 1973). Hierbei wurden die Stäbchen in einem Gemisch aus Glutaraldehyd, Cacodylatpuffer und Wasserstoffperoxid fixiert, nicht mit Osmiumtetroxid nachfixiert, in Hexylenglykol entwässert und in Epon eingebettet. Die Aufnahmen wurden im Grössenverhältnis 1:1 umkopiert und waren 53500-fach elektronenoptisch vergrössert.

Die Modelle wurden als quadratische Ausschnitte gezeichnet und zwar derart, dass mindestens fünf Wiederholungen einer periodischen Struktur vorhanden waren; sie wurden anschliessend auf 1 cm Kantenlänge reduziert. Ausschnitte dieser Modelle zeigen die Fig. $i(d)$ ($i = 2, 3, 4$).

Von allen diesen Objekten, die als die direkten Gitter beim Beugungsvorgang aufzufassen sind, wurden mit dem Diffraktometer Beugungsdiagramme, also die reziproken Gitter, hergestellt und auf 'Agfapan 200 Professional' (Fa. Agfa-Gevaert) fotografiert. So erzeugten die Fig. $i(a)$ die Fig. $i(b)$ und die Fig. $i(d)$ die Fig. $i(e)$, $i = 2, 3, 4$. Von den Negativen $i(b)$ wurden Lochmasken hergestellt, mit denen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen $i(a)$ dann wieder – 10,4-fach vergrössert und seitenverkehrt – rekonstruiert wurden: Fig. $i(c)$. In den Lochmasken waren genau diejenigen Beugungsreflexe herausgestanzt, die in den Fig. $i(b)$ mit einem Kreis umgeben sind. Die untere Kante aller Figuren verläuft parallel mit der Horizontalen im Ex-

periment. Der Laser ist jeweils normal zur und oberhalb der Papierebene zu denken.

Ergebnisse und Diskussion

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Fig. $i(a)$, $i = 2, 3, 4$, stellen Flächenausschnitte dar, deren Normalen mit denen der entsprechenden Ausschnitte des hypothetisch angenommenen Modells Fig. $i(d)$ zusammenfallen. Das Modell wurde in leicht abgewandelter Form als Arbeitshypothese aus anderen Versuchen erschlossen (Rosenkranz, 1970). Eine Betrachtung des ersten der letztlich von den Stäbchen erhaltenen Beugungsdiagramme Fig. 2(b) zeigt, dass nicht nur, wie zu erwarten war, durch übereinandergestapelte Membranlamellen [Fig. 2(a)] die Reflexe 000, 001, 002, 003, 00 $\bar{1}$, 00 $\bar{2}$, 00 $\bar{3}$ auftreten, sondern auch in davon abweichenden Richtungen [20 $\bar{1}$], [20 $\bar{2}$] und [201], [202]. Die Indizierung der Reflexe ist von den entsprechenden reziproken Gittern [Fig. $i(e)$] der Modellansichten auf die reziproken Gitter [Fig. $i(b)$] übertragen worden. Im Falle der a_1^* , a_3^* -Projektion weichen die Winkel zwischen den reziproken Koordinatenachsen a_1^* , a_3^* jedoch um 10% voneinander ab. Bezüglich der Reflexe ist zu erwähnen, dass andere als die oben aufgezählten Reflexe in hinreichender Intensität nicht auftreten. Das liegt erstens daran, dass allgemein die Reflexintensitäten bei nicht exakt kristallinen Strukturen mit zunehmendem Abstand vom Primärstrahl 000 stark abnehmen und zweitens daran, dass, wie ein Blick auf das entsprechende reziproke Gitter des Modells [Fig. 2(e)] vermuten lässt, durch die vorliegende Struktur einige Reflexe ausgelöscht sind.

