

# **Elektronenbeugung mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop als phasenbestimmendem Diffraktometer – von der Ortsfrequenzfilterung zur dreidimensionalen Strukturanalyse an Ribosomen**

**Von Walter Hoppe\***

*Professor Adolf Butenandt zum 80. Geburtstag gewidmet*

Röntgen-Kristallstrukturanalyse und Elektronenmikroskopie sind dem Chemiker als leistungsfähige Untersuchungsmethoden vertraut. In den letzten zwanzig Jahren wurden Grundideen der Röntgenbeugungsanalyse auf die Elektronenmikroskopie übertragen, wodurch ein abbildendes Gerät in ein Elektronendiffraktometer umgewandelt worden ist, mit dem ein alter Traum der Kristallographen – die Messung der zur direkten Berechnung von Strukturen erforderlichen Phasenverschiebungen der Streuwellen – verwirklicht werden kann. Sein wichtigstes Anwendungsgebiet ist – wie das des Röntgendiffraktometers – die dreidimensionale Strukturanalyse in allen Gebieten der Naturwissenschaften. Über die Kristallographie hinaus können aber auch aperiodische Strukturen (gleichsam als Kristalle mit einer einzigen Elementarzelle) dreidimensional untersucht werden. Die Entwicklung von der ersten Idee (Ortsfrequenzfilterung) bis zur Analyse ribosomaler Partikel schildert der vorliegende Fortschrittsbericht. Im Brennpunkt stehen quantitative Methoden zur Messung der Streustrahlung, die auch jenseits der konventionellen Auflösungsgrenze (bis zur atomaren Auflösung) anwendbar sind. 1968 wurde das Prinzip der dreidimensionalen Analyse nativer biologischer Kristallstrukturen mit dem Elektronenmikroskop entwickelt, nach dem heute in mehreren Laboratorien gearbeitet wird. In München konzentrierte sich die weitere Forschung auf die dreidimensionale Analyse aperiodischer und individueller (insbesondere biologischer) Objekte. Untersuchungen an 50S-Untereinheiten des prokaryontischen Ribosoms von *E. coli* zeigten (allerdings nur bei gleicher Orientierung) überraschend gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, welche die Ableitung von fast ideal gemittelten Modellstrukturen aus einer beschränkten Anzahl von Partikeln ermöglicht.

## **1. Einführung**

Es war nicht leicht, einen passenden Titel für einen Bericht über Arbeiten zu finden, die unser Laboratorium für strukturchemische Forschung viele Jahre beschäftigt haben. „Dreidimensionale Elektronenmikroskopie“ erwies sich bald als zu eng und trifft nicht den wichtigen Aspekt der quantitativen Analyse, d. h. der zur Bestimmung der Potentialverteilung (entspricht der ElektronendichteVerteilung bei Röntgenbeugung) erforderlichen Messung von Amplituden und Phasen der Streuwellen. Wird das Elektronenmikroskop zum phasenbestimmenden Diffraktometer, so entspricht die dreidimensionale Elektronenmikroskopie im Prinzip der dreidimensionalen Röntgen-Kristallstrukturanalyse. Bei ähnlichem Aufbau des Werkzeugs Elektronenmikroskop sind verschiedene Diffraktometertypen entwickelt worden. Eine Auswahl der für Chemiker interessanten Strukturbefunde (insbesondere an ribosomalen Partikeln) soll in diesem Beitrag den „Stand der Technik“ skizzieren.

## **2. Die Entwicklung der phasenbestimmenden Diffraktometrie mit dem konventionellen Transmissions-Elektronenmikroskop (CTEM)**

### **2.1. „Computer“, die mit Licht arbeiten**

In den fünfziger Jahren war das Lichtdiffraktometer ein beliebtes Werkzeug der Kristallographen. Den Anstoß zu seiner Verwendung gab die „Zweiwellenmikroskopie“ von Boersch<sup>[1,2]</sup>, der vorschlug, nach dem Beugungsdiagramm eines Kristalls geformte Masken in die Beugungsebene eines mit monochromatischem, kohärentem Licht arbeitenden Mikroskops zu bringen; nach der Theorie muß in der Bildebene des Mikroskops dann eine Abbildung des Kristallgitters (genauer eine zweidimensionale Projektion des Kristallgitters) erscheinen. Hierbei wird das Beugungsdiagramm mit Strahlung der ersten Wellenlänge (Röntgenstrahlung) linsenlos erzeugt, während die Funktion der Linse mit Strahlung der zweiten Wellenlänge (Licht) nachgebildet wird. Dieser Gedanke faszinierte seinerzeit viele, darunter auch W. L. Bragg<sup>[3]</sup>.

Am Beispiel der Zweiwellenlängenmikroskopie kann man besonders leicht eines der grundsätzlichen Merkmale der Strukturanalyse mit Beugungsverfahren erkennen. Die Analyse vollzieht sich in zwei Schritten. Im ersten – und

\* Prof. Dr. W. Hoppe  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Strukturforschung I  
Am Klopfenspitz, D-8033 Martinsried bei München

das ist der physikalisch wesentliche Schritt – werden die Streustrahlen hervorgerufen, welche die komplette Information über die Struktur des Objektes enthalten. Im zweiten Schritt werden ihre Daten in einer Weise verknüpft, welche der mathematischen Operation Fourier-Transformation entspricht. Das Resultat ist unmittelbar die Struktur des untersuchten Objektes. Hat man also alle Daten der Streuwellen, so benötigt man eigentlich kein physikalisches Instrument mehr. Die Verknüpfung der Daten kann auch durch einen entsprechend programmierten Computer erfolgen. In der Tat hat die nachgeschaltete Lichtlinse die Funktion eines solchen Computers – man nennt das Gerät daher heute einen „lichtoptischen Analogcomputer“.

Obwohl inzwischen die sehr viel genaueren Digitalcomputer (gleichsam als „Computerlinsen“) auch diese Aufgabe übernommen haben, ist der lichtoptische Computer noch nicht bedeutungslos geworden. Es sei erinnert, daß sowohl die Röntgen- als auch die Lichtstrahlung Wellen-

charakter hat, und die Wellenlänge des Lichtes etwa um den Faktor  $10^3$  größer ist als die Wellenlänge der Röntgenstrahlen. Wenn man ein lichtoptisches Gerät aufbaut, das geometrisch einem Röntgendiffraktometer entspricht, das aber mit monochromatischem Licht betrieben wird, so lassen sich im Prinzip die gleichen Streueffekte erhalten, wenn man gleichzeitig die atomaren Objekte um etwa den Faktor  $10^3$  vergrößert. Ein solches Gerät wird als Lichtdiffraktometer bezeichnet. Das Lichtdiffraktometer (Fig. 1a) ermöglicht die schnelle Überprüfung von Strukturmodellen. Dazu braucht man nur eine Maske mit kleinen Löchern in Positionen, die man für die Atomanordnung vermutet. Natürlich ist heute so eine Prüfung auch sehr schnell mit einem echten Computer möglich. Dennoch ist das Lichtdiffraktometer besonders in der Elektronenmikroskopie nützlich geblieben (vgl. Abschnitt 2.5 bis 2.7).

Das Lichtdiffraktometer eignet sich vorzüglich, um innere Symmetrien im untersuchten Objekt zu entdecken. So werden z. B. für Aminomoleküle aufgrund einer Anordnung der Atome in regelmäßigen Sechsecken charakteristische Lichtdiffraktogramme erhalten, die durch eine hexagonale Anordnung von starken Streumaxima gekennzeichnet sind (Fig. 1b). Allerdings sieht man diese molekularen Streudiagramme beim Kristall nur durch die „Fenster“ der Kristallreflexe, was ihr Studium erschwert. Schon vor fast dreißig Jahren wurde nachgewiesen, daß sie auch im kontinuierlichen Streuuntergrund der Röntgendiagramme von Einkristallen auftreten<sup>[4]</sup>. Figur 1c zeigt ein solches molekulare Streudiagramm im Untergrund einer Weissenberg-Aufnahme eines Anthrachinonkristalls. Die Untersuchung des diffusen Untergrundes hatte eine Zeitlang Bedeutung für die Strukturanalyse organischer Moleküle, sie wurde sogar bei der Konstitutionsbestimmung von Ecdyson<sup>[5]</sup> benutzt. Seit der Entwicklung der direkten Methoden ist jedoch die Auswertung von zusätzlichen Streudaten (neben den Einkristallreflexen) nur noch in Sonderfällen nutzbringend.

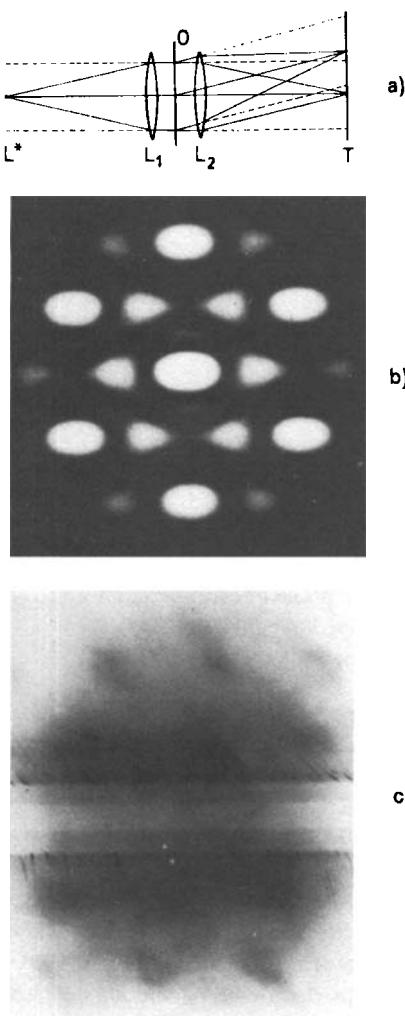


Fig. 1. a) Prinzip des Lichtdiffraktometers. Es erzeugt vom Objekt O ein Beugungsbild. Die Linsen  $L_1$  und  $L_2$  sind unwesentlich; sie sollen nur einen parallelen Strahlengang sowohl des Primärstrahls als auch der Streustrahlen trotz relativ geringer Abstände von der monochromatischen Lichtquelle  $L^*$  und dem Detektor (Film) T gewährleisten. Wenn man sie wegläßt, muß man die Abstände sehr vergrößern. Bei Verwendung von Röntgenstrahlen fehlen die Linsen, doch sind die atomaren Dimensionen des Objektes so klein, daß man Lichtquelle und Detektor immer als unendlich weit entfernt annehmen kann. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den Strahlengang bei Weglassen der Linsen. – b) Lichtdiffraktometrisches Beugungsbild eines Modells (Maske mit Löchern anstelle von Atomen) von Naphthalin. – c) Abbildung der Fouriertransformierten von Anthrachinon in der diffusen Untergrundstreuung von Kristallen [4]. Wegen der Geometrie bei Weissenberg-Aufnahmen liegen die starken „aromatischen“ Maxima auf Linien.

## 2.2. Korrektur des Öffnungsfehlers im Elektronenmikroskop durch Ringblenden

Zum Studium der diffusen Röntgenstreuung sollte 1961 auch in unserem Laboratorium ein Lichtdiffraktometer gebaut werden. Da zum anderen bekannt war, daß eine der Fehlerquellen im Elektronenmikroskop die sphärische Aberration ist (die Brechkraft einer Magnetlinse steigt nach außen hin zu stark an, so daß die Randstrahlen eine kürzere Brennweite haben als die achsennahen Strahlen), bekam also der Diplomand Menzel die Aufgabe, durch Analogieverweise im selbstgebauten Lichtdiffraktometer zu prüfen, ob sich der sphärische Fehler einfach dadurch eliminieren ließe, daß man eine Reihe von Aufnahmen kombiniert, welche mit Ringblenden mit steigendem Radius entstanden sind. Bei der Anwendung im Elektronenmikroskop wäre die Lage der Fokussierungsebene durch Änderung der Objektivstromstärke synchron zu korrigieren. Besondere Bedeutung haben wir dem Prinzip der Öffnungsfehlerkorrektur freilich nicht beigemessen. Hinderlich ist die gewaltige Herabsetzung der Lichtstärke der Linse, da ja alle Streustrahlen außerhalb der durchgelassenen Ringe durch Abschirmung verlorengehen. Aber die ge-

stellte Aufgabe erfüllte ihren Zweck, und Menzel<sup>[6]</sup> baute nicht nur ein gutes Lichtdiffraktometer, sondern fand auch, daß tatsächlich scharfe Bildpunkte abgebildet werden, wobei jedoch zusätzlich ein starker Untergrund sichtbar wird. Der Gedanke einer Abbildung mit mehreren Ringblenden ist in der Elektronenmikroskopie später noch öfters diskutiert worden.

### 2.3. Ortsfrequenzfilter im Elektronenmikroskop

Das nur mit der linken Hand bearbeitete Problem ließ uns nicht los: Wenn man die zeitliche Aufeinanderfolge einer Reihe von Ringblenden durch eine räumliche Folge von Ringblenden ersetzen könnte, die gleichzeitig wirksam werden, so müßte die Lichtstärke natürlich gewaltig steigen. Um das Weitere zu verstehen, ist ein wenig Wellenoptik nötig. Wenn ein Gegenstandspunkt – also z. B. ein Atom – bestrahlt wird, so wirkt er als Zentrum für die Aussendung einer Kugelwelle. Die Wellenfront ist dann eine Kugelfläche mit dem Gegenstandspunkt als Ursprung. Die optische Funktion einer fehlerlosen Linse besteht darin, diese Kugelfläche so umzustülpen, daß nun eine neue – bildseitige – kugelförmige Wellenfläche entsteht, die den Bildpunkt zum Ursprung hat. Wie das die Linse im einzelnen macht (bei Licht durch Verzögerung der Wellen in Glas), ist für diese Diskussion unwesentlich. Das Kennzeichen einer Linse mit Fehlern ist, daß es ihr nicht völlig gelingt, eine Kugelfläche zu erzeugen. Im Extremfall, d. h. wenn überhaupt keine Linse verwendet wird, wirkt die Gegenstandswellenfläche zugleich als Bildwellenfläche, und diese ist sogar in die falsche Richtung (vom Bildpunkt weg) gekrümmt. Schon Fresnel hat gefunden, daß selbst in diesem Fall eine Abbildung möglich wird, wenn man zwischen Gegenstand und Bild ein System von aufeinanderfolgenden Ringblenden einsetzt. Diese Fresnel-Linse ist natürlich besonders dann von Interesse, wenn man mit

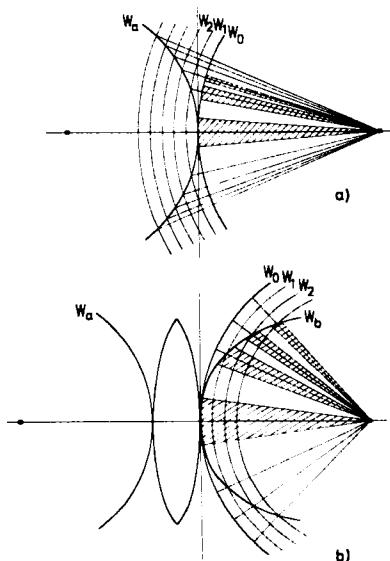


Fig. 2. Prinzip der Fresnel-Linse (a) und der Zonenkorrekturplatte (b). Die bildseitigen, im Abstand  $\lambda$  angeordneten sphärischen Wellenflächen  $W_0, W_1, W_2, \dots$  werden bei der Fresnel-Linse (a) von der gegenstandsseitigen Wellenfläche  $W_a$ , bei der Zonenkorrekturplatte (b) von der fehlerhaften bildseitigen Wellenfläche  $W_b$  geschnitten. In beiden Fällen erhält man mit einem ringförmigen Blendsystem (nicht gezeichnet), das die gleichphasigen Strahlen (Phasenverschiebung  $0 \rightarrow \pi$ ) durchläßt (schraffiert), die gegenphasigen Strahlen (Phasenverschiebung  $\pi \rightarrow 2\pi$ ) aber ausblendet, eine korrekte Abbildung.

Strahlung arbeitet, für die es gar keine Linsen gibt – also z. B. mit Röntgenstrahlen. Beim Gedankenspiel, ein Röntgen-Mikroskop mit Fresnel-Linsen aufzubauen, mußten wir uns damit abfinden, daß hierbei Ringabstände in der Größenordnung von Atomabständen erforderlich sind<sup>[\*]</sup>. Bei einer Magnetlinse im Elektronenmikroskop ist die bildseitige Wellenfläche zwar nicht besonders gut, aber doch zumindest richtig vorgekrümmt. Hier möchte es gelingen, eine nach dem Prinzip der Fresnel-Linse wirkende Ringplatte zwischen Linse und Bild zu schalten. Wegen der sehr viel geringeren Unstimmigkeit zwischen reeller und idealer Wellenfläche war in diesem Fall zu erwarten, daß eine solche Korrekturplatte weniger und sehr viel breitere Ringe aufweisen könnte als eine echte Fresnel-Linse<sup>[7,8]</sup>. Wie in Figur 2 erläutert, ist die Zonenkorrekturplatte ein „Ortsfrequenzfilter“.

Ortsfrequenzfilterung ist eine der entscheidenden Maßnahmen, die zur phasenbestimmenden Diffraktometrie geführt haben. Die Korrektur des Öffnungsfehlers mit der Zonenkorrekturplatte ermöglicht grundsätzlich, die Auflösungsgrenze des Mikroskops bis zur atomaren Größenordnung zu verbessern. Gleich anfangs wurden Platten (mit ca. 10 Ringen) berechnet<sup>[7,8]</sup>, die es ermöglichen sollten, bis zu einer Auflösung von ca. 0.15 nm vorzustoßen (siehe Abschnitt 2.7).

### 2.4. Das CTEM – ein Diffraktometer

Für die Funktion des konventionellen Transmissions-Elektronenmikroskops (CTEM) ist charakteristisch, daß das Objekt mit einem parallelen monochromatischen Primärstrahl beleuchtet wird (Fig. 3a). Diese Beleuchtungsweise, welche im Lichtmikroskop wegen des Auftretens von Fresnel-Säumen geradezu sträflich wäre (dort wird mit einem konvergenten polychromatischen Strahlenbündel beleuchtet), ist im Prinzip genau die gleiche, wie sie der Kristallograph in seinen Diffraktometern benutzt. In der Tat, wird in Figur 3a der untere Teil mit der Linse weggelassen, so haben wir das Schema eines Diffraktometers vor uns: Ein Objekt wird von einem parallelen Strahlenbündel getroffen und schickt in alle Raumrichtungen Streustrahlen aus. Bei einem vollständigen Diffraktometer kommt nur noch eine Einrichtung hinzu (Goniometer), mit der man das Objekt gegenüber dem Primärstrahl schwenken kann.

Die prinzipielle Ähnlichkeit des Aufbaus eines Elektronenmikroskops und eines Röntgendiffraktometers ist dem Elektronenmikroskopiker schon frühzeitig bewußt geworden. Wenn er als Objekt eines kleinen Kriställchen verwendet und die abbildenden Linsen des Mikroskops wegläßt, oder, was gleichbedeutend ist, die Strahlenverteilung in der Aperturblende des Objektivs abbildet, so kann er statt eines Bildes des Kristalles dessen Beugungsdiagramm im CTEM photographieren. Merkwürdig ist, daß das Elektronenmikroskop – nach optischen Kriterien beurteilt – eigentlich ein miserables Mikroskop ist, aber ein vorzüglich-

[\*] Die Idee ist aber später in bezug auf ein Gerät für fernes Ultraviolett und für weiche Röntgenstrahlung wieder aufgegriffen worden, nachdem neue Möglichkeiten der Miniaturisierung solche Ringblendsysteme zumindest für Wellenlängen in der Größenordnung 10 nm experimentell realisierbar erscheinen ließen (vgl. G. Schmahl, G. Rudolph, B. Niemann, *Phys. Bl.* 38 (1982) 283).

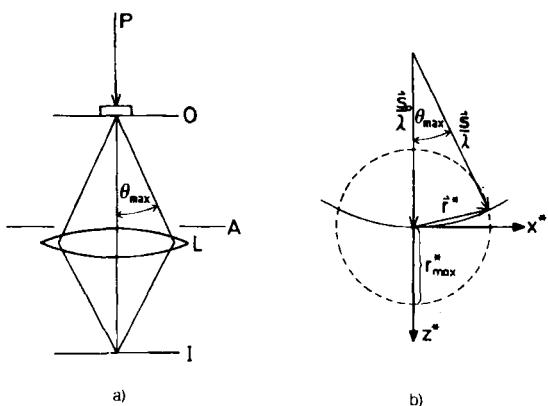


Fig. 3. Der „diffraktometrische“ Strahlengang des konventionellen Durchstrahlungselektronenmikroskops (CTEM). a) Der Primärstrahl P (parallel, monochromatisch) durchdringt das Objekt O, von dem innerhalb des Streukegels mit  $\theta_{\max}$  Streustrahlen ausgehen, welche durch die Linse L mit der Apertur A zum Bild I geleitet werden. b) Darstellung der Streuung im reziproken Raum über die Ewaldsche Ausbreitungskugel:  $\vec{s}/\lambda$  Vektor der Primärwelle,  $\vec{s}/\lambda$  Vektor der gestreuten Welle,  $\vec{r}^*$  Ortsvektor im reziproken Raum,  $r^*_{\max}$  Radius der Ewaldschen Auflösungskugel (gestrichelt),  $x^*$ ,  $y^*$ ,  $z^*$  Koordinaten des reziproken Raums. Für sehr kleine Wellenlängen  $\lambda$  (für 100 kV-Elektronen ist  $\lambda$  nur 0.0037 nm!) werden die Streuwinkel  $\theta$  sehr klein, und man kann die Ewaldsche Kugel durch ihre Tangentialebene ersetzen. Die Vektoren des reziproken Raumes  $\vec{r}^*$  liegen dann in dieser Ebene ( $x^*, y^*$ -Ebene). In der Elektronenmikroskopie werden sie auch als Ortsfrequenzen bezeichnet. Jedem Streustrahl entspricht also ein reziproker Vektor  $\vec{r}^*$  (Ortsfrequenz). Amplitude  $/F$  und Phasenverschiebung  $\phi$  eines Streustrahles (gegenüber dem Primärstrahl) werden in der Kristallstrukturanalyse (von uns auch für die Elektronenmikroskopie übernommen) als Strukturfaktor  $F_{\vec{r}^*} = /F_{\vec{r}^*} \exp i\phi$  bezeichnet. Durch den Abbildungsprozeß wird  $\phi$  zu  $\phi + \gamma$  ( $\gamma$  = Wellenaberration) verfälscht. Ein „Ortsfrequenzfilter“ im Strahlengang der Streustrahlen kann die Phasenfehler korrigieren. Das erste elektronenmikroskopische Ortsfrequenzfilter war die Zonenkorrekturplatte. Da bei einem Abbildungsvorgang Phasenfehler bis maximal  $\pi$  zugelassen werden können, filtert die Zonenkorrekturplatte die störenden Ortsfrequenzen mit Phasenfehlern zwischen  $\pi$  und  $2\pi$  aus (vgl. Fig. 2 und Fig. 5). Später sind auch Zonenkorrekturplatten entwickelt worden, die den Phasenfehler durch Verzögerung des Streustrahles in verschiedenen dicken Kohleschichten korrigieren.

ches Diffraktometer. Wie die Erfahrung lehrt, kann man auch mit diesem schlechten Mikroskop recht gut mikroskopieren, wenn man seine Eigenheiten beachtet.

*Boersch* hat 1947 darauf hingewiesen, daß Atome in Analogie zu Phasenobjekten in der Lichtoptik zu betrachten sind<sup>[9]</sup>. Phasenobjekte sind Strukturen, bei denen sich nur der Brechungsindex ändert, aber keine Absorption stattfindet. Sie sind daher im Lichtmikroskop unsichtbar, doch hatte *Zernike* gezeigt, daß man sie sichtbar machen kann, wenn man die gegenseitigen Phasen von Beleuchtungsstrahlen und von Streustrahlen zusätzlich um 90° verschiebt. Dieses sogenannte Phasenkontrastverfahren ist seit Jahrzehnten wichtiger Bestandteil der lichtmikroskopischen Untersuchungsverfahren. Es sei erwähnt, daß die Atome auch gegenüber Röntgenstrahlen Phasenobjekte sind, was allerdings bei der Kristallstrukturanalyse keine Konsequenzen hat, da man hierbei immer mit ausgeblendetem Primärstrahl (also gleichsam im Dunkelfeld) arbeitet. Bei der Hellfeld-Elektronenmikroskopie im CTEM gelangt man jedoch zur überraschenden Schlußfolgerung, daß der Wunsch nach einer idealen Linse eigentlich sinnlos ist: Man würde bei Abbildung eines atomaren Objektes keinen Kontrast erhalten. Der Trick von *Zernike* – das Einschieben eines Plättchens in die Aperturebene des Mikroskops, welches die Phase zwischen Primärstrahl und Streustrahl in erwünschter Weise modifiziert – stößt beim Elektronenmikroskop auf Schwierigkeiten. Überraschenderweise läßt sich aber Phasenkontrast (zumindest bis zu ei-

nem gewissen Grade und bis zu einer gewissen Auflösung) auch dadurch erzeugen, daß die ideale Linse durch eine Linse mit Öffnungsfehler ersetzt wird. Denn der Öffnungsfehler erzeugt eine zusätzliche Phasenverschiebung, und es ist zu überlegen, ob man diese Phasenverschiebung nicht für Phasenkontrastabbildung ausnützen kann.

In einer Arbeit, die sich mit der Abbildung von Atomen befaßte, hat *Scherzer* den Phasenobjektcharakter der Atome in die Theorie eingebaut<sup>[10]</sup>. Da die Streuung der Elektronen im Bereich der üblichen Spannungen (50–100 kV) „schwach“ ist, wurden die hypothetischen Atombilder in linearer Näherung<sup>[11]</sup> berechnet. Das mag paradox erscheinen, ist es doch gerade die im Vergleich mit Röntgenstrahlen um Größenordnungen stärkere Streuung der Elektronen, welche die Abbildung von aus wenigen Atomen bestehenden Objekten möglich macht. Aber es sind eben immer noch die angeregten Streustrahlen beträchtlich schwächer als der anregende Primärstrahl.

Die Tatsache, daß man in der Elektronenmikroskopie bei dünnen Präparaten mit der linearen Theorie auskommt, ist ähnlich wie in der Röntgen-Kristallstrukturanalyse von großer praktischer Bedeutung. Die lineare Theorie wird dort kinematische Theorie genannt. Lineare Näherungen werden auch in einigen – allerdings nicht in allen – holographischen Abbildungsverfahren benutzt.

Für den Kontrast  $g$  im Zentrum eines atomaren Bildes

$$g = (I_0 - I)/I_0 \quad (1)$$

ergeben sich die Beziehungen<sup>[10]</sup>

$$g = (2\pi e^2/hv_0) \int_0^{\theta_{\max}} (Z - f_R)(\sin \gamma) \theta^{-1} d\theta \quad (2)$$

$$\gamma = (\pi C_s \theta^4 / 2\lambda) - (\pi \Delta z \theta^2 / \lambda) \quad (3)$$

( $I_0$  = Hellfeldintensität,  $I$  = Intensität im Zentrum des Atoms;  $e$  = Elektronenladung,  $h$  = Planck-Konstante,  $v_0$  = Geschwindigkeit der Elektronen,  $Z$  = Kernladungszahl,  $f_R$  = Atomstreuefaktor für Röntgenstrahlen,  $\theta$  = Streuwinkel,  $\theta_{\max}$  = maximaler Streuwinkel, den die Linse zuläßt;  $C_s$  = sphärische Aberration,  $\lambda$  = Wellenlänge,  $\Delta z$  = Defokussierung).  $\gamma$  wird in der Optik als Wellenaberration (vgl. Figur 3b) bezeichnet (siehe auch<sup>[7,8]</sup>);  $\sin \gamma$  ist der Imaginärteil von  $\exp i\gamma$ , bei Amplitudenobjekten wäre  $\sin \gamma$  in Gleichung (2) durch  $\cos \gamma$  zu ersetzen. Die den Öffnungsfehler charakterisierende Funktion  $\exp i\gamma$  entspricht der Pupillenfunktion in der Lichtoptik. Ihre die Abbildungseigenschaften bei schwach streuenden Objekten beschreibende Komponente ( $\cos \gamma$  bei Amplitudenobjekten,  $\sin \gamma$  bei Phasenobjekten) wird auch als Übertragungsfunktion (Transferfunktion) bezeichnet. In Figur 4 ist  $\exp i\gamma$  für eine Spannung von 100 kV und eine rotationssymmetrische Magnetlinse mit der Konstante der sphärischen Aberration  $C_s = 1$  mm (Linsen mit Öffnungsfehlern dieser Größenordnung werden in modernen CTEM-Geräten verwendet) in Abhängigkeit vom Streuwinkel  $\theta$  für verschiedene Defokussierungen gezeigt. Wir betrachten zunächst den Fall a):

[\*] Wenn man eine große Hellfeldamplitude  $A$  und eine kleine (komplexe) Bildamplitude  $\rho$  addiert und die Intensität durch Quadrierung berechnet  $((A+\rho)(A+\rho^*)) = A^2 + A(\rho+\rho^*) + \rho\rho^*$ , so kann man das kleine Glied  $\rho\rho^*$  vernachlässigen. Die Bildintensität ist proportional zum Realteil der Amplitude.

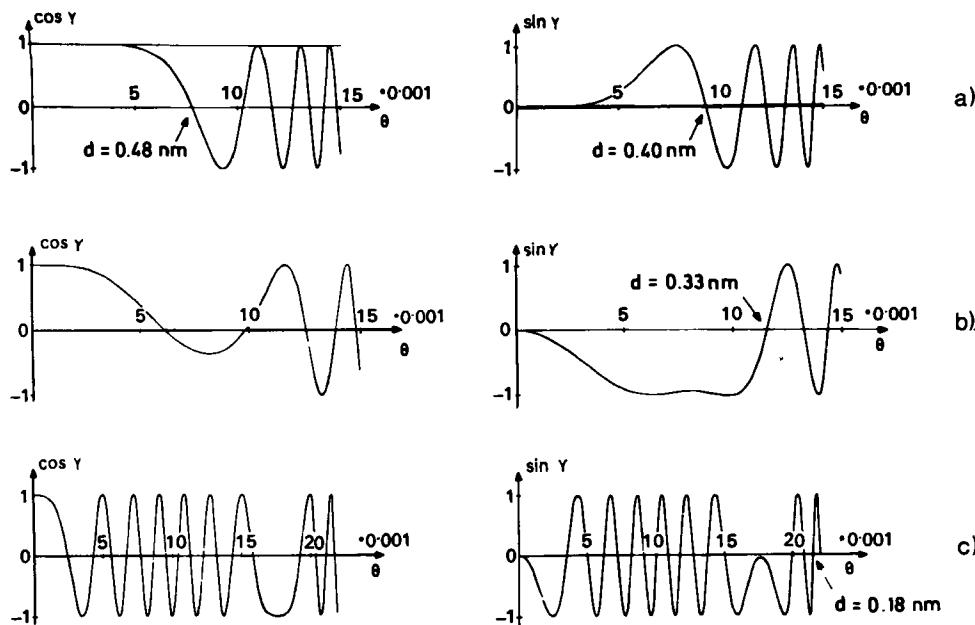


Fig. 4. Pupillenfunktionen  $\exp(iy)$  für verschiedene Defokussierungen (nach [30]): links Amplitudenteil  $\cos y$ , rechts Phasenteil  $\sin y$ . Defokussierungen: a)  $\Delta z = 0$  (Gaußscher Fokus), b)  $\Delta z = 67.5 \text{ nm}$  (Scherzerscher-Fokus), c)  $\Delta z = 310 \text{ nm}$  (Zonenkorrektur-Fokus).  $U = 100 \text{ kV}$ ;  $C_s = 1 \text{ mm}$ .

Hier ist die Bildebene in die Fokussierungsebene der achsennahen Strahlen (Gaußscher Fokus) gestellt. Man beachte, daß  $\sin y$  bis  $\theta = 5 \cdot 10^{-3} \text{ rad}$  nahezu gleich Null ist. Würde man eine Aperturlinse bei diesem Winkel anordnen, so resultierte für ein atomares Objekt kein Kontrast. Die Linse wirkt in diesem Bereich praktisch als ideale Linse ohne Zernikesche Phasenplatte, ist also für die Abbildung von Phasenobjekten unbrauchbar. Erst bei größerem Streuwinkel nimmt  $\sin y$  Werte ungleich Null an, so daß ein Kontrast im Zentrum des Atoms entstehen kann. Ab  $\theta \approx 9 \cdot 10^{-3} \text{ rad}$  ändert aber  $\sin y$  sein Vorzeichen – das Integral in Gleichung (2) wird daher bei zunehmendem  $\theta$  kleiner. Es ist also sinnvoll, die das Bild aufbauenden Streustrahlen bei diesem Winkel zu begrenzen.

In der Tat wird also Phasenkontrast durch den Öffnungsfehler erzeugt; denn ohne Öffnungsfehler würde  $\sin y$  nie von Null abweichen. Scherzer<sup>[10]</sup> versuchte, durch zusätzliche Defokussierung den Kontrast zu verbessern, was ihm bei einem bestimmten Betrag (Unterfokus) gelang (Figur 4b): 67.5 nm für den Öffnungsfehler 1 mm; für andere Öffnungsfehler ändert sich dieser Wert nach einer von Scherzer angegebenen Formel. Der Bereich bis zur Vorzeichenumkehr von  $\sin y$  wird dadurch vergrößert, und auch die Streustrahlen bei niedrigen Streuwinkeln tragen mehr zum Aufbau des Bildes bei als im Falle des Gaußschen Fokus.

Um das Phasenkontrastprinzip auf unsere Zonenkorrekturplatte zu übertragen, ist es notwendig (vgl. Bildpunktrechnungen<sup>[11-14]</sup>),  $\sin y$  für noch größere Defokussierungen zu berechnen, so daß die Transferfunktion stark oszilliert (Fig. 4c). Wird nun  $\sin y$  durch ein Ringblendensystem so „filtriert“, daß sich das Vorzeichen nicht ändert (mit Lücken an den ausgeblichenen Stellen), so addieren sich im Bildpunktintegral (2) alle Beiträge bei steigendem  $\theta$  mit gleichem Vorzeichen und erhöhen Kontrast und Auflösung. Figur 5 veranschaulicht, wie die Zonenkorrekturplatte unerwünschte Bereiche von  $\sin y$  anderen Vorzeichens ausblendet.

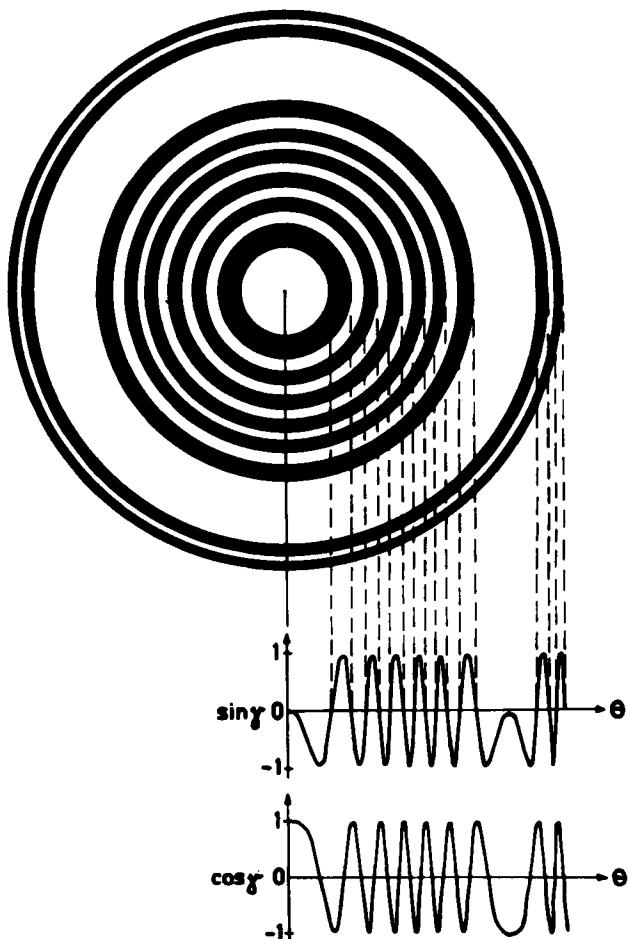


Fig. 5. Phasenteil der Pupillenfunktion (Phasenkontrastübertragungsfunktion) und Dimensionierung der Zonenkorrekturplatte. Die positiven Bereiche von  $\sin y$  werden ausgeblendet. Man beachte, daß zum Unterschied vom allgemeinen Fall (vgl. Fig. 2 und Fig. 3) sich der Phasenfehler  $y$  (Wellenabberation) der übertragenen Strukturfaktoren  $F_{\rho}$  nicht mehr kontinuierlich ändert, sondern von Band zu Band um  $\pi$  springt (Dreistrahleninterferenz der Ortsfrequenz  $+\vec{r}^*$ ,  $-\vec{r}^*$ , Primärstrahl); dafür wird aber den Strukturfaktoramplituden  $|F_{\rho}|$  eine Gewichtsfunktion ( $/|\sin y|$ ) aufgeprägt.  $U = 100 \text{ kV}$ ;  $C_s = 1 \text{ mm}$ ;  $\lambda/\theta_{\max} = 16.81 \text{ nm}$ .

Die Frage liegt nahe, ob die ausgeblendeten Bereiche einen störenden Einfluß auf die Abbildung haben. Nach Bildpunktrechnungen<sup>[11-14]</sup> wird zwar die Untergrundschwankung verstärkt, die Form der Bildpunkte bleibt jedoch unbeeinflußt. Figur 4c zeigt, daß sich bei der gewählten Defokussierung von 310 nm fast eine Auflösungsverdoppelung bei 8 Oszillationen von  $\sin\gamma$  (entsprechend 8 dunklen Ringen) gegenüber dem Scherzerschen Fokus erreichen läßt. Eine weitere Auflösungserhöhung stößt allerdings bald auf Schwierigkeiten, da die Anzahl der Oszillationen sehr stark zunimmt. Aber mehr als ein Faktor 2 ist gar nicht erforderlich, um atomare Strukturen zu analysieren. Andererseits läßt sich der Öffnungsfehler runder magnetischer Linsen nur wenig unter die Grenze von 1 mm (bei 100 kV) drücken (Scherzer-Theorem<sup>[15]</sup>).

## 2.5. Abbildung der Transferfunktion im Lichtdiffraktogramm

Als die Überlegungen zur Zonenkorrekturplatte so weit gediehen waren, gab es in unserem Laboratorium noch kein Elektronenmikroskop. In Diskussionen über die experimentelle Realisierung dieser Gedanken war von Experten zu erfahren, daß sekundäre Fehler bei der Elektronenmikroskopie (Instabilität von Strömen und Spannungen, mechanische Drift der Objektische) es schon sehr schwierig machten, den doppelten Wert des theoretischen Bildpunktmindestabstandes (Scherzer-Auflösung) zu erreichen. Bei einem Besuch des Forschungs- und Entwicklungslaboratoriums für Elektronenmikroskopie der Fa. Siemens in Berlin wurde ich über Arbeiten von Thon informiert, der die Abhängigkeit der Granulation von Kohlefolien von der Defokussierung des Objektivs studierte. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Kohlefolien hatte sich gezeigt, daß die granuliert erscheinende Abbildung stark von der Defokussierung abhängt. Lenz<sup>[16]</sup> hatte eine Theorie entwickelt, die die verschiedenen grobe Rasterung durch Änderung der Linseneigenschaften bei verschiedener Defokussierung erklärte, in welche Thon noch den Öffnungsfehler eingebaut hatte. Um nun diese Theorie zu prüfen, wurden in vielen Aufnahmen die häufigsten Abstände ermittelt und ihr statistischer Durchschnitt mit dem theoretischen Mittelwert verglichen<sup>[17]</sup>. Die Qualität der Aufnahmeserien war nach dem Stand der Technik hervorragend. Es konnten kleinste Punktabstände in der Größenordnung der Scherzer-Auflösung gemessen werden. Ich schlug vor, die mühsame Einzelmessung der Abstände durch eine Untersuchung der Autokorrelationsfunktion (die ja unmittelbar eine Abstandsstatistik liefert) oder durch eine Untersuchung der (in zweiter Potenz der Autokorrelationsfunktion äquivalenten) Bild-Fourier-Transformation zu ersetzen. Gerade die letztere Analysenart erschien experimentell besonders günstig. Ihre Durchführung ist einfach, wenn man die Platte mit der elektronenmikroskopischen Aufnahme direkt als Objekt in einem Lichtdiffraktometer verwendet. Das Lichtdiffraktometer bildet dann direkt das Quadrat der Fouriertransformierten ab. Thon nahm die Einladung an, Versuche dazu in unserem Laboratorium durchzuführen. Hier schloß sich ein Kreis. Für die Experimente wurde das Lichtdiffraktometer benutzt, das schon Menzel aufgebaut hatte (vgl. Abschnitt

2.2). Bereits die ersten Aufnahmen zeigten im Lichtdiffraktogramm ringförmige Strukturen. Danach setzte Thon seine Untersuchungen in Berlin mit einem Lichtdiffraktometer, das schon mit einem Laser statt einer Quecksilberhochdrucklampe arbeitete, systematisch fort<sup>[18]</sup>. Die Lichtdiffraktogramme zeigten (wie es auch die Theorie verlangte) ringförmige Strukturen, die nach dem Quadrat von  $\sin\gamma$  moduliert waren (vgl. Fig. 6a).