Die Anordnung der Intensitäten in Fig. 2(e) ist zwar notwendig aber nicht hinreichend für die Behauptung, das Modell Fig. 2(d) entspricht in wesentlichen Zügen der elektronenmikroskopischen Aufnahme Fig. 2(a), da die Phasenbeziehungen zwischen den Reflexintensitäten fehlen. Dieser Mangel wird zum Teil durch die Rekonstruktion Fig. 2(c) der elektronenmikroskopischen Aufnahme Fig. 2(a) ausgeglichen. Die Rekonstruktion zeigt wie das Original eine horizontale Querschichtung. Jede dieser Schichten weist in Andeutungen (man beachte die weissen Pfeile) schräg verlaufende

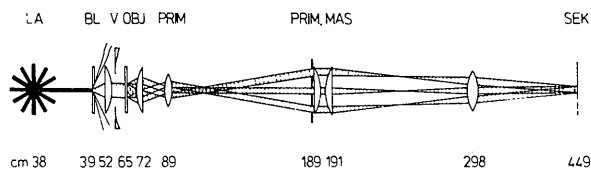


Fig. 1. Aufbau des Diffraktometers. Die Längenangaben bedeuten die Abstände der betreffenden Gegenstände auf der optischen Bank bezogen auf ihr linkes Ende. Im einzelnen bedeuten: LA Laserausgang, BL Blende, V Verschluss, OBJ Objekt, an dem die Beugung auftritt, PRIM primäres Bild (nach Abbe), PRIM.MAS Registrierebene des vergrösserten primären Bildes, gleichzeitig Ort der Lochmaske für Rekonstruktion, SEK sekundäres, rekonstruiertes Bild.

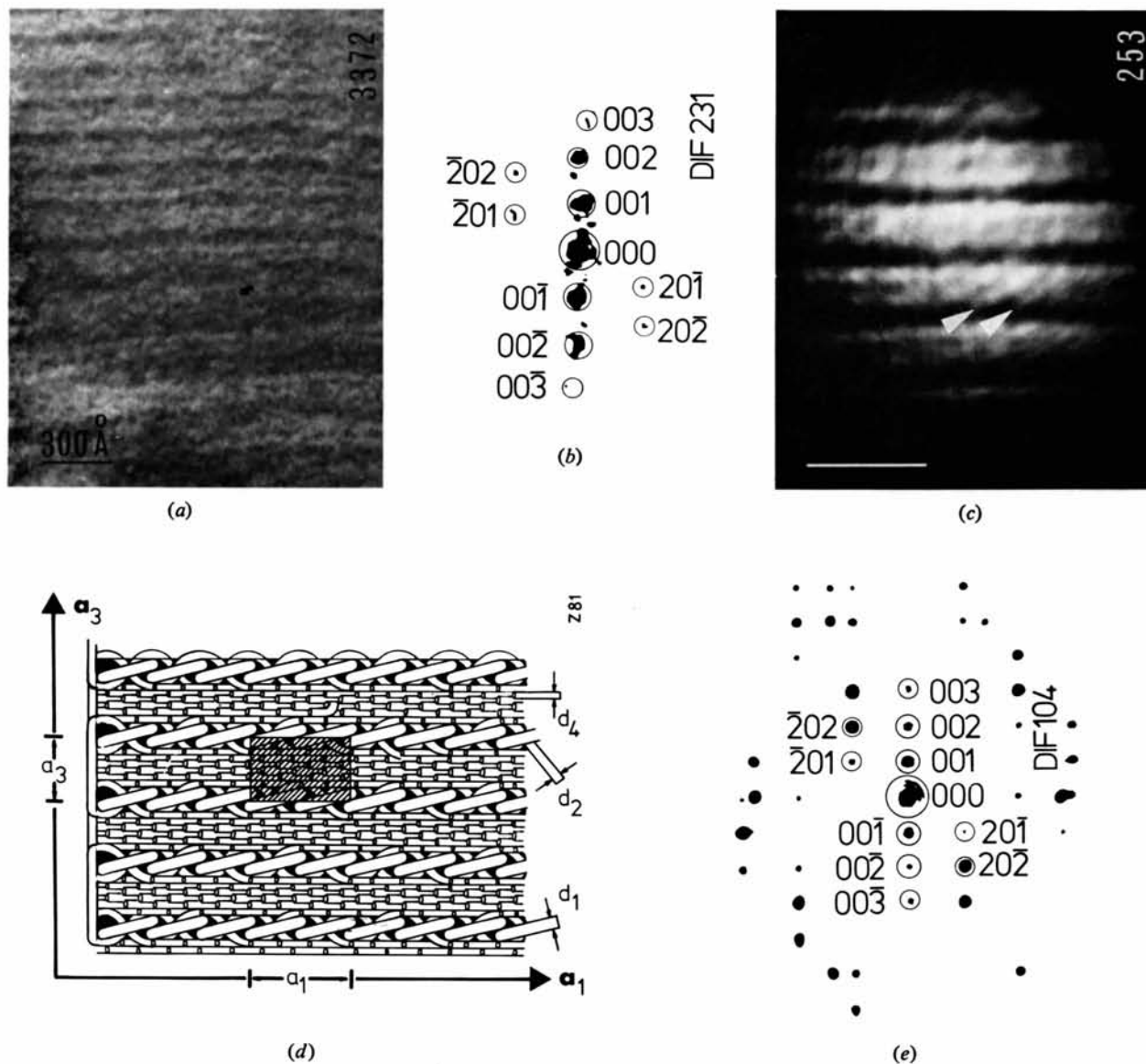
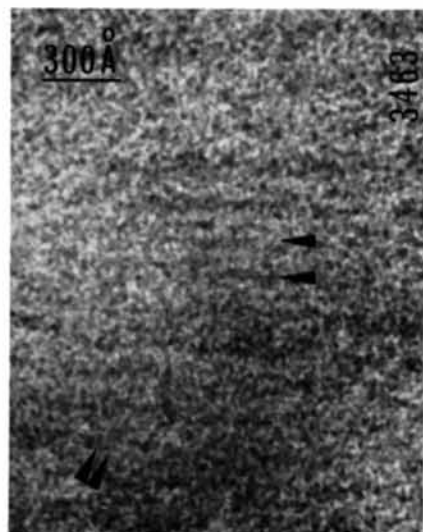
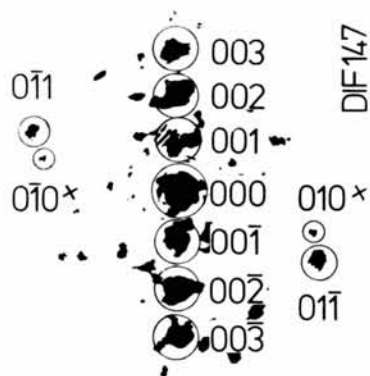


Fig. 2. Die a_1, a_2, a_3 -Ansicht des (parakristallinen) Stäbchenaufbaus. Die a_1, a_2, a_3 sind die Elementarzellenvektoren des direkten Gitters. Die Pfeile deuten im allgemeinen die Richtung der Fibrillen an, nur in Fig. 3 (a, c) markieren die waagerechten Pfeile die Länge a_3 . Es bedeutet stets in der Figurenbezeichnung ($i=2,3,4$): $i(a)$ einen Ausschnitt der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Stäbchens; Gesamtvergrößerung $322\ 000\times$, $i(b)$ das von der links daneben stehenden Aufnahme $i(a)$ hergestellte reziproke Gitter in richtiger Orientierung zum Objekt; 1,27-fach nachvergrößert, $i(c)$ die Rekonstruktion des Originals $i(a)$; als Reflexe waren nur die in $i(b)$ eingekreisten Reflexe des primären Interferenzbildes zugelassen; Kontaktabzug; Massstabsbalken entspricht $300\ \text{Å}$, $i(d)$ den zu $i(a)$ gehörigen Ausschnitt aus dem hypothetisch angenommenen Modell der Stäbchenstruktur; schraffiertes Gebiet: Projektion der Elementarzelle, $i(e)$ das mittels der Modellansicht $i(d)$ als direktem Gitter hergestellte reziproke Gitter in richtiger Orientierung zum Modell; 1,27-fach nachvergrößert.