Diese Diagramme bewiesen mit einem Schlag, daß Atome Phasenobjekte sind und daß zur Beschreibung der Streuung die lineare Theorie ausreicht. Waren die Atome hingegen Amplitudenobjekte (würde also die Elektronenstrahlung in den Atomen absorbiert werden), so müßte das Lichtdiffraktogramm nach  $\cos\gamma$  moduliert sein (vgl. linke Seite von Figur 4). Wäre die lineare Theorie des Phasenkontrastes nicht ausreichend, so müßte die Ringstruktur verschwinden.

## 2.6. Ortsfrequenzfilterung im CTEM mit der Zonenkorrekturplatte

Wenig später wurde in Zusammenarbeit zwischen Berlin, Tübingen und München (wir hatten inzwischen auch mit experimenteller Elektronenmikroskopie begonnen) die Filterung mit Zonenkorrekturplatten im CTEM (vgl. Abschnitt 2.3) experimentell erprobt<sup>[19,20]</sup>. Möllenstedt et al. in Tübingen hatten eine besondere elektronenoptische Technik zur Ätzung feinster Blendensysteme entwickelt<sup>[21]</sup>, die die Herstellung von geeigneten Zonenkorrekturplatten ermöglichte. Die unmittelbare Abbildung von  $\sin^2\gamma$  in Lichtdiffraktogrammen von Kohlefolien läßt die Justierung des Filters unter Kontrolle der richtigen Lage der offenen und abzudeckenden Ringe im Lichtdiffraktogramm zu. Figur 6 zeigt die Lichtdiffraktogramme der gleichen Folie vor und nach Einsetzen der Zonenkorrekturplatte; jede geradzahlige Ringzone von Figur 6a ist in Figur 6b ausgeblendet. Es ist natürlich die lineare Übertragung des Realteils der Amplitude (vgl. Fußnote auf S. 468) nach Phasenverschiebung  $\pi/2$  (Phasenkontrast), welche die direkte Abbildung der Zonenkorrekturplatte ermöglicht. In Figur 6b sind sogar die seitlichen Haltestege des Filters abgebildet.

Figur 7 zeigt eine der ersten gelungenen Ortsfrequenzfilterungen in der Elektronenmikroskopie. Hier wie sonst auch in der Optik ist die Auflösung durch die Öffnung der Linse begrenzt, welche ihrerseits den maximalen Streuwinkel  $\theta_{\max}$  begrenzt. Von dieser Gesetzmäßigkeit wurde schon bei der Diskussion der Funktion  $\exp i\gamma$  (Pupillenfunktion; vgl. Figur 4) Gebrauch gemacht, als wir zeigten,

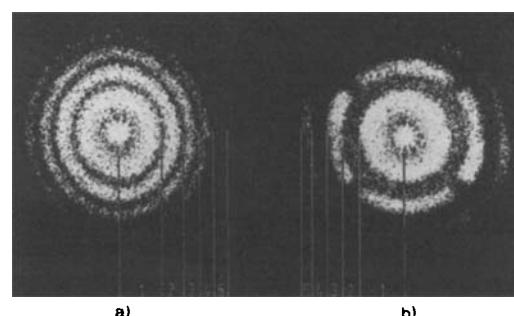


Fig. 6. Lichtdiffraktogramm einer Kohlefolie: a) vor Einsetzen, b) nach Einsetzen einer Zonenkorrekturplatte.

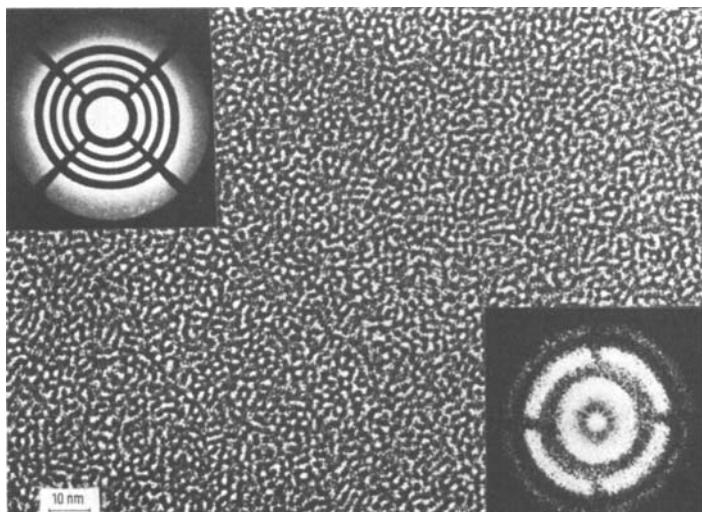


Fig. 7. Ortsfrequenzfilterung im Elektronenmikroskop (Elmiskop 101 mit Spezialobjektiv  $C_s = 1.35 \text{ mm}$ ). Links oben: Zonenkorrekturplatte (von Möllenstedt et al. hergestellt), photographiert im Elektronenbeugungsbild der Folie; rechts unten: Lichtdiffraktogramm der Folie. Das Lichtdiffraktogramm der Folie reicht nicht bis zur Grenze des Elektronenbeugungsdia gramm (wegen thermischer Kathode begrenzte Monochromasie).

wie der größte verwendbare Öffnungswinkel  $\theta_{\max}$  vom Gaußschen Fokus zum Scherzerschen Fokus und schließlich zum Ortsfrequenzfilterfokus zunimmt.

Die Ortsfrequenz ist nach Figur 3 bei Elektronenstrahlen ein zweidimensionaler Vektor in der  $x^*, y^*$ -Ebene, sein Absolutbetrag ist wegen der kleinen Winkel in der Elektronenmikroskopie gleich dem Streuwinkel des Elektronenstrahls  $\theta$ , dividiert durch die Wellenlänge  $\lambda$ . Wir geben als Grenzauflösung immer den reziproken Wert der maximalen Ortsfrequenz (kreisförmige Begrenzung)  $\lambda/\theta_{\max}$  an. Die so definierte Auflösung (Dimension Länge) bezeichnen wir auch als kristallographische Auflösung, da die analoge Größe in der Kristallographie als Auflösungsdefinition (z. B. bei Kristallstrukturanalysen von Proteinen) verwendet wird. Man kann  $d_{\text{cryst}}$  in Analogie zur lichtoptischen Auflösung als kleinsten Abstand in einem Bild ansehen, bei dem zwei Bildpunkte noch getrennt erscheinen. Allerdings ist diese Abschätzung etwas pessimistisch, die genaue Rechnung ergibt einen zusätzlichen Faktor 0.85 bei Verwendung der lichtoptischen Auflösungsdefinition für kohärente Beleuchtung. Manchmal wird bei elektronenmikroskopischen Arbeiten sogar der Faktor 0.6 vor  $\lambda/\theta_{\max}$  gesetzt (nominelle Auflösung). Aber das ist irreführend, da dieser Faktor der sogenannten inkohärenten Beleuchtung entspricht, die im CTEM nicht vorliegt. Beim Studium elektronenmikroskopischer Literatur ist daher Vorsicht geboten, um nicht wegen verschiedener Auflösungsdefinitionen zu falschen Schlussfolgerungen zu gelangen. Die kristallographische Auflösung hat den Vorteil, daß sie unmittelbar Vergleiche zwischen Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie zuläßt. In Figur 4 sind rechts die (kristallographischen) Grenzauflösungen bei den drei verschiedenen Bedingungen mit 0.4, 0.33 und 0.18 nm angegeben. Bei  $d_{\text{cryst}} = 0.18 \text{ nm}$  lassen sich, wie die Protein Kristallographie gezeigt hat, atomare Strukturen vorzüglich deuten – vorausgesetzt natürlich, die Proteinstruktur ist dreidimensional bestimmt. Routinemäßig werden dort atomare Modelle bis zur Auflösung von 0.28 nm erstellt, wobei jedoch die atomaren Maxima in den Elektronendichthesyn-

thesen nicht mehr aufgelöst sind. Aufgrund der bekannten und beschränkten Atomanordnungen lassen sich aber einfache Überlegungen zur „Mustererkennung“ anwenden. Daraus geht hervor, daß man mit Ortsfrequenzfilterung tatsächlich die „Schallmauer“ zum atomaren Bereich durchstoßen kann.

In Figur 7 reicht das Lichtdiffraktogramm (rechts unten) der CTEM-Aufnahme nur bis zu einer Auflösung von 0.3 nm (statt 0.2 nm). Das war enttäuschend, denn wir hatten gehofft, daß zumindest bis zum Rand des starken Bereiches im Elektronenstreudiagramm Kontrast übertragen würde. Da das Lichtdiffraktogramm das Quadrat der Fouriertransformierten wiedergibt (vgl. Abschnitt 2.5), wird ein Bild bestenfalls eine Auflösung zeigen, die der reziproken Grenze des Lichtdiffraktogramms entspricht. Die Auflösungsgrenze wird nicht durch die Aperturblende des Objektivs bestimmt, sondern durch die Ausdehnung des Streudiagramms im Ortsfrequenzraum; über diese Grenze hinaus kann selbst die beste Linse keine Auflösungsverbesserung bewirken. Dieser Effekt wurde von Hirt<sup>[22]</sup> näher untersucht. Maxwell-Verteilung der Elektronengeschwindigkeiten an der Glühkathode verhindert, daß die Strahlung selbst bei bestmöglichster Stabilisierung ganz monochromatisch ist. Bei größerem Streuwinkel wird dadurch die Streuintensität geschwächt und schließlich unmeßbar klein. Durch Verwendung einer kalten Kathode (Feldemission) kann der Geschwindigkeitsbereich der Elektronen so verengt werden, daß bis zur Grenze der Zonenkorrekturplatten Streuintensität auftritt. Auch eine Erhöhung der Beschleunigungsspannung führt zu besserer Monochromasie der Strahlung; z. B. gelang es, im Lichtdiffraktogramm von CTEM-Aufnahmen bei 200 kV eine kristallographische Auflösung von 0.18 nm nachzuweisen (Scherzer-Auflösung 0.28 nm)<sup>[23]</sup>. Für diese Aufnahmen (Fig. 8) wurde ein Kryomikroskop ( $T = 4.2 \text{ K}$ ) benutzt, das einen weiteren Vorteil bietet: Verringerung der thermischen Schwingung der Atome und somit eine allgemeine Erhöhung der Streuintensitäten.

## 2.7. Ersatz der Lichtdiffraktometrie durch Rechnungen im Computer

Für die Beurteilung der Qualität einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (vgl. Fig. 9) leistet das einfach erhaltliche Lichtdiffraktogramm nach wie vor wertvolle Dienste.

Für die quantitative Analyse ist die Lichtdiffraktometrie jedoch zu ungenau und muß durch Rechnungen ersetzt werden. Dazu ist es notwendig, ein elektronenmikroskopisches Abbild in eine für den Computer verwertbare Form zu bringen. Das Bild wird deshalb gerastert, wobei die Seitenlänge der Rasterelemente (Pixel) nach der Theorie höchstens gleich der halben linearen Auflösung sein darf. In jedem dieser Pixel wird die Schwärzung der Mikroaufnahme bestimmt. Da Elektronenstrahlen wie die Röntgenstrahlen und im Gegensatz zu Licht die Photoplatte proportional zur Intensität schwärzen (lineare Beziehung bis etwa zur Schwärzung  $S = 1$ ), ist es möglich, das Intensitätsprofil der Aufnahme mit einem Densitometer zu bestimmen. Die große Datenmenge erfordert ein automatisches Abtasten im Densitometer. Die mit einem Routinepro-

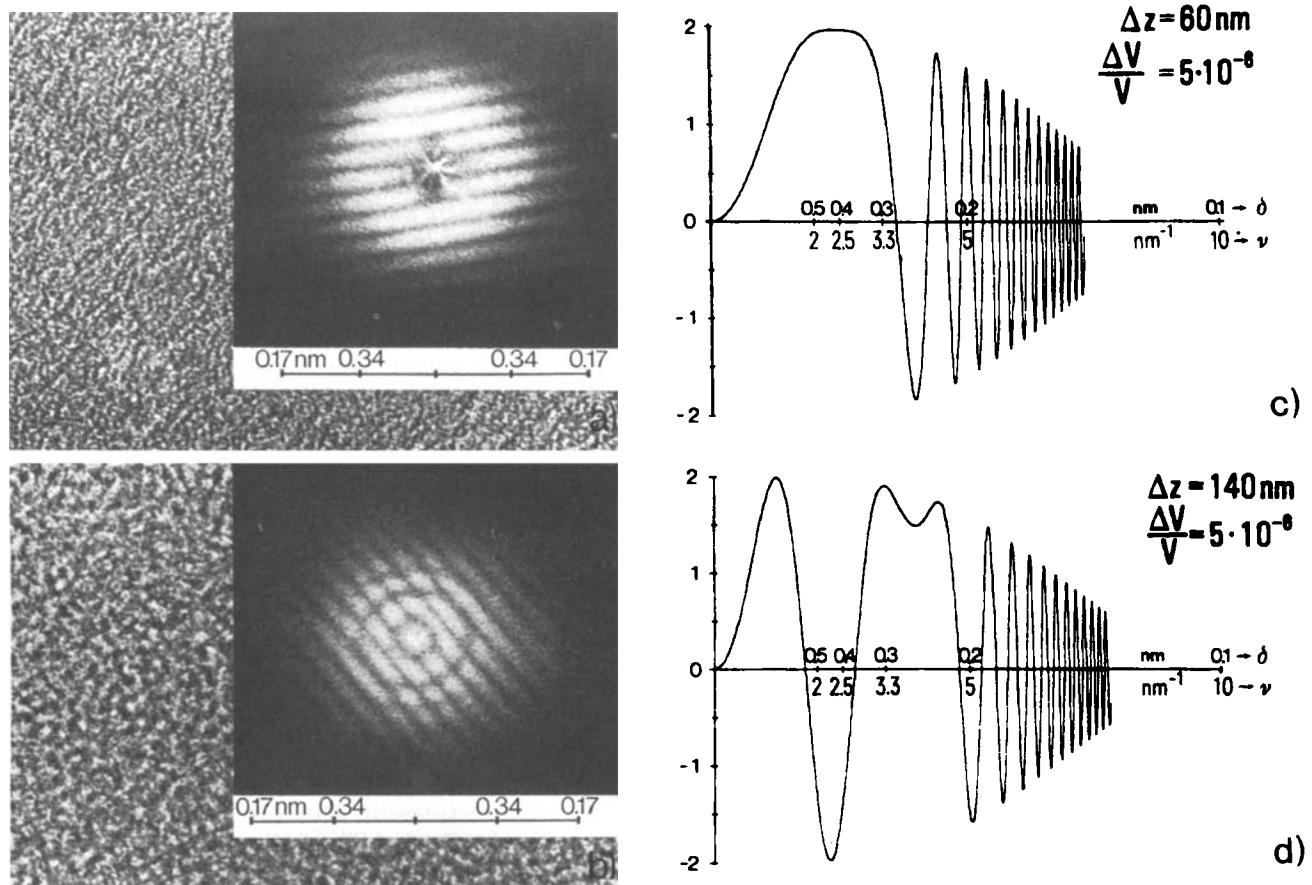


Fig. 8. Überschreiten der konventionellen Auflösungsgrenze bei zentraler Beleuchtung [23] (bei schiefer Beleuchtung vgl. Fig. 11). Aufnahmen im Kryomikroskop bei 200 kV Beschleunigungsspannung und  $C_s = 1.35$  mm: a) in der Nähe des Scherzer-Fokus ( $\Delta z = 40$  nm), b) defokussiert zur Bildrekonstruktion. Man beachte in a) und b) die parallelen dunklen Streifen, die durch Überlagerung zweier gleicher, leicht verschobener Aufnahmen entstehen (Auflösungstest mit Youngschen Streifen, vgl. [24b]). – c) und d) Phasenkontrastübertragungsfunktionen zu a) und b). Die Transferfunktion c) zeigt enge Oszillationen außerhalb des mittleren Bereiches (Scherzer-Bereich), die zur Rekonstruktion kaum aufgelöst werden können. Die Zonen in d) sind dagegen wesentlich breiter (vgl. auch Fig. 4), was – bei genügender Größe des Bereiches (vgl. [30]) – Rekonstruktionen ermöglicht. Der Auflösungstest mit Youngschen Streifen zeigt signifikante Bereiche auch in Ortsfrequenzbereichen mit nichtauflösbaren Zonen an, daher sind sie in a) auch außerhalb des starken mittleren Bereiches (Scherzer-Bereich) erkennbar. Die Auflösung im Diffraktogramm (Verringerung der Granulation) läßt sich nach [30] durch Vergrößerung des diffraktometrierten Bereiches steigern, so daß die Abgrenzung der Zonen (und damit auch die Rekonstruierbarkeit) verbessert wird. Eine Auflösungssteigerung des Bildes durch Rekonstruktion dürfte allerdings in Fall a) auch dann nur in begrenztem Umfang möglich sein, während die breiten Zonen in Fall b) eine Rekonstruktion bis zur Grenze der Youngschen Streifen (entspricht 0.18 nm Auflösung) ermöglichen.

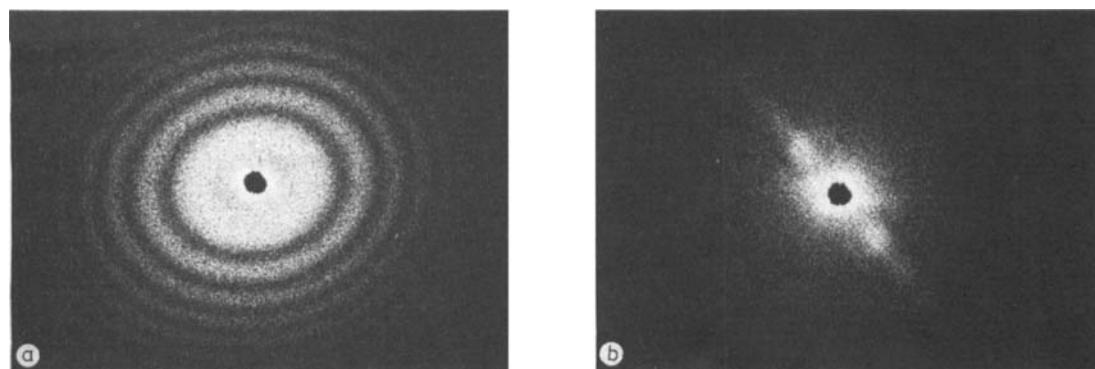


Fig. 9. Lichtdiffraktogramme zur Diagnose von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. a) Das Lichtdiffraktogramm hat elliptische Zonen: Axialer Astigmatismus (magnetisches Feld unruhig, Stigmatoreinstellung ungenau); stört nicht bei geeigneter Rekonstruktion. – b) Seitliche Drift des Präparates. Lichtdiffraktogramm nur nach einer Seite ausgebildet, Aufnahme unbrauchbar. Rekonstruierbare Auflösung aus Grenze des Diffraktogramms ersichtlich. Für Bestimmung der Absolutgrenze signifikanter Details (auch in nicht rekonstruierbaren Bereichen) Youngscher Auflösungstest erforderlich (vgl. Fig. 8).

gramm für Fourier-Transformation durchführbare Fourier-Analyse des Zahlenfeldes führt zu einem zweidimensionalen Dichtediagramm, das dem Lichtdiffraktogramm äquivalent ist, aber nicht nur das Quadrat der Fouriertransformierten, sondern auch die Fouriertransformierte selbst (mit Amplitude und Phase) wiedergibt.

## 2.8. A posteriori Ortsfrequenzfilterung außerhalb des Mikroskops

Betrachten wir nochmals Figur 6. Wie bereits erläutert, sind im rechten Teil (b) die geradzahligen (phasenfalschen) Ortsfrequenzringe durch die Zonenkorrekturplatte

ausgeblendet (herausgefiltert), sie fehlen also beim Bildaufbau. Nun könnte man aber auch die Fouriertransformierte einer gewöhnlichen Hellfeldaufnahme durch Rechnung erzeugen und beim Bildaufbau (durch Rechnung) die phasenfalschen Gebiete einfach weglassen. Das so hergestellte Bild und die mit der Zonenkorrekturblende erhaltene Abbildung müssen (im Rahmen der linearen Näherung) gleich sein. Vorteilhafter ist es, die phasenfalschen Streugebiete zum Bildaufbau zuzulassen, aber ihre Phase um den Betrag  $\pi$  zu verschieben (korrigieren). Man kann zusätzlich sogar die Schwächung der Fourieramplituden in der Nähe der Nullstellen rechnerisch kompensieren (Amplitudenfilterung), doch ist dabei Vorsicht geboten, da zugleich das Rauschen in diesen Gebieten verstärkt wird. Unsere ersten derartigen Rechnungen wurden 1970 bei Symposien über neue elektronenmikroskopische Methoden in Hirschegg<sup>[24]</sup> und in London<sup>[25]</sup> diskutiert.

Bald nach Veröffentlichung der Arbeiten über Zonenkorrekturplatten<sup>[7,8]</sup> hatten Hanßen et al.<sup>[26]</sup> darauf hingewiesen, daß die Ortsfrequenzfilterung – im lichtoptischen Instrument und a posteriori – schon seit längerem für allerdings völlig verschiedene physikalische Aufgaben entwickelt worden war. Sie wendeten die lichtoptische „lineare Übertragungstheorie“ auf die Verhältnisse im Elektronenmikroskop an, wobei im wesentlichen die von Scherzer<sup>[10]</sup> und uns<sup>[7,8]</sup> abgeleiteten Beziehungen nur „umgedeutet“ zu werden brauchten<sup>[26]</sup>. Von Schiske<sup>[27]</sup> und – unabhängig – von Hanßen<sup>[28]</sup> stammt auch der Vorschlag, die Filterung a posteriori von der Lichtoptik auf die Elektronenmikroskopie zu übertragen. Die experimentelle Realisierung erfolgte in den zuvor erwähnten Arbeiten<sup>[24,25]</sup> und „Analogierechnungen“ in einem Doppellichtdiffraktometer<sup>[29]</sup>. Ein weiterer Vorschlag<sup>[27,28]</sup> regte an, das korrigierte Bild nicht aus einer einzigen Aufnahme, sondern aus einer Serie von Aufnahmen der gleichen Stelle des Objekts bei verschiedenem Fokus aufzubauen. Dadurch sollte der Einfluß der Lücken im Ortsfrequenzspektrum auf die Qualität des korrigierten Bildes beseitigt werden (vgl. Abschnitt 3.4.2).

## 2.9. Eine konsistente Theorie

Von grundsätzlicher Bedeutung<sup>[30–32]</sup> für die Verwendung des Elektronenmikroskops als phasenbestimmendes Diffraktometer ist, daß das Mikroskop nicht mehr abbilden soll, sondern nur als Meßinstrument zur Sammlung der charakteristischen Daten (Strukturfaktoren) von am untersuchten Objekt gestreuten Strahlen gebraucht wird. Mit diesen Streudaten kann man – wie bei der Röntgenstrukturanalyse – tun was man will.

Wenn zutrifft, daß die Atome als reine Phasenobjekte aufzufassen sind, so gilt für Elektronen- wie für Röntgenstrahlen der Friedelsche Satz: Die linke und die rechte Seite eines Beugungsbildes zeigen gleiche Intensitäten, die zugeordneten (gleich großen) Phasen haben entgegengesetzte Vorzeichen. Lineare Näherung bedeutet physikalisch bei einer Hellfeldabbildung, daß die Interferenzen zwischen den einzelnen Streustrahlen<sup>[\*]</sup> vernachlässigt werden. Wir messen also – entsprechend der klassischen Definition der Phasenverschiebung in der Röntgen-

Kristallstrukturanalyse – nur die Phasendifferenz zwischen Primärstrahl und Streustrahl. Glücklicherweise ist nicht für jeden Streustrahl ein eigenes Experiment erforderlich (das wäre unter dem Aspekt optimaler Ausnutzung der Primärelektronen katastrophal); aus der Überlagerung aller Streustrahlen mit dem Primärstrahl lassen sich die Phasen durch Fourier-Analyse bestimmen. Allerdings mit einer Einschränkung: Zentrosymmetrisch verbundene Ortsfrequenzvektoren führen zu gleichartigen Interferenzbildern, die miteinander verschmelzen. Sie lassen sich nicht mehr trennen („Dreistrahlinterferenz“). Das spielt dann keine Rolle, wenn der Friedelsche Satz anwendbar ist, da die eine Ortsfrequenz auf die andere zurückführbar wird. Das phasenbestimmende Diffraktometer-Elektronenmikroskop eignet sich daher grundsätzlich nur für Beugungsbilder, für die der Friedelsche Satz gilt.

### 2.9.1. Anomale Streuung

Es ist schon aus der Röntgen-Kristallographie bekannt, daß beide Seiten des Beugungsbildes verschiedene Intensitäten und Phasen aufweisen können. Dieser „Nicht-Friedel“-Fall liegt dann vor, wenn einige Atome in der Struktur „anomal“ streuen. Es handelt sich um Schweratome, die im Bereich der verwendeten Strahlung eine Absorptionskante haben. Die Streuung an diesen Atomen verläuft mit einer gewissen (kleinen) Phasenverschiebung  $\eta$  gegenüber der an nicht anomaliestreuenden Atomen, und dieser Effekt bewirkt die Ungleichwertigkeit der beiden Hälften des Beugungsbildes. Nun gibt es solche anomale Streuung auch mit Elektronenstrahlen, zwar gleichfalls schwach, aber doch deutlich stärker als mit Röntgenstrahlen. Auch sie ist praktisch nur bei Schweratomen bemerkbar. Erstmal bei der Elektronenbeugung von Gasen studiert, wird sie ähnlich wie bei der Röntgenbeugung durch komplexe Atomformfaktoren beschrieben.

Ein Sonderfall anomal streuernder Atome, in dem der Friedelsche Satz gilt, ist dann gegeben, wenn nur Atome einer Art vorliegen. Dann ist das Elektronenmikroskop wieder ein vollwertiges Interferometer, das exakt das Beugungsspektrum des Objektes (natürlich im Rahmen der linearen Näherung) registriert. Die Phasenverschiebung der anomalen Streuung  $\eta$  kann einfach dadurch berücksichtigt werden, daß  $\gamma$  in Gleichung (3) durch  $\gamma - \eta$  ersetzt wird (Spezialfall reines Amplitudenobjekt mit  $\eta = \pi/2$ )<sup>[30]</sup>.

Was ist zu tun, wenn Strukturen mit verschiedenartigen Atomen vorliegen? Das ist z. B. bei Strukturanalysen „schweratomgefärberter“ organischer Präparate der Fall. Wie erwähnt, setzen sich die Ortsfrequenzvektoren beider Hälften des Beugungsbildes zu einer Summe zusammen, aus der sich die einzelnen Komponenten nicht mehr ableiten lassen. Benutzt man jedoch mindestens zwei Aufnahmen bei verschiedener Defokussierung, so werden die Gewichte der Komponenten durch den Einfluß der Transferfunktion verschieden sein, wodurch eine Trennung möglich wird<sup>[27,30]</sup>. Dies wird noch einfacher<sup>[31]</sup>, wenn man nur einem der beiden zentrosymmetrisch verbundenen Strahlen den Zugang zur Bildebene gestattet. Wird eine Halbebene in der Aperturblende verdeckt, so wird nur die Hälfte des Beugungsbildes registriert; zur Registrierung der anderen Hälfte ist eine zweite Aufnahme nötig, bei der die komplementäre Halbebene verdeckt ist. Zwar sind wie-

[\*] Sie müssen erst bei einer Näherung zweiter Ordnung berücksichtigt werden.

derum zwei Aufnahmen erforderlich, um die komplett experimentelle Information zu übertragen, doch zeigt die Rechnung, daß nun – anders als bei der zentralen Hellfeld-aufnahme – keine Schwächung der Streuwellenamplituden stattfindet. Allerdings sind nun alle Phasen des Fourier-Spektrums der Ortsfrequenzen verfälscht, doch kann man bei Kenntnis der Transferfunktion die Phasenfehler berechnen und korrigieren. Die Transferfunktion kann man entweder aus einer dritten Aufnahme (mit voller Beleuchtung) bestimmen oder aus den beiden Halbebenenaufnahmen rechnerisch ableiten. Letzteres ist zwar nur für ein zentrosymmetrisches Beugungsbild (z. B. reines Phasenobjekt) exakt möglich, sollte aber auch im anderen Fall gelingen, da  $\gamma$  nach Gleichung (3) nur von wenigen Parametern abhängt (vgl. Figur 10 und auch Figur 11 für Verfahren mit schiefer Beleuchtung). Mit Ausnahme von Versuchen zur Diskriminierung von Schweratomen<sup>[36]</sup> ist diese Möglichkeit bei Strukturanalysen noch nicht ausgeschöpft worden, sie gehört also zum Methodenreservoir der Zukunft. Neben Bestimmungen der komplexen Funktion ist die ungewichtete Registrierung der Amplituden der Streustrahlen von besonderem Interesse.

Eine andere Möglichkeit zur Analyse von Strukturen mit verschiedenartigen Atomen bieten Näherungsverfahren,

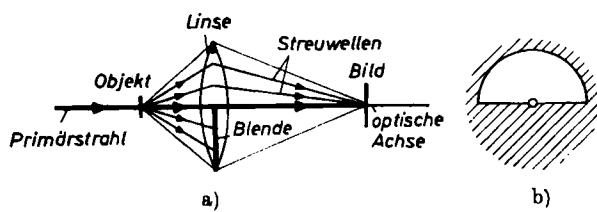


Fig. 10. Komplexe Bildrekonstruktion nach dem komplementären Halbebenenverfahren [31]. a) Schematischer Aufbau der Abbildungsanordnung. b) Halbleide (Ringlein kennzeichnet den Durchstoßpunkt des Primärstrahls). Zur zweiten Aufnahme muß die Blende entfernt und eine komplementäre Blende eingeschoben werden.

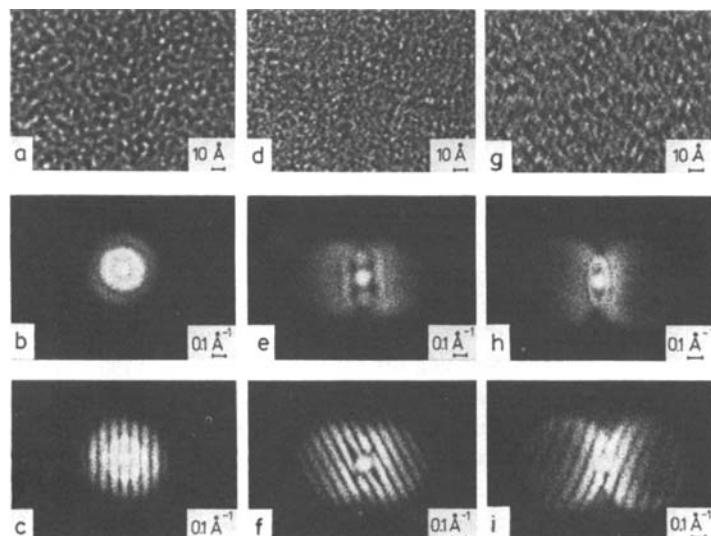


Fig. 11. Komplexe Bildrekonstruktion mit schiefem Beleuchtung [33–35]. Bei schiefem Beleuchtung läßt sich die Auflösung auch mit thermischen Kathoden (bei 100 kV) bis zur atomaren Grenze bringen. Allerdings muß man dann das Gesamtbild aus mehreren Teilbildern zusammensetzen (synthetische Apertur). Die Lichtdiffraktogramme zeigen die (anisotrope) Zunahme des übertragenen Ortsfrequenzbereichs bei Vergrößerung des Winkels von 0° (a, b, c) bis 0.66° (g, h, i). Im letzten Fall läßt sich eine Auflösungsgrenze von 0.16 nm messen. Das Verfahren ist kompliziert und lichtschwach, demonstriert aber vorzüglich die Möglichkeiten, welche ein Elektronenmikroskop bei Benutzung als phasenbestimmendes Diffraktometer bietet.

bei denen auf die Trennung von Phasenteil und Amplitudenteil der Streuung verzichtet wird. Ein solches Vorgehen ist bei der Röntgen-Kristallstrukturanalyse üblich, wobei aber der Einfluß der anomalen Streuung sehr viel geringer ist. Wir benutzen es bei unseren Analysen „schweratomgefärbter“ organischer Präparate. Hierbei kommt es darauf an, nicht – wie sonst in Elektronen-, Röntgen- und Lichtoptik üblich – Phasen- und Amplitudenobjekte zu trennen, sondern „verschieden gemischte“ Objekte mit dem Grenzfall des reinen Phasenobjekts (reine Amplitudenobjekte entfallen in der Elektronenmikroskopie). Auf diese Weise berücksichtigen wir nicht nur die so wichtige Kopplung von Phasen- und Amplitudenteil bei anomal streuenden Atomen, sondern können auch den Einfluß auf die Transferfunktionen leicht überblicken. Figur 12 zeigt z.B. die Transferfunktionen bei verschiedener Defokussierung für  $\eta = 0.25$  (nach Atomformfaktortabellen<sup>[37]</sup> ungefähr Platin entsprechend) und  $\eta = 0$  (Leichtatome). Es ist zu erkennen, daß die Unterschiede – außer in unmittelbarer Nähe des Primärstrahls – nicht sehr groß sind. Die experimentellen Nullstellen werden irgendwo zwischen den Nulldurchgängen der beiden Transferfunktionen liegen. Man erkennt, daß die Schwächung der Amplituden der Streuwellen in der Nähe der Nullstellen hier von großem Vorteil ist; denn die sowieso nur in einem sehr engen Bereich unsicheren Phasen sind mit einer starken Schwächung der Amplituden verbunden, so daß sie die Form des Bildes wenig beeinflussen. Trotz Verzichtes auf komplexe Rekonstruktion werden sowohl Schweratome als auch Leichtatome gut wiedergegeben, die Fehler dieses Näherungsverfahrens

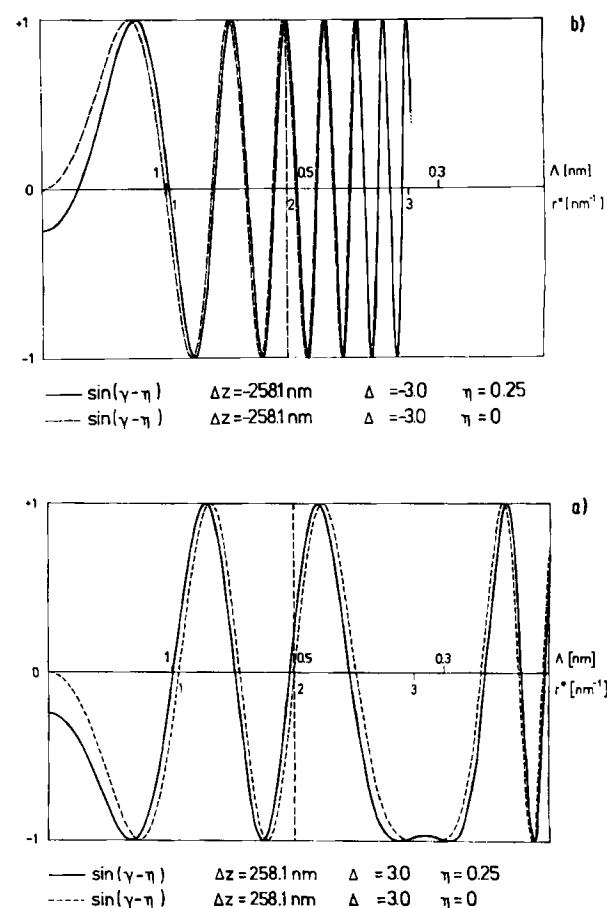


Fig. 12. Funktion  $\sin(\gamma - \eta)$  für  $\eta = 0$  und  $\eta = 0.25$  (aus [38]): a) Unterfokus, b) Überfokus.

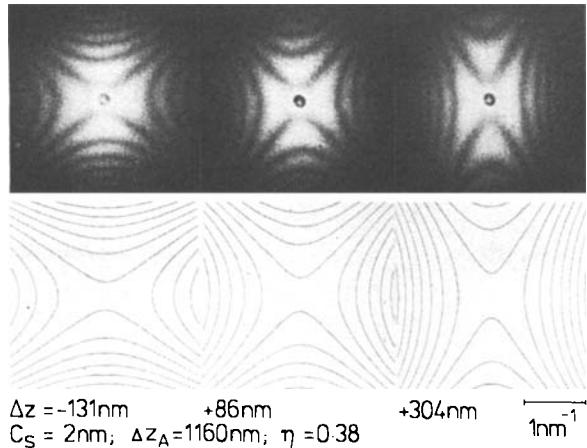


Fig. 13. Lichtoptische Diffraktogramme von elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer mit Platin bedampften Kohlefolie. Wegen der relativ großen astigmatischen Differenz  $\Delta z_A$  (1160 nm) sind die – den Übertragungslücken entsprechenden – Null-Linien im Diffraktogramm im Innenbereich hyperbelförmig (gezeigt für drei Defokussierungswerte  $\Delta z$  im Vergleich mit den berechneten Kurven). Dies gilt aufgrund der anomalen Streuung der Pt-Atome auch für die innerste Null-Linie, die bei einem reinen schwachen Phasenobjekt durch das Zentrum verlaufen würde (vgl. [38]). Die Aufnahmen zeigen, daß das Elektronenmikroskop auch als Fourier-Interferometer zum Studium physikalischer Größen benutzbar ist (für die weitere Verfeinerung unserer Methoden ist eine genauere Kenntnis der anomalen Streuung wichtig).

spielen kaum eine Rolle. Kürzlich haben Typke et al.<sup>[38]</sup> in unserem Laboratorium die Größe der anomalen Streuung bei einigen Schweratomen experimentell bestimmt (vgl. Figur 13).

Beim „Doppelsymposium“ in Hirschegg und London berichteten 1970 Erickson und Klug über den Einfluß des Amplitudenteils der Elektronenstreuung auf die Defokussierungsabhängigkeit der Reflexe von mit Uranylacetat gefärbten Katalasekristallen<sup>[39]</sup> und bestätigten somit experimentell<sup>[40]</sup> unser im Jahre davor formuliertes Konzept<sup>[30–32]</sup>. Besonders bemerkenswert war der Nachweis, daß die lineare Theorie selbst für stark streuende Objektpräparate gültig bleibt – wir hatten vorher nur mit reinen Leichtatomstrukturen experimentiert.

### 2.9.2. Berücksichtigung der Krümmung der Ewaldschen Ausbreitungskugel

Zur Behandlung strukturanalytischer Probleme bei der Röntgenbeugung hatte sich die diskrete Formulierung mit Ortsvektoren und Atomformfaktoren als besonders nützlich erwiesen. Seit 1969 konsequent in unsere Arbeiten übernommen<sup>[30]</sup>, führte sie zur Trennung in „Teilamplitudestreuung (Winkel  $\eta$ )“ und Phasenstreuung – eine Trennung, welche in der Lichtoptik wenig Sinn hätte.

Bei Erweiterung der Theorie der Elektronenbeugung für dicke Präparate (innerhalb der Gültigkeit von Einfachstreuung)<sup>[30]</sup> trat die Komplikation auf, daß die Transferfunktionen der Atome von ihrer Lage entlang der opti-

[\*] Die theoretische Grundlage dieses Beitrags [39] war ungenau: In der Grundgleichung (5), in der offenbar der Einfluß der Leichtatome vernachlässigt wurde, haben die Autoren Phasenteil und Amplitudenteil der Schweratomstreuung als voneinander unabhängig addiert, wodurch die korrekte Transferfunktion  $\sin(\gamma - \eta)$  als Näherung erhalten wird. Bei kleinem Amplitudenteil hat dies kaum Einfluß auf die numerischen Resultate, erst bei  $\eta \approx \pi/4$  (für Uran ab etwa  $\theta/\lambda = 7.5 \text{ nm}^{-1}$ ) treten inkorrekten Faktoren der Größenordnung  $\sqrt{2}$  und Phasenfehler auf.

schen Achse des Instruments abhängig wurden. Diese Komplikation konnte durch Ersetzen des zweidimensionalen Ortsfrequenzraumes durch den dreidimensionalen reziproken Raum (Fourier-Raum) beseitigt werden<sup>[30]</sup>. Hierbei kommt die Ewaldsche Ausbreitungskugel (vgl. Figur 3b) wieder ins Spiel, und somit wird die Elektronenmikroskopie endgültig eine Variante der Strukturforschung mit Beugungsmethoden.

Bei der Behandlung der Streuung auf der Ausbreitungskugel wird die komplexe Bildrekonstruktion auch bei reinen Phasenobjekten unausweichlich – man wird auf ihren „Methodenvorrat“ (vgl. Figur 10 und 11) zurückgreifen müssen. Noch ist die „phasenbestimmende Diffraktometrie mit dem Elektronenmikroskop als Werkzeug“ eine junge Methode, und schon zeichnet sich der Vorstoß zu dreidimensionalen Analysen mit atomarer Auflösung in Analogie zur Röntgen-Strukturanalyse ab. Dies gilt auch für den aperiodischen Fall, auch er kann als „Kristallstrukturanalyse“ im weitesten Sinne aufgefaßt werden, wenn man ein Stückchen aperiodischer Materie als „Kristall mit einer Elementarzelle“ betrachtet. Das Elektronenmikroskop verliert dabei seine Eigenschaft als abbildendes Gerät (es wird aber als solches weiter zur Auslese und Vorsortierung der submikroskopischen Individuen benutzt), der Computer ersetzt die Linse für im allgemeinen dreidimensionale Abbildungen.