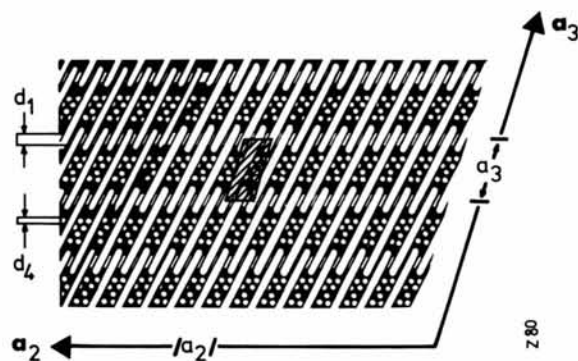
(a)



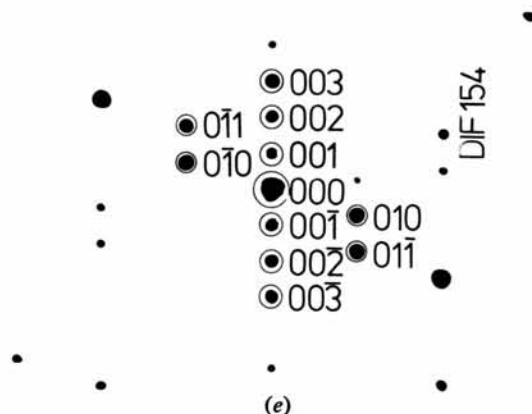
(b)



(c)

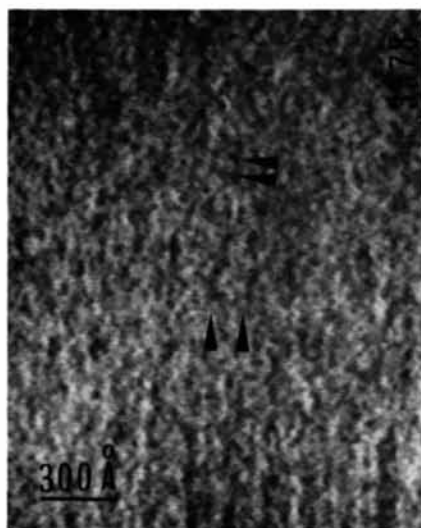


(d)

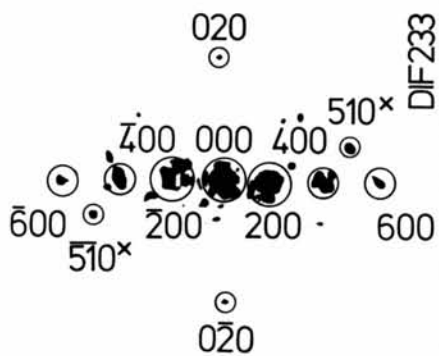


(e)

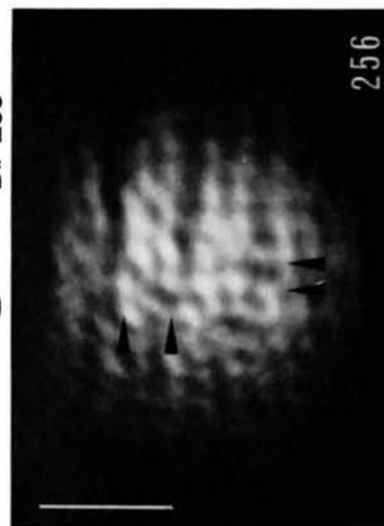
Fig. 3. Die a_2, a_3 -Ansicht. S. die Legende Fig. 2.



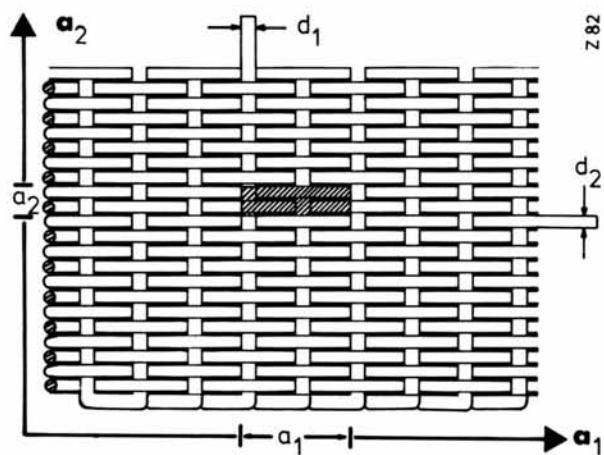
(a)