### 2.10. Automatisierung der phasenbestimmenden Diffraktometrie

Die Entwicklung des Elektronenmikroskops zum Automaten ist also vorgezeichnet. Ein Automat arbeitet nicht nur schnell und zuverlässig, sondern er ermöglicht es auch jedem Chemiker, Biologen, Mineralogen etc., komplizierte physikalische Verfahren ohne Spezialkenntnisse mit einer „black box“ durchzuführen<sup>[40]</sup>. Es ist bemerkenswert, daß die Voraussetzungen für die Automatisierung in der phasenbestimmenden Diffraktometrie noch besser sind als in der Röntgen-Strukturanalyse, denn hier können wir die Phasen messen, während sie dort indirekt ermittelt werden müssen. Allerdings sind die Anforderungen an den Computer höher, aber die ungeheuren Fortschritte der Computertechnik lassen keinen Kleinknut zu, auch wenn wir die – bei der Röntgenbeugungsanalyse jetzt übliche – Bedingung des instrumenteneigenen Computers stellen. Interessant ist die Verlagerung der Entwicklungsprobleme. Während man im Falle der Röntgen-Strukturanalyse noch mit der Übersetzung der (relativ einfachen) Meßmethode in die Automatentechnik Schwierigkeiten hatte, ist dies heute marginal. Hingegen erfordert die automatengerechte Formung der so diffizilen Einstell- und Meßoperationen in der Elektronenmikroskopie besondere Aufmerksamkeit<sup>[41]</sup>.

Ein „Elektronenmikroskopiker von echtem Schrot und Korn“ mag die „Herabwürdigung“ des Elektronenmikroskops zum Meßinstrument zunächst bedauern. Aber ist es nicht so, daß der Computer dem Elektronenmikroskop neue, ungeahnte Möglichkeiten verschafft? Die phasenbestimmende Diffraktometrie ist – im Rahmen der kinematischen Näherung – ein genauso quantitatives Verfahren wie

[\*] Nur am Rande können wir auf on-line-Diffraktometer [41, 42] und on-line-Korrelationscomputer [40] als wichtige Einstellhilfen verweisen.

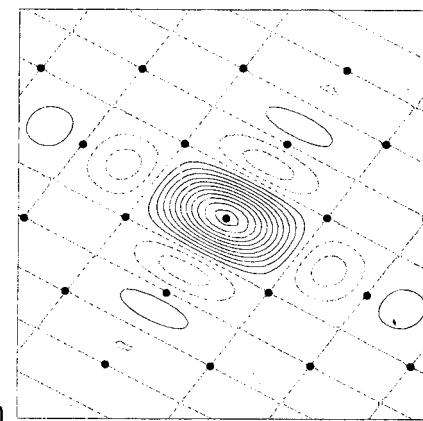
die Röntgen-Kristallstrukturanalyse. Beide beruhen auf Messungen – man beachte, daß sogar die Schwärzungskurven für Röntgen- und Elektronenstrahlen analog sind, und daß in beiden Fällen auch quantenzählende Direktdetektoren verwendet werden können<sup>[43]</sup>. Die phasenbestimmende Diffraktometrie ist nicht auf periodische Strukturen beschränkt und kann in allen Gebieten der Chemie – von der Anorganischen Chemie bis zur Biochemie – angewendet werden. Und sie bietet den Ausblick zur atomaren Analyse – nicht als vage Vermutung, sondern als präzises, theoretisch fundiertes und experimentell schon weitgehend realisierbares Verfahren.

## 2.11. Der Streuabsorptionskontrast

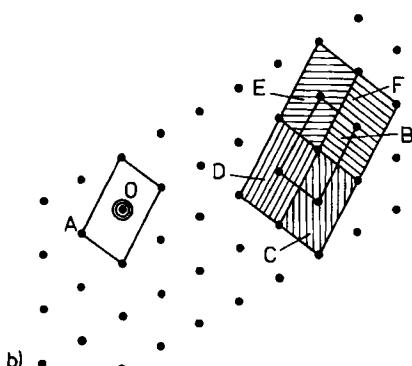
Hinterher erscheint erstaunlich, daß man auf die doch so grundsätzliche Verwandtschaft von Elektronenmikroskopie und lichtoptischer Phasenkontrastmikroskopie erst in den sechziger Jahren aufmerksam wurde, obschon Boersch 1947 darauf hingewiesen hatte, daß Atome streuen und nicht absorbieren<sup>[9]</sup>. Sicherlich war ein Grund dafür, daß die Phasenkontrastmethode schon beim Lichtmikroskop nicht trivial ist – es ist so viel einfacher, ein Objekt so wie es ist (eventuell auch nach Färbung) anzuschauen. In der Tat zeigen selbst dünne, aber mit Schweratomen gefärbte Strukturen im Gaußschen Fokus des Elektronenmikroskops bei geringer Auflösung etwas Kontrast. Schweratome sind aufgrund der anomalen Streuung nicht farblos, sondern leicht grau. Aber auch starke Phasenobjekte (dicke Objekte) können sich wie Amplitudenobjekte verhalten (Nichtanwendbarkeit der linearen Näherung, quadratischer Phasenkontrast), ähnlich wie Luftbläschen in Wasser im Lichtmikroskop ohne weiteres sichtbar sind. Noch komplizierter wird es, wenn Mehrfachstreuung auftritt. In der frühen Elektronenmikroskopie war die Quelle der Kontraste nicht wichtig, man betrachtete die Bilder „als ob“ sie von absorbierendem Material herrührten. Auch heute muß man noch phänomenologisch vorgehen, wenn man den Anwendungsbereich der linearen Theorie verläßt, doch neuerdings wird versucht, die quadratischen Terme bei der Berechnung der Hellfeldintensität zu berücksichtigen.

## 2.12. Was ist „Ptychographie“?

Mit diesem Namen bezeichnen wir (fast vergessene) linsenlose Bestimmungsverfahren für Amplituden und Phasen von Elektronenstreuwellen, welche nach heutigem Wissen besonders gut bei Kristallen anwendbar sind<sup>[44]</sup>. Sie beruhen auf der gegenseitigen Interferenz von Streustrahlen – im Gegensatz zur Holographie, bei der alle Streustrahlen mit einer Referenzwelle überlagert werden. Eine Variante dieser Verfahren konnte unlängst realisiert werden<sup>[45]</sup>. Eine andere Variante sollte sich im Durchstrahlungs-Rasterelektronenmikroskop relativ leicht realisieren lassen und ermöglichen, Diffraktogramme mit fast beliebiger Auflösung auszuwerten (Figur 14)<sup>[46]</sup>. Diese Verfahren könnten sich bei anorganischen Kristallen, aber vielleicht auch bei strahlenempfindlichen organischen Kristallen, zu einer Konkurrenz der in den Abschnitten 2.3–2.10 beschriebenen Methoden entwickeln.



a)



b)

Fig. 14. „Phänomenologische“ Beschreibung einer Variante der Ptychographie [46]. In einem Transmissions-Rasterelektronenmikroskop wird der (koheranten) Abtastsonde eine Struktur nach a) aufgeprägt. Dadurch verbreitern sich die Gitterreflexe entsprechend b) zu scharf begrenzten Flecken, welche sich (mit Interferenz) gegenseitig überlagern. Beim Abtasten oszillieren die Intensitäten in den Überlagerungsgebieten entsprechend der Phasendifferenzen der Reflexe. Zur Registrierung ist der übliche Einkanalendetektor durch einen ortsempfindlichen Flächenzähler (z. B. nach [43]) zu ersetzen.

## 2.13. Hochgeordnete biologische Strukturen

In Lehrbüchern der Kristallographie werden die Gesetze der Beugung üblicherweise mit Periodizität und Symmetrie „amalgamiert“. Aber ebenso, wie man die Beugungsgesetze von Periodizität und Symmetrie abstrahieren kann<sup>[61]</sup>, lassen sich bei periodischen und/oder symmetrischen Mustern die Symmetriegesetze von der Beugungstheorie abstrahieren. Die Röntgen-Kristallographie hat zum Studium von in den reziproken Raum (Fourier-Raum) transformierten Objekten geführt. Periodizität und Symmetrie erzeugen bestimmte Fourier-Strukturen, wobei es gleichgültig ist, ob das Objekt eine Elektronendichtevertteilung oder eine sonstige – auch makroskopische – Dichtevertteilung ist. Das gilt natürlich auch für Bilder, die durch Abbildung entsprechender Objekte im Elektronenmikroskop erhalten werden. Wiederum ist gleichgültig, ob es sich um qualitativ richtige Bilder oder – wie bei der in diesem Beitrag geschilderten Übertragung der kinematischen Theorie auf die Elektronenmikroskopie – um Parallelprojektionen von Potentialverteilungen handelt.

Seit den frühen sechziger Jahren wurden qualitative elektronenmikroskopische Abbildungen kontrastierter, periodischer und symmetrischer Biostrukturen nach Fourier-Prinzipien untersucht, wobei sich das Lichtdiffraktometer (vgl. Abschnitt 2.1) als besonders bequeme „Rechenmaschine“ zur Fourier-Transformation anbot<sup>[47]</sup>. Durch Ein-

griffe in die Fourier-Verteilung der Objekte – als Filterung bezeichnet – werden bestimmte Strukturmerkmale besonders hervorgehoben. Diese Filterung, die das untersuchte Objekt betrifft, hat mit der von uns eingeführten Ortsfrequenzfilterung, welche die optischen Eigenschaften des Objektivs betrifft, nichts zu tun. Eine besondere Art der „Objektfilterung“ ist bei zweidimensionalen Gittern möglich. Deren Fouriertransformierte zeigt starke, gitterartig angeordnete Maxima (der Periodizität entsprechend) und einen Untergrund (von individuellen Verschiedenheiten der Elementarzellenbilder herrührend). Durch Abfiltrieren des Untergrundes kann nach einer weiteren Fourier-Transformation (z. B. im Lichtdiffraktometer) eine aus allen Individuen gemittelte, streng periodische Struktur erzeugt werden. Die Mittelungen wurden zuerst an Hochdosisaufnahmen durchgeführt (gute Elektronenstatistik, aber Präparations- und Strahlenartefakte). Elektronenmikroskopische Analysen periodischer ungefärbter und nativer Biostrukturen wurden ab 1968 veröffentlicht (vgl. Abschnitt 3.3).

### 3. Dreidimensionale Analyse

#### 3.1. Zum Problem

Die Betrachtung von Elektronenmikroskop und Röntgendiffraktometer als analoge Geräte impliziert bereits die Anwendungsmöglichkeiten. Dazu gehört vor allem die dreidimensionale Analyse der untersuchten Strukturen. In den fünfziger Jahren war man bei der Röntgen-Kristallstrukturanalyse von Projektionen (entlang Elementarzellenkanten) zur dreidimensionalen Erfassung der Elektronendichte in der Elementarzelle übergegangen, da deutlich wurde, daß nur die echte<sup>[\*]</sup> dreidimensionale Analyse (für welche die kinematische Theorie von Anfang an das theoretische Rüstzeug geliefert hatte) zur Aufklärung des Baues komplizierter Strukturen führen konnte. Glücklicherweise wurden gleichzeitig die unumgänglich nötigen Werkzeuge für die nun differenziertere Informationsverarbeitung entwickelt, nämlich Meßautomaten und elektronische Rechenmaschinen. Auch bei der Elektronenmikroskopie sind die Objektpräparate relativ zur lateralen Auflösung viel zu dick, so daß Überlappungen der strukturellen Details eine konsequente Analyse verhindern. Die dreidimensionale Elektronenmikroskopie wurde jedoch nicht einfach auf analogem Wege erreicht, zum Teil geht sie auf allgemeine Verfahren der Bildverarbeitung zurück<sup>[48-50]</sup>. Das nimmt wegen des ursprünglich bilderzeugenden Charakters des Elektronenmikroskops kaum wunder. Die „Umfunktionierung“ des Hellfeldelektronenmikroskops in ein phasenbestimmendes Diffraktometer für Elektronenbeugung bedeutet eine Fortentwicklung von der gewiß reizvollen, aber nur qualitativen „Guckmikroskopie“ (ein Ausdruck, den Ernst Ruska prägte) zur quantitativen Strukturforschung.

[\*] Das heißt Ersatz der zweidimensionalen Bildfunktion  $\rho(x, y)$  (z. B. auf einer elektronenmikroskopischen Aufnahme) durch die dreidimensionale Bildfunktion  $\rho(x, y, z)$  (in der Elektronenmikroskopie erstreckt sich  $z$  entlang der optischen Achse). Zu unterscheiden von der Stereoskopie, bei der ein zweidimensionales Bild durch zwei zweidimensionale, gegeneinander leicht verkippte Bilder ersetzt wird, deren Betrachtung einen räumlichen Eindruck vermittelt, aber den inneren Aufbau nicht erkennen läßt.

### 3.2. Tomographische Verfahren

#### 3.2.1. Die polytrope Montage

Im Beitrag von Harr<sup>[49]</sup> kommt das Wort „dreidimensional“ gar nicht vor. Er bezeichnet mit polytroper Montage eine Methode, bei der unter verschiedenen Winkeln aufgenommene elektronenmikroskopische Abbildungen so übereinander kopiert werden, daß einzelne Schichten des Objektpräparats besonders hervortreten. Durch Änderung der Übereinanderlageparameter können verschiedene Schichten hervorgehoben werden. Ein ähnliches Prinzip war viel früher in der Röntgendiagnostik als Tomographie bezeichnet worden. Wenn man Röntgenschattenaufnahmen eines Körpers aus verschiedenen Winkeln herstellt, so enthalten sie Projektionen aller übereinanderliegender Schichten, die aber mit unterschiedlichen Verschiebungen überlagert sind. Superponiert man solche Aufnahmen so, daß eine Schicht in allen Aufnahmen genau übereinanderliegt, dann wird diese Schicht hervorgehoben, während die anderen Schichten gegenseitig verschoben sind und sich bis zu einem gewissen Grade ausmitteln (Figur 15).

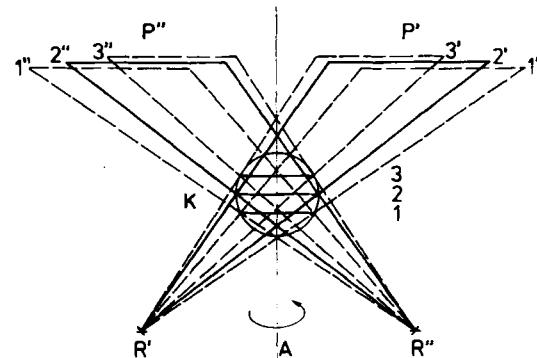


Fig. 15. Prinzip der zirkulären Tomographie. Die Schichten des Körpers K (z. B. 1, 2, 3) werden mit Verschiebungen im Röntgenschattendiagramm abgebildet. Die Verschiebungen hängen von der Lage der Röntgenröhre ab (z. B. Stellung R' oder R''). Schiebt man die Aufnahmen P' und P'' so übereinander, daß die Schichtbilder 2' und 2'' zur Deckung kommen, so wird im Überlagerungsbild nur 2 verstärkt. Bei der zirkulären Tomographie rotiert R um die Achse A. Im elektronenmikroskopischen Fall ist die Zentralprojektion durch Parallelprojektion (R unendlich weit entfernt) ersetzt (Abbildung des Objekts bei großer Tiefenschärfe). Die Änderung der Projektionsrichtung wird durch Kippen des Präparates erzeugt. Die Aufnahmeebene (P', P'') ist daher senkrecht zur Projektionsrichtung. Dadurch wird eine gewisse, aber leicht beherrschbare Verzerrung der Projektionsbilder (Quadrat(e) werden als Rechtecke abgebildet) erzeugt.

#### 3.2.2. Elektronenmikroskopische Computertomographie

In den sechziger Jahren wurde gefunden, daß bei der Tomographie Störungen durch ungenügende Ausmittelung der unerwünschten Schichten mathematisch weitgehend korrigierbar sind, insbesondere wenn man sich auf Parallelprojektionen (statt Zentralprojektionen) beschränkt (was allerdings neue Röntgenaufnahmegeräte erforderte). Besonders übersichtlich wird die „Rekonstruktion“ eines dreidimensionalen Bildes eines Körpers, wenn man die verschiedenen Projektionsrichtungen durch Rotation des Körpers um eine Achse einstellt, wobei es bei einem asymmetrischen Körper im Prinzip gleichgültig ist, welche Achse man wählt (computerisierte Tomographie, vgl. Figur 16).

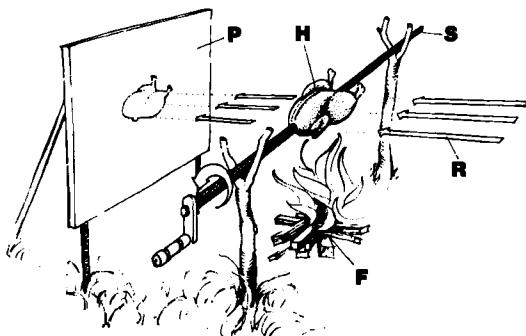


Fig. 16. „Tomographischer Hähnchengrill“. Das Hähnchen H auf dem Drehspieß S wird durch das Feuer F gegrillt. Bei der Drehung werden in gleichen Winkelkrementen  $\Delta\alpha$  Aufnahmen mit paralleler Röntgenstrahlung R auf Platten P hergestellt. Im elektronenmikroskopischen Fall sind die Röntgenstrahlen durch Elektronenstrahlen zu ersetzen; die Parallelprojektion wird durch Abbildung bei hoher Tiefenschärfe erzeugt. Das „Grillen“ des Präparates besorgen (leider) die Elektronen selber.

Diese computerisierte Tomographie eignet sich sehr gut zur Übersetzung in die Elektronenmikroskopie<sup>[48]</sup>. Die Parallelprojektion wird durch Abbildung bei großer Tiefenschärfe gewährleistet, wobei übereinanderliegende Schichten des Objektpräparates in der elektronenmikroskopischen Aufnahme übereinanderprojiziert erscheinen. Für die Rotation des Präparates können Mikrogoniometer (z. B. nach Art der in der Elektronenmikroskopie üblichen Kipp-Patronen) benutzt werden, und schließlich gelingt die computerisierte Analyse nach analogen rechnerischen Methoden, wenn das Bild z. B. durch Densitometrie in ein digitales Zahlenfeld verwandelt wird. Das „Grillen“ (bei der Röntgentomographie nicht der Normalfall!) wird (leider) durch die Elektronenstrahlen selbst bewirkt: sie zerstören in einer zur Abbildung erforderlichen Dosis die organische Substanz (z. B. biologischer Makromoleküle), was spezielle Präparationsmethoden notwendig macht. So werden strahlenresistente anorganische Strukturen dem Präparat aufgeprägt (Positiv- und Negativkontrastierung), die Charakteristika der eigentlich interessierenden organischen Struktur erkennen lassen. Sie können auch bei hohen Strahlendosen abgebildet werden, wobei im allgemeinen Strukturdetails nur bis zur sogenannten biologischen Auflösung ( $\geq 1.5 \text{ nm}$ ) relevant sind. Vorsicht bleibt aber immer geboten, da auch bei Stabilisierung der Struktur nach der sehr raschen Zerstörung der organischen Substanz langsame Änderungen nicht auszuschließen<sup>[51]</sup> und überhaupt die Gesetze der „Markierung“ keineswegs trivial sind – das Prinzip der Ausfüllung von Löchern durch ein amorphes Schweratomglas bei der Negativkontrastierung ist z. B. sicherlich nur näherungsweise gültig<sup>[\*]</sup>.

[\*] Zur Präzisierung des Begriffs „computerisierte Tomographie“ (Abgrenzung zur „Diffraktometrie“): Tomographie kann sowohl im Orts- als auch im reziproken Raum durchgeführt werden, wobei die mathematischen Verfahren der Bildverarbeitung mit den Verfahren der Kristallographie formal verwandt sind. Vor allem benötigen alle dreidimensionalen Verfahren einen Satz von Bildern mit verschiedenen Richtungen der beleuchtenden Strahlen (vgl. Fig. 15 und 16 sowie [50]). Es gibt jedoch charakteristische Unterschiede: (a) Die Tomographie basiert auf Zentral- oder Parallelprojektionen, (b) in der Tomographie ist die Physik des Abbildungsprozesses un wesentlich. – Tomographie kann in so verschiedenen Bereichen wie Röntgendiagnostik oder Radioastronomie angewendet werden [entsprechend (b)]. Im Gegensatz dazu ist in der Diffraktometrie der physikalische Abbildungsprozeß (Streuprozeß) wesentlich, auch ist die Bedingung der „Projektionen“ [vgl. (a); ebener Schnitt im reziproken Raum bei Parallelprojektionen] für Röntgenaufnahmen nur in Sonderfällen (Kleinwinkelstreuung) näherungsweise gültig. Der reziproke Raum

### 3.2.3. Dreidimensionale Analyse via Symmetrie

Die experimentellen Arbeiten zur dreidimensionalen Elektronenmikroskopie nach DeRosier und Klug<sup>[48]</sup> entsprachen allerdings nicht genau dem Modell von Figur 16. In bezug auf die Analyse hochgeordneter biologischer Strukturen (insbesondere helicaler Strukturen) wäre im Modellfall das Hähnchen zunächst durch eine makroskopische Helix – z. B. eine Spiralfeder – zu ersetzen, deren Achse mit der Drehspießachse identisch ist. Einfache geometrische Überlegungen zeigen, daß als Abbildung (Parallelprojektion) eine Sinuslinie erscheinen muß. Wird der Spieß gedreht, so behält die Kurve ihre Form, scheint sich aber längs der Achse zu bewegen, wobei einer vollen Drehung eine Verschiebung der Sinuslinie um eine Periode entspricht. Dies bedeutet, daß in solchem Falle alle tomographischen Bilder aus einem einzigen Bild abzuleiten sind, und so natürlich für die dreidimensionale Analyse eine Röntgen- oder Elektronenbeugungsaufnahme genügen würde. Wird aber dieses Modell nun zu einer Helix verfeinert, auf der gleiche Untereinheiten wie Perlen aufgefädelt sind, so treten identische Projektionen nur bei Drehung um kleine diskrete Winkelkremente  $\Delta\alpha$  auf (z. B. beträgt für Tabakmosaikvirus  $\Delta\alpha = 3.7^\circ$ ). Man erhält also einen bestimmten Satz von tomographischen Bildern (z. B. bei Tabakmosaikvirus 49 Bilder), der in den meisten Fällen für eine dreidimensionale Analyse mit biologisch signifikanter Auflösung ausreicht. Bei zu großen Winkelkrementen kann man Zwischenlagen entweder Abbildungen mit zufällig verschiedenen Lagen der Objekte entnehmen oder das Präparat im Winkelkrementbereich kippen. Auf diese Weise wurde die dreidimensionale Struktur des Schwanzes des Phagen T4 bestimmt<sup>[48]</sup>.

Die Methode der Erzeugung von Projektionen durch Symmetriebeziehungen (statt durch Messung) läßt sich auch bei anderen hochsymmetrischen Strukturen (z. B. bei sphärischen Viren) anwenden. Besonders bei helicalen Strukturen mit kleinen Winkelkrementen besticht die experimentelle Einfachheit der Analyse – es sind keine Prä-

wird von einer Kugelfläche geschnitten. Das gilt auch für die Diffraktometrie mit dem Elektronenmikroskop. Natürlich ist es dabei für die Praxis angenehm, daß man die Kugelfläche wegen der kurzen Wellenlänge der Elektronen bei nicht zu hoher Auflösung durch eine Ebene approximieren kann. Bei einer diffraktometrischen Theorie muß ein definierter Zusammenhang zwischen Streuung und Struktur bestehen. Er kann durchaus nur in Näherung gültig sein (Vernachlässigung der Vielfachstreuung in der kinematischen Theorie, lineare Theorie bei der Phasenmessung). Nach diesen Kriterien ist das Verfahren von DeRosier und Klug [48] „tomographisch“, nicht nur weil es Parallelprojektionen unbedingt erfordert, sondern vor allem, weil hierbei eine phänomenologische Abbildungstheorie (Streuabsorptionskontrast) ohne Berücksichtigung von Linsenfehlern benutzt wurde. Bei unseren Bildpunktrechnungen mit Ortsfrequenzfilterung waren bereits seit 1965 kinematische Streutheorie und lineare Näherung verwendet worden [11–14]. In Cambridge wurde diese Theorie (mit Ortsfrequenzfilterung) ab 1970 übernommen [39]. Besonders in der Elektronenmikroskopie ist aber die Berücksichtigung der Linseneigenschaften wichtig, da je nach Defokussierung verschiedenartige „Abbildungen“ erhalten werden. Im Gaußschen Fokus ist z. B. die lineare Näherung nicht anwendbar. Die ersten dreidimensionalen Bildrekonstruktionen in der Elektronenmikroskopie (Fettsäure-Synthetase [81]) sind in Einklang mit der diffraktometrischen Theorie. Völlig unbrauchbar ist eine phänomenologische Abbildungstheorie bei hohen Auflösungen (Beschleunigungsspannungen der Größenordnung 100 kV), da in solchem Fall sowohl die Krümmung der Ausbreitungskugel als auch der Vorzeichenwechsel im Ortsfrequenzspektrum berücksichtigt werden muß. Freilich gibt es Bedingungen, bei denen man nur qualitativ vorgehen kann: dicke Objekte, Mehrfachstreuung (vgl. Abschnitt 2.11). Qualitative Analysen sind kürzlich beschrieben worden [93].

paratkippungen erforderlich, die Aufnahmen können mit jedem konventionellen Mikroskop erhalten werden<sup>[52]</sup>.

Im strengen Sinne des Wortes handelt es sich hierbei aber noch nicht um dreidimensionale Analyse, denn die Gleichsetzung von experimentell bestimmter Projektion und via Symmetrie abgeleiteter Projektionen ist nur in relativ grober Näherung korrekt. Das Präparat liegt auf einer Folie und ist von Kontrastmittel bedeckt; diese Komponenten haben sicherlich keine helicale, nicht einmal zylindrische Struktur. Bei der Präparation könnte auch die Helix gequetscht worden sein, was nicht in jedem Fall an einer Verbreiterung des Bildes zu erkennen ist. Solche Artefakte sind bei einer einzigen Aufnahme kaum auszuschließen<sup>[\*]</sup>. Trotz dieser Einschränkungen haben jedoch derartige Untersuchungen viele wertvolle Informationen über Bau und Funktion von Makromolekülen – z. B. über den Mechanismus der Kontraktion der Phagenschwänze – erbracht.

Zum Begriff „Makromolekül“ sei unter dem Aspekt des Informationsinhaltes (ausgedrückt z. B. durch die Zahl aller Atomkoordinaten) angemerkt, daß es erheblich ins Gewicht fällt, ob ein hochsymmetrisches Molekül (z. B. Tabakmosaikvirus (TMV)) oder ein unsymmetrisches Molekül (z. B. Ribosom) untersucht wird. Der Informationsgehalt kann im ersten Fall um Größenordnungen kleiner sein. Oft wiederholt sich eine kleine Untereinheit (die eigentlich unsymmetrische Struktur – wie die Basensequenz der RNA in den Viren – wird vernachlässigt) nach einem Symmetriegesetz, das meist mit wenigen Parametern angegeben werden kann – bei einer Helix mit deren Richtung, Durchmesser, Windungshöhe und Anzahl der Untereinheiten pro Windung. Ihre Zahl spielt gegenüber der beträchtlich größeren Zahl der zur Beschreibung der Untereinheit erforderlichen Parameter kaum eine Rolle, so daß – informationstheoretisch – ein solches Makromolekül praktisch dem „Untereinheitsmolekül“ gleichzusetzen ist. Man kann diese Betrachtungsweise noch weiterführen. Wie erwähnt, ist eine biologische Helix eine schraubenförmig gewundene „Perlenkette“ aus „gleichen“ Untereinheiten. Vom Standpunkt der dreidimensionalen Analyse kann man eine solche Helix geradezu als „Kippvorrichtung“ ansehen, welche einzelne Untereinheiten in die zur Strukturanalyse erforderlichen Orientierungen bringt. Dies verdeutlicht einen Vorteil, aber auch einen Nachteil: Zum einen werden viele Untereinheiten abgebildet, wobei über Artefakte durch Präparation und Strahlenschädigung gemittelt wird (Objektfilterung<sup>[47]</sup>); zum anderen funktioniert dieses Prinzip offenbar nur für kleinere Strukturen – eine TMV-ähnliche Helix mit Ribosomen als Untereinheiten wäre so riesengroß, daß wegen ihrer Dicke der Gültigkeitsbereich der kinematischen Theorie überschritten wäre. Das hat die Konsequenz, daß die eigentlich dreidimensionale Information – ausgedrückt z. B. als Zahl der Auflösungselemente N im „Rekonstruktionsvolumen“ der Untereinheit – wegen der begrenzten biologischen Auflösung doch recht gering ist (Größenordnung 10). Immerhin ist der ästhetische Reiz hochsymmetrischer helicaler und sphärischer Ornamente beträchtlich – man freut sich gewissermaßen, daß die längst vergessenen Träume einer *Dorothy Wrinch*, die in ih-

rer Cyclotheorie extrem symmetrische Proteinstrukturen postuliert hatte<sup>[53]</sup>, wenigstens in diesem Bereich konkret wurden.

Übrigens gilt diese informationsbezogene Beschreibung des Makromoleküls auch für Röntgenbeugungsuntersuchungen hochsymmetrischer Makromoleküle wie des TMV-Proteins<sup>[54]</sup>. Das große Molekulargewicht kompliziert zwar die Messung – es ist eine Unzahl von Streudaten zu bestimmen – die hohe Symmetrie erleichtert aber die Analyse. Bei der Diskussion helicaler Strukturen sei auch auf die Möglichkeit der dreidimensionalen röntgenographischen Analyse von Faserdiagrammen hingewiesen, die der Vorläufer der elektronenmikroskopischen Analyse war und z. B. bei TMV sehr weit getrieben werden konnte<sup>[55]</sup>.

### 3.3. Die Analyse nativer periodischer Strukturen

Die Ausgangspunkte der tomographischen Verfahren<sup>[48, 49]</sup> und unseres Beitrags zur dreidimensionalen Elektronenmikroskopie<sup>[50]</sup> waren verschieden. Unzufrieden damit, daß die Strahlenschädigung bei biologischen Präparaten zu Kontrastierungstricks nötigte und schlechte Auflösung unvermeidlich scheinen ließ, suchten wir nach Wege, die analog zur Röntgenstrahlkristallographie zu einer Elektronenstrahlkristallographie von nativen Proteinen führen könnten. Wir gingen dabei gleich von der Möglichkeit der diffraktometrischen Bestimmung von Amplitude und Phase der Kristallreflexe durch elektronenmikroskopische Methoden aus – in unserem Laboratorium wurden ja auch die Methoden der Ortsfrequenzfilterung und damit der elektronenmikroskopischen Diffraktometrie entwickelt.

Die erste Hürde war das Präparat. Proteinkristalle enthalten etwa gleichviel Lösungsmittel wie Protein. Beim Eintrocknen geht die kristalline Ordnung weitgehend verloren. Es galt also, einen vakuumresistenten „Stoff“ zu finden, der das Lösungsmittel ersetzen, aber die Kristallordnung nicht stören sollte. Von den bekannten Einbettungsmitteln der Elektronenmikroskopie erwiesen sich vor allem hydrophile Polymere als brauchbar. Die Alternative, das Wasser im Kristall zu belassen und durch modifizierte Untersuchungsverfahren wie Elektronenmikroskopie mit feuchten Objektkammern oder Tieftemperaturmikroskopie (Eis hat bei  $-180^{\circ}\text{C}$  einen Dampfdruck von  $10^{-20}$  mbar) seine Abdestillation zu verhindern<sup>[56]</sup>, schien anfangs weniger erfolgversprechend. Als Teststrukturen benutzten wir Kristalle von Myoglobin und Erythrocytoxin und prüften röntgenographisch die Erhaltung der Struktur. Für die Präparation wurden eigene Verfahren entwickelt (z. B. Verbrückung der Proteine mit Glutaraldehyd, um sie unlöslich zu machen).

Figur 17b zeigt eine Präzessionsaufnahme eines in Vaseline eingebetteten Kristalls von Myoglobin. Man erkennt, daß die Ordnung hier viel schlechter ist als im feuchten Kristall (Figur 17a). Die Störung der Kristallordnung vollzieht sich erst im letzten Präparationsschritt bei der Umwandlung des monomeren Einbettungsmittels zum Polymer; Aufnahmen der mit dem Monomer durchtränkten Kristalle zeigen unverminderte Ordnung der Proteinkristalle<sup>[57]</sup>. Statt durch Polymerisation unter kovalenter Vernetzung empfiehlt es sich daher, den Dampfdruck

[\*] Neue Untersuchungen an einem sphärischen Virus (Gelbrübenmosaikvirus) scheinen diese Befürchtungen zu bestätigen [95].

durch Nebenvalenzkräfte (Verringerung der Temperatur) zu senken. Die Palette der so als Ersatz für Wasser in Frage kommenden Stoffe ist breiter. Natürlich ist auch Wasser selbst – wie schon erwähnt und wie später experimentell bestätigt wurde<sup>[58]</sup> – brauchbar. Aber sein anomales Verhalten bei Kristallisation kann nur durch Tricks überlistet werden, z.B. durch Unterkühlung (schocksartiges Tieffrieren) oder durch Erzeugen einer nicht-anomalen Eismodifikation bei hohem Druck<sup>[59]</sup>. Bei Ersatz des Wassers kann man neue Parameter (Dampfdruckkurve) variieren und auch Mischungen (partielle Destillation) erproben. Jedenfalls bestehen nun kaum Zweifel – für Eis<sup>[58]</sup> und organische Monomere<sup>[57]</sup> als Matrix wurde es nachgewiesen –, daß eine Präparation nativer Strukturen von Bio-

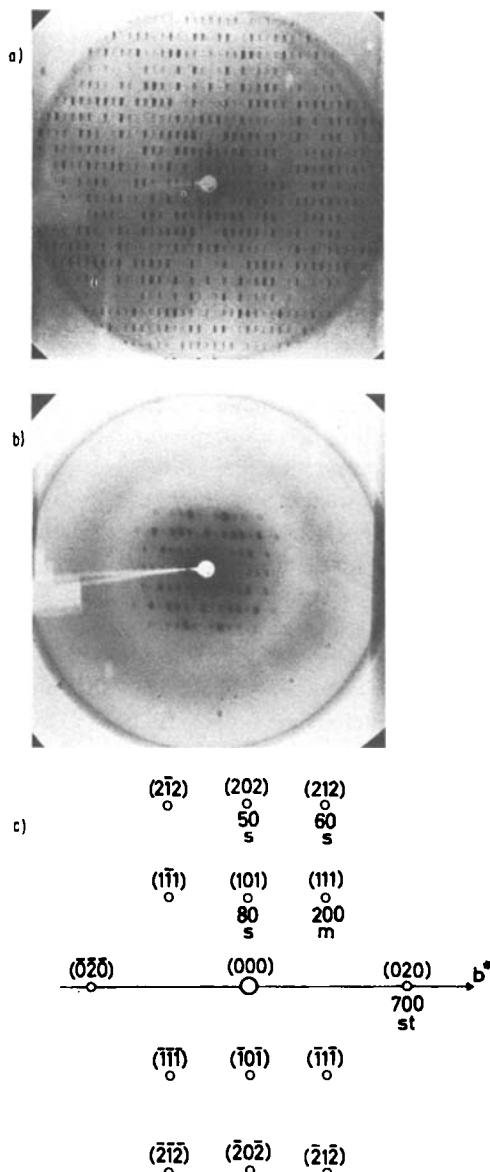


Fig. 17. a) Röntgenbeugungsaufnahme (Präzessionsdiagramm) eines Pottwal-Myoglobinkristalls ( $hk\bar{0}$ -Projektion) in Mutterlauge. b) Präzessionsdiagramm nach Verbrückung der Proteine mit Glutaraldehyd und Entwässerung sowie Einbettung in Vestopal (polymerisiert). c) Schematische Darstellung eines Elektronendiffraktogramms eines dünnen Ultramikrotomschnittes eines in Vestopal eingebetteten Kristalls. Außer der Indizierung sind die Absolutwerte der mit Röntgenstrahlen gemessenen Strukturfaktoren und (darunter) die geschätzten Elektronenstrahlintensitäten (st = stark, m = mittel, s = schwach) angegeben (nach [50]). – In einer „Nachlese“ [57] wurden verschieden, vor allem auch wasserlösliche Einbettungsmittel untersucht und auch eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines ungefärbten Ultramikrotomschnittes gezeigt, welche ungeordnet („granuliert“) erschien, aber im Lichtdiffraktogramm einzelne Reflexe aufwies.

molekülen für Elektronenmikroskopie bis zu hoher Auflösung möglich ist.

Für das vorläufige Ziel unserer Arbeit<sup>[50]</sup> genügte die röntgenographisch erreichte Auflösung von 0.8 nm (Fig. 17). Elektronenbeugung an dünnen Schichten der ohne Kontrastierung präparierten Kristalle ergab deutliche Kristallreflexe, die beim Vergleich mit den Röntgenaufnahmen einen analogen Intensitätsverlauf zeigten. Diese Beugungsdiagramme waren unter den üblichen Strahlungsbedingungen im Elektronenmikroskop – noch ohne die von Williams et al. eingeführte Technik der minimalen Dosis<sup>[60]</sup> (nicht zu verwechseln mit der Technik der kleinen Dosis) – nur wenige Sekunden beobachtbar. Die geringere Auflösung im Elektronenbeugungsdiagramm (1.2 nm statt 0.8 nm) ist wahrscheinlich auf Strahlenschädigung während der Einstelloperationen zurückzuführen. Wichtig war allein die Tatsache, daß die Elektronenstrahlanalyse nativer Proteine (und somit auch anderer biogener Makromoleküle) keine Utopie ist.

Ein Gesetz der Strukturforschung, der Reziprozitätssatz, besagt, daß struktureller Information in einem der beiden dualen Räume – Ortsraum und reziproker Raum – immer eine analoge (in den anderen Raum transformierte) Information entsprechen muß. Auf unser Problem angewendet bedeutet er, daß in der Abbildung des nativen Kristallgitters im Elektronenmikroskop die gleiche Information über die Struktur des Kristalls enthalten sein muß wie im Beugungsbild. Jedoch ist in ihr die Information über die Phasen enthalten, die zwar auch das Beugungsbild enthält, die aber bei der Umwandlung von Amplitude in Intensität verlorengeht (im Gegensatz zur Intensitätsbildung in der Bildebene)<sup>[50]</sup>. Allerdings muß der Einfluß des Meßinstruments Elektronenmikroskop (Phasenobjekt, Linsenfehler) berücksichtigt werden (vgl. Abschnitte 2.3–2.10). Für die Projektionsrichtungsänderung (zur dreidimensionalen Analyse) sollten verschieden orientierte Ultramikrotomschnitte des Kristalls dienen<sup>[50]</sup>, womit auch in der Elektronenmikroskopie der ganze reziproke Raum zugänglich wird. Das gleiche Ziel erreicht man mit der sonst in der Kristallographie üblichen Orientierungsänderung durch Verwendung eines Goniometers („Kippung“).

Warum eine Kristallstrukturanalyse nativer biogener Makromoleküle mit dem Elektronenmikroskop möglich ist, sei mit einem Zitat<sup>[24a]</sup> verdeutlicht: “Let us first start with a not very encouraging discussion concerning the physical possibility of ‘molecular microscopy’. It is the strong interaction of electrons with atoms which makes it possible to collect in a reasonable time enough scattered electrons for the recognition of single atoms. But there is also the unhappy situation that for light atoms the cross sections for elastic and inelastic scattering are of the same order of magnitude. That means that the number of elastic and inelastic collisions is approximately the same. In crystal structure analysis there are many equivalent molecules—in a small protein crystal e.g.  $10^{17}$ ! It is therefore highly improbable that a molecule will be hit more than once by an incident quantum. Therefore the elastically scattered quanta will find untouched molecules and can build up diffraction patterns of the non-distorted molecule”. Nun ist das Mittelungsprinzip ein fundamentales Prinzip der Kristallographie; es wird in Lehrbuchartikeln behandelt<sup>[61]</sup>, bei der Röntgenbeugungsanalyse statistischer

Überlagerungen von Molekülen mit verschiedener Konformation benutzt<sup>[62]</sup>, auch auf kontrastierte elektronenmikroskopische Molekülbilder angewendet, die durch Präparation und Strahlenschädigung (Hochdosisaufnahmen) verursachte Unterschiede zeigen<sup>[47, 48]</sup>. Merkwürdigerweise aber fand Mittelung zur Elimination von Strahlenschäden erst spät Aufmerksamkeit<sup>[24a, 50]</sup> (eine in diesem Zusammenhang zitierte<sup>[58]</sup> informationstheoretische Arbeit<sup>[63]</sup> enthält keinen Hinweis auf diese Möglichkeit) – vielleicht, weil spät erkannt wurde<sup>[64]</sup>, daß das Verhältnis von inelastischen zu elastischen Zusammenstößen mit Atomen auch für Röntgenstrahlen sehr groß ist. Es ist sogar um fast den Faktor 10 größer als für Elektronenstrahlen, d.h. Röntgenstrahlen sind stark strahlenschädigend<sup>[\*]</sup>.

Glaeser<sup>[58]</sup> untersuchte ab 1970 die Strahlenschädigung organischer Strukturen systematisch und machte in Computersimulationen anschaulich, wie man den Einfluß von Strahlenschäden mit kristallographischer Mittelung reduzieren kann. Nach diesen Vorarbeiten gelang Henderson und Unwin<sup>[65]</sup> die diffraktometrische dreidimensionale Analyse eines nativen Kristalls (Purpurmembran aus *H. halobium*) mit Ortsfrequenzfilterung (vgl. Abschnitte 2.2-2.10)<sup>[\*\*]</sup>. In den letzten Jahren sind solche Strukturanalysen sehr populär geworden<sup>[66]</sup>, wobei sich allerdings zeigte, daß eine für die Hochauflösung geeignete Präparation bei sehr großen Molekülen auf Schwierigkeiten stößt; schon ohne Strahlenschädigung sind Auflösungen  $\leq 2 \text{ nm}$  schwer erreichbar. Ähnliche Schwierigkeiten treten auch bei der Röntgen-Kristallographie hochmolekularer Strukturen auf. Hochsymmetrische organische Makromoleküle (z.B. helicale Strukturen) könnten nativ bequem mit der Geringdosistechnik untersucht werden. Geringdosisuntersuchungen am kontrastierten Tabakmosaikvirus<sup>[67, 68]</sup> haben demonstriert, wie beim Übergang zum nichtgeschädigten Molekül neue Details (vor allem im Nucleinsäurebereich) erkennbar werden.