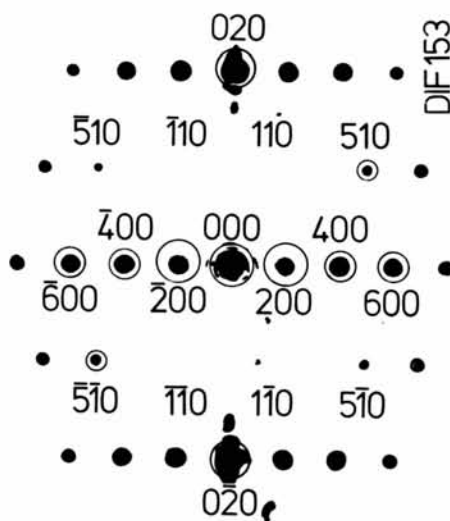
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 4. Die a_1, a_2 -Ansicht. S. die Legende Fig. 2.

kurze Fibrillen auf – ähnlich den d_1 -Fibrillen im Modell Fig. 2(d). Die im Modell geforderten dünneren und nur in kurzen Anschnitten sichtbaren d_4 -Fibrillen haben den Filterprozess dagegen nicht überlebt. Das ist ein Hinweis darauf, dass die d_4 -Fibrillen im Original entweder nicht existieren oder völlig ungeordnet auftreten. Dieses Ergebnis muss noch weiter untersucht werden.

Die auf der vorhergehenden senkrecht stehende Fläche zeigt Fig. 3(a). Die hiervon hergestellte Aufnahme Fig. 3(b) ist zwar nicht in dem Masse frei von störendem Untergrund wie zum Beispiel Fig. 2(b), aber dennoch ist zu erkennen, dass nur die Reflexe 001, 002, 003, 010 und 01 $\bar{1}$ ihre deutlichen Entsprechungen haben: 00 $\bar{1}$, 00 $\bar{2}$, 00 $\bar{3}$, 0 $\bar{1}$ 0 und 0 $\bar{1}$ 1. Ein Vergleich mit dem entsprechenden reziproken Gitter Fig. 3(e) zeigt, dass genau diese Reflexe in Primärstrahlhöhe nur zu erwarten sind, wenn auch im Falle der mit einem Kreuz versehenen Reflexe 0 $\bar{1}$ 0 und 010 Intensität und Abstand vom nächsten Nachbarn etwas grösser sein sollten.

Für den beiden folgenden Rekonstruktionen gelten dieselben allgemeinen Überlegungen, wie sie oben für Fig. 2(c) angestellt wurden. Die Rekonstruktion 3(c) zeigt wieder die zwei markantesten Struktureinheiten des zugehörigen Modells und Originals: die angenähert horizontale Schichtung im Abstand a_3 und die schräg verlaufenden, kurzen d_2 -Fibrillen [die unteren schwarzen Pfeile in den Fig. 3(a) und (c); die horizontalen Pfeile dagegen deuten die Lamellenperiode a_3 an]. Unerklärlich bleibt die hauptsächlich in den Randbereichen auftretende dünne Streifung von links unten nach rechts oben in Fig. 3(c).

Fig. 4(b) lässt wieder die Reflexe erkennen, die zu erwarten sind, wenn das Modell in seinen Grundzügen richtig ist. Es sind dies die Reflexe 000, 200, 400, 600, 510 und 020 sowie $\bar{2}$ 00, $\bar{4}$ 00, $\bar{6}$ 00, $\bar{5}$ $\bar{1}$ 0 und 0 $\bar{2}$ 0. Das reziproke Gitter [Fig. 4(e)] der zugehörigen Modellansicht weist zwar innerhalb des in Betracht zu ziehenden Umkreises noch sechs weitere Reflexe auf, die aber alle von geringerer Intensität sind als der Schwächste noch registrierte. Eine Diskrepanz zum reziproken Gitter des Modells besteht aber in den zwei mit einem Kreuz markierten Reflexen; ihre Lage weist darauf hin, dass die d_2 -Fibrillen in Fig. 4(d) nicht alle denselben Abstand haben, sondern dass zwei verschieden grosse Abstände zwischen den d_2 -Fibrillen jeweils abwechseln.