### 3.4. Dreidimensionale Elektronenmikroskopie individueller Strukturen („echte“ dreidimensionale Elektronenmikroskopie)

#### 3.4.1. Warum „individuelle“ Strukturen?

Die Röntgen-Kristallographie hat sich aus kleinen Anfängen zu einem der bedeutendsten Wissenschaftszweige entwickelt. Wie wäre es heute um unser Verständnis der „Materie“ (also auch um die Chemie) bestellt, wenn die Beugungsmethoden uns nicht eine so detaillierte Kenntnis der atomaren Baumuster – bis zu den Proteinen – beschert hätten? Im Blickfeld stehen dabei aber nur hochgeordnete,

[\*] Ein Maß der Strahlgefährdung ist das Verhältnis der inelastischen Stöße – welche eine Struktur verändern können (aber nicht müssen) – zu den elastischen Stößen. Früher wurde häufig (auch in der Hochspannungselektronenmikroskopie) die Strahlenschädigung mit dem reziproken Streuquerschnitt korreliert. Das ist für Abbildungsprobleme, bei denen es auf die Anzahl der gestreuten Quanten (Elektronen) ankommt, natürlich sinnlos.

[\*\*] Gegenüber den ersten Versuchen zur Strukturanalyse nativer Kristalle [50] ist methodisch bemerkenswert, daß die Analyse am zweidimensionalen Kristall (Membrankristall) durchgeführt wurde, was eine Anbindung an die Analysemethoden individueller Strukturen (vgl. z.B. [81]) ermöglicht; sogar die Bestimmung des gemeinsamen Ursprungs (nach Übersetzung in den reziproken Raum, vgl. Abschnitt 3.4.2) kann beibehalten werden. Das gilt für dreidimensionale Kristalle (wie in [50]) nur mit Einschränkungen (vgl. [77, 96]).

periodische Aggregate (wie Einkristalle). Daneben existiert jedoch die Welt der individuellen Strukturen, die nicht exakt reproduzierbar sind, die aber nicht nur in der Biologie (allerdings da wohl in besonderem Maße), sondern für chemische Vorgänge im allgemeinsten Sinne von Bedeutung sind. Wie dürfte hier unsere Kenntnis! Man denke nur an „Platinruß“, einen anorganischen Katalysator für Reaktionen organischer Moleküle, dessen Teilchenform sich kaum wiederholt. Oder eine biologische Membran: Ihr Enzymmuster an der Oberfläche läßt topologische Wechselwirkungen vermuten, die Folgen von Enzymreaktionen optimieren. Enzymkomplexe wie die Fettsäure-Synthetase mögen Vorläufer solcher „Fabriken“ sein. Wiederum ist die Struktur nicht wiederholbar, aber ihr Bauprinzip für die Biochemie wichtig.

Eine Methode, die sich grundsätzlich für Untersuchungen in diesem Problemkreis eignet, finden wir in der Mikroskopie. Mit der Lichtmikroskopie erkannte man z.B. die individuell so verschiedenen Zellen, welche aber auch strukturelle Gemeinsamkeiten offenbarten. Mit der konventionellen Elektronenmikroskopie näherte man sich bei der Untersuchung individueller Strukturen dem molekularen, allerdings noch nicht dem atomaren Bereich; eine ihrer Grenzen ist die informationsfressende Beschränkung auf Projektionen räumlicher Körper. Die phasenbestimmende Diffraktometrie mit ihrer Verknüpfung der Prinzipien von Strukturforschung und Mikroskopie verhieß auf dem weiten Feld der aperiodischen und individuellen Strukturen (mit Anwendungsmöglichkeit auf allen Gebieten der Chemie) die interessantesten Einsichten.

Deshalb ließen wir in München die Röntgenbeugung sowie die Neutronenbeugung<sup>[69]</sup> und auch die Proteinkristallstrukturanalyse mit dem Elektronenmikroskop<sup>[50]</sup> zwar nicht gänzlich außer acht, konzentrierten unsere Bemühungen aber auf die methodische Weiterentwicklung der Elektronenbeugung individueller aperiodischer Strukturen. Atomare Auflösung war mit thermischen Kathoden nicht oder (mit den Methoden der synthetischen Apertur<sup>[33-35]</sup>) nur unvollkommen zu erreichen. Die aufwendige Entwicklung der besser monochromatisierenden Feldemissionskathoden im eigenen Laboratorium wäre sinnlos gewesen, da sie schon anderswo erfolgreich begonnen worden war; heute kann man Feldemissionskathoden (wenn auch für viel Geld) kaufen. Dreidimensionale Analyse mochte jedoch bei jeder Auflösung faszinierend sein; auch war zu erwarten, daß bei geringerer Auflösung allgemeine Stabilitätsprobleme weniger hinderlich sein sollten. Ein selbstaufgeriegtes Handicap war die Konzentration auf biologische Strukturen, da wir uns damit das vielfältige Problem der Strahlenschädigung einhandelten. Nicht ohne Neid blicken wir auf die anorganische Elektronenmikroskopie, wo ganz konventionell und mit unglaublich hohen Strahlendosen abgebildete Kristallprojektionen nützliche Beiträge zu topochemischen Fragestellungen liefern<sup>[70]</sup>. Die bei inelastischen Streuprozessen übertragene Energie wird ohne Schaden für das Objekt abgeleitet. Aber andererseits sind die biochemischen und biophysikalischen Fragen besonders reizvoll. Auch hatte schon die konventionelle Elektronenmikroskopie gezeigt, welch wertvolle Informationen trotz Strahlenschäden gewonnen werden können, wenn das Objekt in geeigneter Weise präpariert wird (vgl. Fig. 18).

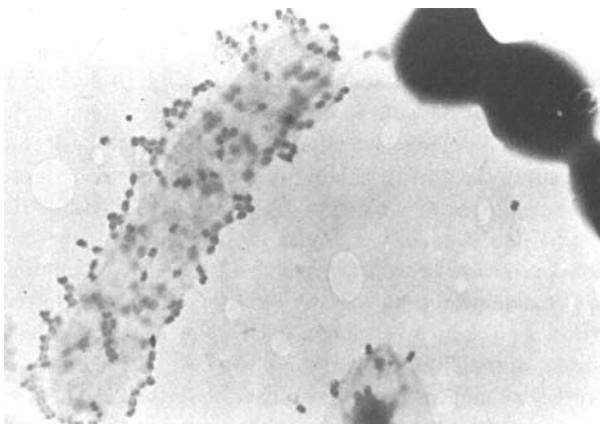


Fig. 18. Entdeckung der Bakteriophagen mit dem Elektronenmikroskop. Bereits am 16. 12. 1939 hat H. Ruska eine Arbeit zur Veröffentlichung eingereicht (*Naturwissenschaften* 28 (1940) 45), in der Bakteriophagen bei der Lyse von *E.-coli*-Zellen entdeckt wurden. Die vorliegende Abbildung stammt aus einer späteren Mitteilung (H. Ruska, *Naturwissenschaften* 29 (1941) 367), nachdem auch die „häufig ins Bakterieninnere gerichteten“ Phagenschwänze beim Angriff der Bakteriophagen auf Proteuszellen erstmalig beobachtet wurden. [Ich danke Frau C. Ruska, Institut für Biophysik der Medizinischen Akademie Düsseldorf, für dieses Bild.]

Die erfolgreiche Geringdosisanalyse nativer periodischer Strukturen (Abschnitt 3.3) hat dazu verführt, daß Hochdosisuntersuchungen kontrastierter Strukturen bisweilen als „rückschrittlich“ betrachtet werden. Bei individuellen Strukturen muß man aber zur Hochdosisanalyse zurückkehren. Das zu untersuchende Objekt, auch ein Makromolekül, liegt ja keineswegs isoliert vor. In Wirklichkeit beobachten wir Reaktionsprodukte aus Umsetzungen der eigentlich interessierenden Verbindung mit Präparationsreagens, Unterlage und Strahlung. Denn auch „Strahlenschädigung“ ist Chemie. Falls die Strahlenreaktion auf irgendeine Weise eliminiert werden kann, so bleiben immer noch die Präparationsreaktionen. Und diese können die Struktur des Objekts erheblich beeinflussen. Selbst bei gleichen Molekülen ist das Reaktionsprodukt nur unter völlig gleichen Reaktionsbedingungen reproduzierbar. Dazu ein Vergleich: Wenn mehrere Personen den Buchstaben „a“ schreiben, so kann er verschieden aussehen, er bleibt aber immer „a“. Wir haben es hier mit einem Grundproblem der computerisierten Schrifterkennung zu tun, das in der Informationstheorie als „Mustererkennung“ behandelt wird. Durch Nachspüren gemeinsamer Strukturmerkmale gelangt man zum Begriff des Buchstabens „a“. Auch in der Elektronenmikroskopie individueller Strukturen muß das primitive Vergleichen und Mitteln durch Ideen der „Mustererkennung“ ersetzt werden. Als „kalkulierbares Reaktionsprodukt“ verliert der „Strahlenschaden“ seinen Horror; die Elektronen sind einfach ein weiterer, wenn auch unbequemer Reaktionspartner. Man kann die Reaktionsbedingungen gezielt variieren, z. B. freigesetzte Elektronen durch Acceptoren abfangen oder die Temperatur erniedrigen.

Zu eindeutigen strukturellen Befunden führt nur die dreidimensionale Untersuchung. Zu einer gegebenen Projektion kann man durch Vertauschen von Bildelementen entlang der Projektionsrichtung beliebig viele Strukturen erzeugen. Hinzu kommen noch zufällig oberhalb und unterhalb liegende Komponenten (z. B. Unterlagsfolie). Auch ist es wichtig, eine so hohe Strahlendosis zu verwenden, daß eine signifikante Abbildung der räumlichen Struktur

erhalten wird. Denn nur dann kann man Änderungen in der Struktur chemischen Änderungen – z. B. der Verteilung von Kontrastmittel – zuordnen. Bei den notwendigen hohen Dosen ist eine langsame Veränderung der Struktur während der Exposition (nach der schnellen Zerstörung der nativen Struktur) nicht auszuschließen. Das dreidimensionale Verfahren sollte deshalb so arbeiten, daß es die Mittelstruktur liefert (wie bei der konventionellen Mikroskopie). Und schließlich sollte das Elektronenmikroskop selbst fehlerfrei sein, denn sonst kann man ja nicht entscheiden, ob eine Strukturänderung objektbedingt ist oder durch Linsenfehler vorgetäuscht wird. Schon aus diesem Grunde sind die qualitativen tomographischen Verfahren unvollkommen. Erst die korrekte Ortsfrequenzfilterung mit Bestimmung der Struktur der Bildpunkte gewährleistet ein ausreichend quantitatives Vorgehen.

Dies wird oft mißverstanden: So wurde erst kürzlich angeregt, individuelle Strukturen gleicher Partikeln durch Auflösungsniedrigung „ähnlicher“ zu gestalten und dadurch das „Rauschen“ zu vermindern. Das mutet an, als wollte man einem Zellbiologen vorschlagen, seine Zellen unschärfer abzubilden, um ihre individuellen Unterschiede (die man als „Rauschen“ bezeichnet) auszubügeln. Zwar kann er das tun und erhält so eine „Einheitszelle“ durch nachträgliche Überlagerung, aber alle Feinheiten – etwa in den Zellkernen – gehen so verloren. Der Lichtmikroskopiker, der die Zellen individuell studiert, kann es besser: Er macht intuitiv „Mustererkennung“. Man muß nur an die doch recht groben Präparationsverfahren denken, um zu verstehen, wie verschieden „gleiche“ Partikeln aussehen können. Jedoch sollte man das reiche, in der konventionellen Elektronenmikroskopie gesammelte präparative Erfahrungspotential auch nicht unterschätzen. Aber erst durch dreidimensionale Analysen kann es wirklich ausgelotet und nutzbar gemacht werden. In der Folge sind davon gezielte Verbesserungen der Präparationsmethoden zu erwarten.

Selbstverständlich soll dies nicht bedeuten, daß Mittelungen über gleichartige „Reaktionsprodukte“ von identischen Partikeln unnötig sind. Statistische Verfahren werden immer nötig bleiben, um Gesetzmäßigkeiten in Gesamtheiten von Individuen zu studieren. Aber man soll die Chemie dabei nicht vergessen. Eingedenk der Entwicklung der Geringdosisanalyse kann man einsehen, wie es zu den Fehlüberlegungen bei der Mikroskopie individueller Strukturen gekommen ist. Das individuelle Abbild besteht dort praktisch nur aus echtem, uninterpretierbarem Elektronenrauschen. Hingegen ist z. B. die so charakteristische „Granulation“ in jeder elektronenmikroskopischen Aufnahme bei höherer Auflösung (vgl. Figur 23) kein Rauschen, auch wenn sie der Elektronenmikroskopiker als „Strukturrauschen“ bezeichnet<sup>[\*]</sup>.

[\*] Die beschriebene Mittelung bezieht sich auf Partikeln, die elektronenstatistisch signifikant gemessen wurden. Aber man kann natürlich auch die integrale Dosis pro Partikel reduzieren, wobei die Einzelpartikeln starkes Elektronenrauschen zeigen, das erst bei der Mittelung reduziert wird. So mit läßt sich der Strahleneinfluß studieren. Im Grenzfall sehr geringer Strahlendosen (Analyse nativer Strukturen) kann man wegen der Austauschbarkeit der Operationen auch zuerst die zur Durchführung der dreidimensionalen Rekonstruktion erforderlichen Projektionen mitteln und anschließend mit den gemittelten Projektionen rekonstruieren [94]. Dieses Verfahren entspricht in der Grundidee der kristallographischen Rekonstruktion (vgl. Abschnitt 3.3), bei der die dreidimensionale Rekonstruktion ebenfalls aus den (durch den Kristall) gemittelten Einzelprojektionen aufgebaut wird.

### 3.4.2. Methodische Aspekte

#### Erforderliche Strahlendosis

Beim Übergang von der zweidimensionalen Diffraktometrie (fixierte Primärstrahlrichtung) zur dreidimensionalen Diffraktometrie treten einige neue Fragen auf. So wurde befürchtet, daß die große Zahl von Aufnahmen bei Drehung des Objekts (vgl. Fig. 16) eine extreme Strahlenbelastung des Präparates mit sich brächte. Wir haben nachgewiesen<sup>[71]</sup> (was überraschte und Zweifel hervorrief<sup>[72]</sup>), daß für eine zweidimensionale Aufnahme (mit Ortsfrequenzfilterung) ungefähr gleich viele Elektronen bei gleicher elektronenstatistischer Signifikanz der Analyse erforderlich sind wie für eine dreidimensionale Analyse. Im ersten Fall wird die Gesamtdosis in einer Aufnahme appliziert, im zweiten Fall gleichmäßig auf die Teilaufnahmen verteilt. „Gleiche Signifikanz“ bedeutet, daß man in beiden Fällen ein Objektdetail (z. B. eine Schweratomgruppe) mit gleichem Signal/Rausch-Verhältnis erkennen kann, wobei im ersten Fall angenommen wird, daß es gegenüber der Umgebung (etwa eine planare Unterlagsfolie) diskriminiert werden kann; im dreidimensionalen Fall ist es durch die Auffächerung in z-Richtung (Richtung der optischen Achse) diskriminiert und auch in seiner z-Koordinate bestimmt. Um dies zu verdeutlichen<sup>[73]</sup>, denke man sich das Objekt in eine Reihe dünner Schnitte (mit der Dicke der z-Auflösung) zerlegt. Von jedem Schnitt wird eine Mikroaufnahme hergestellt. Das ist offenbar das optimale Verfahren, denn die anderen Schnitte werden durch die zur Abbildung eines Schnittes benötigten Elektronen nicht in Mitleidenschaft gezogen. Die Rechnung zeigt, daß die dreidimensionale Diffraktometrie gleich ökonomisch arbeitet wie die zweidimensionale (genaugenommen allerdings nur, wenn man die Krümmung der Ausbreitungskugel vernachlässigen kann). Dieser Gedankenversuch<sup>[73]</sup> offenbart auch die Quelle des Mißverständnisses<sup>[72]</sup>. Natürlich sind die Bilder der Schnitte kontrastärmer als das Bild des ungeschnittenen dicken Objekts. Wenn man das letztere nur erkennen will, so genügen wenige Elektronen. Aber dann kann man im zweidimensionalen Bild des Objektes keine Einzelheiten erkennen (Elektronenrauschen!).

#### Bestimmung des gemeinsamen Ursprungs

Ein zweites Problem betrifft die Phasenkorrelation der Strukturfaktoren der Kippaufnahmen. Sie wäre nicht erforderlich, wenn man – wie in der Tomographie – die Drehachse mit der Auflösungsgenauigkeit rotieren lassen könnte. Das ist in der Elektronenmikroskopie nicht möglich – die Auflösungen liegen in der Größenordnung Nanometer, die mechanischen Genauigkeiten in der Größenordnung Mikrometer. Wir haben das Verfahren der Kreuzkorrelation schwach geneigter Projektionen zur Bestimmung des gemeinsamen Ursprungs aller Fourier-Schnitte ausgearbeitet<sup>[74, 75]</sup> und dessen Theorie zunächst für den Idealfall von Punktatomen<sup>[75]</sup> und später von reellen Atomen entwickelt<sup>[76]</sup>. Hier sei nur erwähnt, daß es nach Übersetzung in den reziproken Raum auch für Analysen nativer Kristalle<sup>[65]</sup> benutzt wird<sup>[77]</sup>.

#### Zahl der Aufnahmen

Aus jeder Aufnahme lassen sich die Strukturfaktoren auf einer Kugelfläche im reziproken Raum bestimmen (vgl. Figur 3b), welche bei mittleren Auflösungen durch ihre Tangentialebene angenähert werden kann. Bei der dreidimensionalen Analyse bestimmt man nun ein diskretes Bündel von solchen Flächen (vgl. Figur 20), zwischen denen man interpolieren muß, um die eigentlich interessierende kontinuierliche Strukturfaktorverteilung im reziproken Raum zu erhalten. Anwendung des Whittaker-Shannon-Interpolationstheorems ergibt<sup>[78]</sup>, daß die minimale Zahl der Aufnahmen von der Auflösung und von der Größe des Objektes abhängt. Unsere Formel für die Anzahl von Projektionen<sup>[78]</sup> wurde von Crowther et al.<sup>[79]</sup> bestätigt. Jedoch hat sich dieses Problem später als komplizierter erwiesen. Die Rechnungen<sup>[78]</sup> beziehen sich auf den idealen Fall eines ungestörten und lageunabhängigen dreidimensionalen Bildpunktes. Läßt man zu, daß die Untergrundsunruhe etwas zunimmt, oder daß die Bildpunkte an den Rändern des Rekonstruktionsbereiches etwas schlechter aufgelöst sind als in der Mitte, so kann man die Zahl der Projektionen bis um den Faktor 2 reduzieren. So wird beim aus der computerisierten Tomographie bekannten Cormack-Versfahren, das einen zylinderförmigen Körper rekonstruiert (Zylinderachse gleich Drehachse), der Nahbereich in der Umgebung der Achse etwas schärfer abgebildet ist als am Zylindermantel. Wir verwenden dieses Verfahren – nach genauer Prüfung der Abhängigkeit des Bildpunktes von der Lage – in vielen unserer Rekonstruktionen, da die Umgebung des untersuchten Objekts (der Rekonstruktionsbereich ist immer größer als die Partikel) weniger interessiert und beim jetzigen Stand der Experimentiertechnik eine Beschränkung der Aufnahmefähigkeit ökonomisch geboten erscheint. Denn eine oder wenige mißlungene Aufnahmen einer Serie (vor allem bei Drift, vgl. Figur 9b) ruinieren das ganze Experiment. Es ist anzunehmen, daß bei weiteren experimentellen Verbesserungen (vor allem bei Automatisierung) der Frage nach der Minimalanzahl von Aufnahmen geringere Bedeutung zukommen wird.