Die Rekonstruktion Fig. 4(c) zeigt hier in Umrissen erkennbar, dass sich zwei Gruppen parallel verlaufender Fibrillen senkrecht kreuzen; die Paare schwarzer Pfeile in den Fig. 4(a) und (c) mögen das verdeutlichen. Das steht im Einklang mit dem im Modell Fig. 4(d) angegebenen Gitter aus d_1 - und d_2 -Fibrillen.

Für die monokline Elementarzelle ($\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3$) ergeben sich aus den Beugungsaufnahmen folgende gemittelte Werte:

$$\begin{aligned} a_1 &= 254 \text{ \AA}, & \alpha_1 &\equiv \langle \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3 \rangle \simeq 106^\circ, \\ a_2 &= 103 \text{ \AA}, & \alpha_2 &\equiv \langle \mathbf{a}_1, \mathbf{a}_3 \rangle \simeq 90^\circ, \\ a_3 &= 183 \text{ \AA}, & \alpha_3 &\equiv \langle \mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2 \rangle \simeq 90^\circ. \end{aligned}$$

Der relative Fehler dieser Angaben beträgt im Mittel 19%.

Die auf Grund von Versuchen mit der Gefrierätztechnik aufgestellte Arbeitshypothese führte zu einer orthogonalen Elementarzelle mit Abmessungen, die alle etwa 1,4-fach grösser sind als die oben angegebenen Werte. Dieser Unterschied spiegelt die Wirkung der sehr unterschiedlichen Präparationsmethoden auf das biologische Ausgangsmaterial wider; zugleich wird deutlich, dass einerseits an die Charakterisierung der biologischen Struktur nicht die strengen Maßstäbe für einen klassischen Kristall gelegt werden können, dass andererseits aber diese Struktur einen höheren Ordnungsgrad aufweist als den einer Schichtung. Wenn es sich nicht gerade um Proteinkristalle handelt, sind biologische, periodisch geordnete Strukturen eines höheren Organisationsniveaus im allgemeinen nicht so weitgehend geordnet, dass intensive Reflexe noch von mässig hohen Ordnungen erwartet werden können. Anders müssen dagegen die vom Modell abweichenden Lagen der mit einem Kreuz versehenen Reflexe interpretiert werden: sie deuten auf eine Abweichung des hypothetisch angenommenen Modells von der wahren Struktur des Stäbchens hin. Worin diese Abweichungen genau bestehen, konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Schwerwiegende Änderungen des Modells sollten allerdings nicht nötig sein angesichts der mittels der eingekreisten Reflexe der Fig. *i(b)* und den Originalen [Fig. *i(a)*] hergestellten Rekonstruktionen Fig. *i(c)*. Diese Rekonstruktionen geben die Modellansichten Fig. *i(d)* in ihren Grundzügen richtig wieder.

Es treten also nicht nur die auf Grund des lamellaren Aufbaues zu fordernden Reflexe auf, sondern darüber hinaus auch solche, die auf eine periodisch geordnete Struktur senkrecht zur Lamellennormalen hinweisen. Damit ist eine weitere notwendige Voraussetzung für die früher aufgestellte Arbeitshypothese erbracht, wonach die Stäbchenaussenglieder der Froschnetzhaut parakristallin aufgebaut sind.

Frau Gohr danke ich für die Ausführung der Schreiarbeiten, Frau Gölzenleuchter für die Anfertigung der Zeichnungen und Frau Schmidt für die Herstellung der fotografischen Vergrößerungen.

Literatur

- HAUSER, M. & ROSENKRANZ, J. (1971). *Z. Naturforsch.* **26b**, 486b–487.
 ROSENKRANZ, J. (1970). *Z. Zellforsch.* **111**, 228–262.
 ROSENKRANZ, J. (1973). *Z. Zellforsch.* **143**, 45–52.
 ROSENKRANZ, J. & HAUSER, M. (1972). *Z. Zellforsch.* **132**, 381–402.