#### Blinde Region im reziproken Raum

Einschneidender – weil grundsätzlich – ist die Beschränkung des Rotationsbereichs in der Elektronenmikroskopie. Zur Illustration stelle man sich im „Tomographiegrill“ (Fig. 16) als Objekt eine dünne Platte (Präparat auf Unterlage) vor. Wenn diese Platte hochkant steht, wird sie nicht durchstrahlt, und Halterungen beschränken den Winkelbereich zusätzlich. In der Elektronenmikroskopie kann man das Präparat im allgemeinen um ca.  $\pm 60^\circ$  aus der HORIZONTALLAGE schwenken, d.h. die Rotation in Figur 16 muß durch eine Kippung um etwa  $\pm 60^\circ$  ersetzt werden. Das hat unerfreuliche Folgen für die Bildpunktgestalt, die im Idealfall kugelähnlich (wie in der Kristallographie) sein sollte. Figur 19 ist zu entnehmen, daß anstelle einer Kugel ein anisotropes Gebilde entsteht, welches in Richtung der Kippachse die elektronenoptische Auflösung zeigt ( $\Delta y$ ), senkrecht dazu aber außer durch die elektronenoptische Auflösung auch durch das Winkelinkrement  $\Delta\alpha$  (also durch die Zahl der Aufnahmen) bestimmt ist. Dabei ist die

Länge des Bildpunktes in Richtung der optischen Achse ( $\Delta z$ ) um einen Faktor  $n$  länger als senkrecht dazu ( $\Delta x$ );  $n$  hängt vom Winkelbereich ab ( $n = 1.8$  bei  $\alpha = \pm 60^\circ$ ). Durch Verkleinerung von  $\Delta x$  kann man natürlich immer  $\Delta x = \Delta y$  erreichen, die Verlängerung von  $\Delta z$  ist aber stets vorhanden. Unschön sind zwei tiefe, eng benachbarte Seitenminima in  $x$ -Richtung. Sonst ist aber der Untergrund nur wenig durch Beugungsunruhe gestört. Besonders bemerkenswert ist, daß die Gewichtung der Übertragungsfunktionen mit ihren Nullstellen die Bildpunktform und die Untergrundunruhe kaum beeinflussen. Nach Bestimmung der Transferfunktion für jede Aufnahme (die sehr verschieden sein können) berechnen wir den realen Bildpunkt dieser Rekonstruktion. Figur 19b zeigt ein Resultat. Die umständliche Ausmittelung durch Fokussierungsserien<sup>[26, 27]</sup> kann man sich also in der dreidimensionalen Analyse ersparen – die Mittelung erfolgt auch bei geneigten Projektionen.

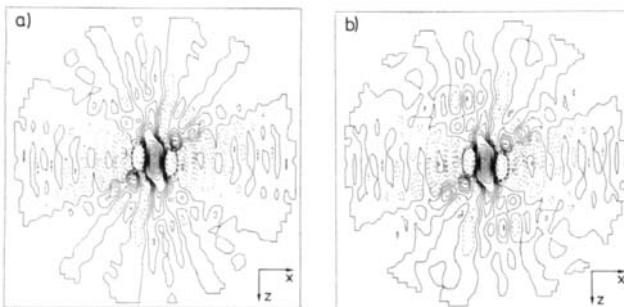


Fig. 19. Bildpunktprobleme in der dreidimensionalen Elektronenmikroskopie. Wegen der endlichen Auflösung ist ein Bildpunkt immer ein ausgedehntes Gebilde, im Idealfall in zwei Dimensionen mit Kreis-, in drei Dimensionen (Kristallographie) mit Kugelsymmetrie. Der eingeschränkte Kippwinkelbereich der Goniometer ist Ursache für Asymmetrien und Anisotropien. Bei Kippung um eine Achse kann man sich den dreidimensionalen Körper der Rekonstruktion in eine Serie von Scheiben senkrecht zur Kippachse ( $y$ -Achse) aufgeteilt denken, die im Abstand der  $y$ -Auflösung ( $\Delta y$ ) angeordnet sind. a) Abbildung des Bildpunktes in der  $x, z$ -Ebene bei Kippung um  $+60^\circ$  bis  $-54^\circ$ , ideale Gewichtsfunktion, Schichtlinien  $< 0$  gestrichelt, Schichtlinienabstand 6% (ab der Dichte +0.3 ist der Schichtlinienabstand auf 8% vergrößert). Bildpunktthöhe auf 1 normiert; Untergrundunruhe weit unter  $\pm 10\%$  mit Ausnahme zweier benachbarter Seitenminima. Diese bewirken eine gewisse Verformung der Rekonstruktionen in  $x$ -Richtung (vgl. Testrechnungen [81]). Wichtig ist, daß die Seitenminima nur die nächste Umgebung der Bildpunkte beeinflussen können, und somit großräumige Verfälschungen der Gesamtrekonstruktion unmöglich werden. Natürlich muß man die astigmatischen Verzerrungen bei der Deutung von Analysen beachten. Bei Überlagerung von reproduzierbaren gleichorientierten Strukturen (mit verschiedenen Richtungen der Kippachse) mittelt sich der Einfluß der negativen Minima weitgehend aus, während die Anisotropie entlang  $z$  erhalten bleibt. Leider stößt eine Mittelung verschieden orientierter Partikel (die einen fast kugelsymmetrischen mittleren Bildpunkt erzeugen könnten) wegen Orientierungseinflüssen zumindest mit den jetzigen Präparationsverfahren auf Schwierigkeiten. b) Gleicher Bildpunkt wie in a), aber mit den experimentellen Transferfunktionen berechnet. Man beachte die überraschend große Ähnlichkeit mit a), welche die Ausmittelung des Einflusses von Ortsfrequenzlücken nach [26, 27] überflüssig macht. Durch die Gewichtung der Transferfunktionen wird aber die Bildpunktthöhe um ca. 25% verringert (nichtoptimale Kontrastübertragung gegenüber dem hypothetischen Idealfall (fehlerloses Mikroskop und Zernike-Platte)).

Kann man mit diesem stark anisotropen Bildpunkt auskommen? Unsere Situation ist ähnlich der eines Menschen mit astigmatischem Auge. Er wird eine Schrift lesen können, wenn in der Richtung des verlängerten Bildpunktes die Auflösung ausreicht; die Verformungen in den anderen Richtungen stören dann nur wenig. Für die Anwendung in der Elektronenmikroskopie bedeutet das, daß  $\Delta z$  gleich groß sein sollte wie die gewünschte Auflösung (also etwa 2 nm bei kontrastierten biologischen Strukturen). Das ist

nicht schwer zu erreichen, da bei individuellen Strukturen die elektronenmikroskopische Auflösung stets recht hoch ist. Man sieht gewissermaßen auch die Körnung im Schweratomglas, die zwar an sich nicht sehr interessant ist (wenn man nicht gerade ihre Gesetze studieren will), welche aber hilft, eine genügende  $z$ -Auflösung zu erreichen. Aus diesem Grunde arbeiten wir meist mit einem  $\Delta x$ -Bereich von ca. 1 nm. Wie Testrechnungen gezeigt haben, stören die negativen engbenachbarten Minima nur die nächste Umgebung (erzeugen bei sehr steilen Kanten eine Art von Fresnel-Säumen), man muß über sie und über die Zufälligkeiten der Struktur in den Richtungen schärferer Wiedergabe „hinwegsehen“. Figur 20 zeigt schematisch das gesamte Rekonstruktionsverfahren.

#### SCHEMA EINER 3D-REKONSTRUKTION

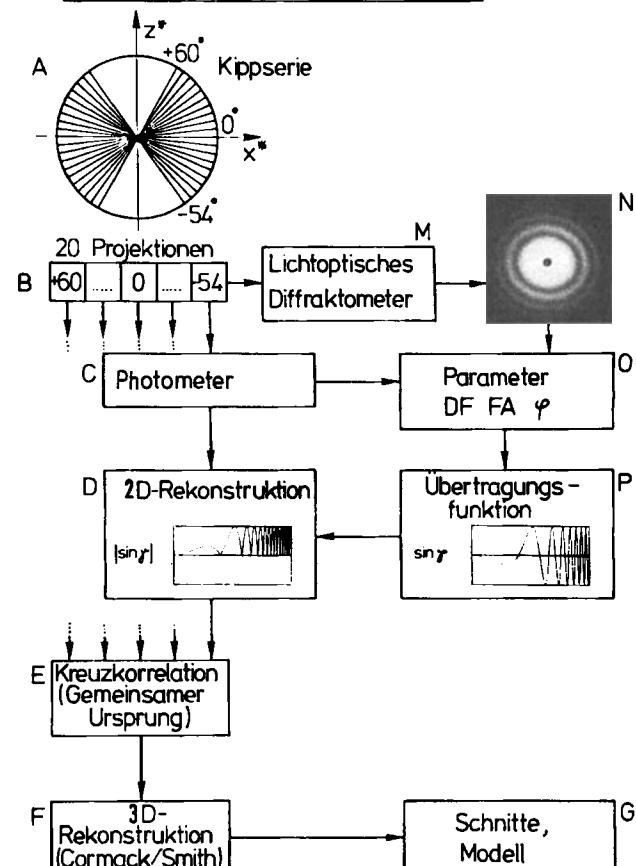


Fig. 20. Flußdiagramm einer Rekonstruktion bei Kippung um eine Achse. A: Besetzung des reziproken Raumes mit Fourier-Schnitten; die Koordinaten  $x^*, y^*, z^*$  sind parallel zu den Koordinaten  $x, y, z$  im Ortsraum, zentrale Schnitte (entsprechen den Projektionen im Ortsraum) sind im Kippwinkelbereich von  $+60^\circ$  bis  $-54^\circ$  mit Winkelinkrementen von  $6^\circ$  (projiziert entlang  $y^*$ ) eingezeichnet. Man beachte die „blinde“ Region im reziproken Raum, die nicht mit Schnitten erfüllt ist und daher die in Fig. 19 diskutierten Anisotropien des Bildpunktes verursacht. B: Block der Mikroaufnahmen, die im automatischen Densitometer C photometriert werden (nach Prüfung im Lichtdiffraktometer M, das die Lichtdiffraktogramme N liefert). Aus ihnen (halbquantitativ) und aus den densitometrischen Aufnahmen werden die Parameter O (Defokussierung, achsialer Astigmatismus) für die Korrektur der Strukturfaktoren (Transferfunktionen P) gewonnen. Im Schritt D wird diese Korrektur (zweidimensionale Bildrekonstruktion, auch als Bildrestoration bezeichnet) vorgenommen. Im nächsten Schritt E erfolgt die Bestimmung des gemeinsamen Ursprungs aller Projektionen (und damit des dreidimensionalen Körpers). Letzter Schritt ist die eigentliche dreidimensionale Synthese F (Schnitte G).

Die Störung durch negative Minima läßt sich bei „konischer Kippung“<sup>[49]</sup> mit speziellen Rekonstruktionsverfahren völlig eliminieren<sup>[78b]</sup>. Figur 21 zeigt einen Bildpunkt, der rotationssymmetrisch ist und schon bei  $45^\circ$  Kippung

nur um  $n = 1.4$  in z-Richtung verlängert erscheint. Die negativen Minima sind völlig verschwunden. Die Aufnahmegerometrie ist zwar komplizierter als bei der einfachen Kippung um eine einzige Achse (Fig. 19), sie sollte aber beherrschbar sein. Wegen dieser überraschend günstigen Bildpunktgestalt haben wir Experimente aufgegeben, den flächenförmigen Objektträger in der Elektronenmikroskopie durch Nadeln (Whisker) zu ersetzen<sup>[80]</sup> und damit zu einer Art „Drehmolekülverfahren“ mit kugelähnlichen Bildpunkten vorzustoßen. Es wäre damit trotz unbestreitbarer theoretischer Vorteile eine Änderung der gesamten Präparationstechnik in der Elektronenmikroskopie verbunden gewesen. Die dreidimensionale Mikroskopie sollte sich aber „nahtlos“ an die konventionelle Mikroskopie anschließen.

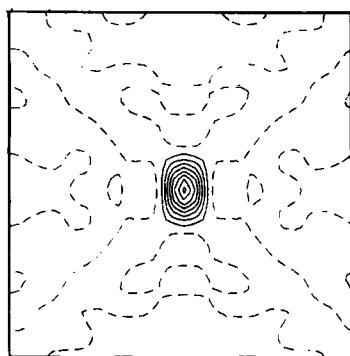


Fig. 21. Bildpunkt bei konischer Kippung. Wird der Primärstrahl auf dem Mantel eines Konus geführt (was in der Geometrie der zirkulären Tomographie entspricht, vgl. Fig. 15 und [49]), so läßt sich mit einem modifizierten Rekonstruktionsprogramm [78b] ein Bildpunkt ableiten, der zwar in z-Richtung verlängert ist, der aber in der x,y-Ebene kreisförmig erscheint (man denke sich die Figur um die z-Achse senkrecht zur Papierebene rotierend) und keine negativen Minima erzeugt. Wenn man also die z-Auflösung  $\Delta z$  geeignet wählt, hat man nicht mehr Probleme bei der Deutung, als wenn ein sphärischer Bildpunkt (Durchmesser  $\Delta z$ ) vorläge – die Anisotropie bewirkt dann sogar eine „Verkleinerung“ des Bildpunktes (in x,y-Richtung). Man beachte jedoch, daß bei gewissen „pathologischen“ Besetzungen des reziproken Raumes mit Strukturfaktoren (bei welchen diese hauptsächlich im nicht vermessenen blinden Gebiet des reziproken Raums liegen) Schwierigkeiten auftreten können. Bei asymmetrischen Strukturen sind solche Schwierigkeiten kaum zu befürchten.

### 3.5. Anwendung der dreidimensionalen Elektronenmikroskopie in der Strukturforschung an Ribosomen

Bei einer Auflösung von 2 nm zeigen kleinere biomolekulare Partikel – z. B. das TMV-Protein, Phagenproteine, Hüllproteine von sphärischen Virusmolekülen, Bakterienrhodopsin etc. (Größenordnung des Molekulargewichts 20 000) – auch in der dreidimensionalen Analyse nur wenige Einzelheiten (Größenordnung der Zahl der Bildpunkte 10). Die Situation ist anders, wenn man (asymmetrische) Partikel mit Molekulargewichten von einigen Millionen untersucht – man gelangt zu Strukturen, welche selbst bei dieser mäßigen Auflösung die Komplexität von kleineren Proteinen (Auflösung 0.2–0.3 nm) zeigen (mehr als 1000 Bildpunkte). Das sind Fälle, bei denen Projektionen mit Sicherheit undeutbar bleiben müssen.

Die erste echte dreidimensionale Untersuchung eines elektronenmikroskopischen Objekts wurde 1974 veröffentlicht<sup>[81]</sup>. Wie in Abschnitt 3.2.3 dargelegt, gelten für Untersuchungen mit Erzeugung der Projektionen durch Symmetriebetrachtungen gewisse Einschränkungen. Die erste

dreidimensionale Kristallstrukturuntersuchung (für welche diese Einschränkungen – abgesehen von der Mittelung über gleichartige Objekte – nicht gelten) wurde 1975 publiziert<sup>[65]</sup>. In Zusammenarbeit mit Lynen et al. in München haben wir die Struktur der Fettsäure-Synthetase ( $M_r \approx 2.3 \cdot 10^6$ ) aus Hefe untersucht<sup>[81]</sup>. Unsere Experimentiertechnik war zunächst noch sehr unvollkommen ( $\alpha = \pm 45^\circ$ ,  $\Delta\alpha = 10^\circ$ ), auch war die Gesamtdosis höher als die Aufnahmedosis (noch keine Minimaldosistechnik). Später haben wir uns, angeregt durch Arbeiten zur Markentriangulationsmethode (vgl. [69]), der Strukturanalyse von Ribosomen zugewendet (bei Ribosomen aus *E. coli*  $M_r \approx 2.7 \cdot 10^6$ ). Es war kein Zufall, daß wir die ersten Untersuchungen in dem neuen Gebiet der individuellen Analyse nicht an echt aperiodischen Strukturen durchführten<sup>[\*]</sup>, sondern an chemisch reproduzierbaren, wenn auch sehr großen Partikeln, die auch mit kristallographischen Methoden untersucht werden könnten. Die identische chemische Struktur ermöglicht Vergleiche der Reaktionsprodukte – in Abhängigkeit von Präparationsbedingungen wie Orientierung zur Unterlagsfolie etc. Im Falle der Ribosomen ist ferner der stark ionische Charakter der Protein-RNA-Komplexe interessant, der auch Kontrastierungen von Struktureinzelheiten im Innern der Partikel vermuten läßt (Positivfärbung). Vor allem handelt es sich bei den Ribosomen um biologisch sehr wichtige, in allen Lebewesen auftretende molekulare Gebilde, an welchen die Synthese von Proteinen abläuft. Sie sind nicht nur hochdifferenziert in ihrer (völlig asymmetrischen) Struktur, sondern auch hochdifferenziert in ihrer Funktion. Je nach Zelle (Prokaryonten, Eukaryonten) und funktioneller Zuordnung (Grundplasma, Mitochondrien) können sie beträchtliche Verschiedenheiten (z. B. in Molekülgröße und -form) zeigen, sind aber – wie insbesondere Sequenzanalysen der RNA-Stränge gezeigt haben – eng miteinander verwandt. In den letzten Jahren sind insbesondere Ribosomen aus *E. coli* intensiv chemisch untersucht worden – man kennt heute z. B. praktisch alle Sequenzen der ca. 50 (verschiedenen) ribosomalen Proteine. Charakteristisch ist die Fähigkeit des Ribosoms, nach seiner Segregation in die Einzelproteine und die Nucleinsäurestrände wieder zum intakten und aktiven Ribosom zu aggregieren, eine Fähigkeit, welche in den Markentriangulationsuntersuchungen zur Bestimmung der nativen Proteintopologie ausgenutzt wird (vgl. [69]). Die Ribosomen lassen sich leicht in zwei verschieden große Untereinheiten trennen: 30S- und 50S-Untereinheiten<sup>[\*\*]</sup> bei Prokaryonten, 40S- und 60S-Untereinheiten bei Eukaryonten. Es liegt nahe, diese Untereinheiten zunächst getrennt zu untersuchen.

#### 3.5.1. Konventionelle Elektronenmikroskopie an Ribosomen

Wegen der Größe der Partikel und ihrer relativen Stabilität gegenüber Präparationsverfahren mit Kontrastierung wurden sie bereits früh elektronenmikroskopisch untersucht – sie wurden sogar auf diese Weise entdeckt. Aber es gibt wohl kaum ein Objekt, bei dem die Grenzen der konventionellen Elektronenmikroskopie so drastisch spür-

[\*] Ausnahmen sind Versuche zur Analyse der Komplementwirkung an Vesikeln [91] und vorläufige Hochauflösungsuntersuchungen an amorphen Kohlenstoff [92].

[\*\*] Klassifikation nach der Sedimentationskonstante in der Ultrazentrifuge.

bar werden wie bei Ribosomen – trotz oder vielleicht gerade wegen der raffinierten Versuche, strukturelle Merkmale immunologisch oder mit anderen Markern zu charakterisieren. Es liegt nicht nur an ihrer Größe, sondern auch am völligen Fehlen von Symmetrien, daß man – im Gegensatz zu den etwa gleich großen sphärischen Viren (mit denen die microsomalen Partikeln zuerst verglichen wurden) – keine Strukturgesetze finden konnte und bestenfalls den Umriß der Partikeln erkannte. Umgebung und Partikeln sind von einer allgemeinen Granulation („Strukturrauschen“) überdeckt (vgl. Fig. 22 und 23). Erst vor kurzem fand man (lange nach Beginn unserer Untersuchungen) definierte Strukturen im Innern der Partikeln durch Mittelung über Bilder gleich orientierter Partikeln<sup>[82, 83]</sup>, die natürlich als Projektionen dicker Körper wenig aussagen können<sup>[\*]</sup>. Selbst das einfach erscheinende Problem der Formbestimmung fand keine befriedigende Lösung. Man versuchte dreidimensionale Körper zu „erfinden“, welche – in verschiedene Richtungen projiziert – die verschiedenen, in Mikroaufnahmen auftretenden Molekülbilder erklären sollten. Wenn man so will, hat man es hier mit einer primitiven Form der dreidimensionalen Analyse aus Projektionen zu tun. Freilich ist die Zahl der Projektionen außerordentlich gering (Größenordnung 5), und es sind ihre gegenseitigen Winkel unbekannt. Ferner ist es völlig unklar, ob mit der Präparation in verschiedenen Orientierungen Strukturänderungen verbunden sind. Es ist verständlich, daß in verschiedenen Laboratorien verschiedene Modelle gefunden wurden.

Partikeln notwendig. Bei dem heutigen Primat von Mittelungsmethoden in der Elektronenmikroskopie scheint das eine große Einschränkung zu bedeuten. Aber das trifft nicht zu. Bei Vergleichen von Strukturen (im allgemeinen Sinne) kommt es nicht nur auf die Zahl der Strukturen, sondern auch auf die Zahl von strukturellen Merkmalen an. Ein klassisches Beispiel ist der „Fingerabdruck“ in der Kriminalistik. Bereits ein Vergleich von zwei Abdrücken genügt, um Identität nachzuweisen. Gerade bei dreidimensionalen Analysen von Ribosomen ist die Anzahl von charakteristischen Merkmalen groß (entsprechend des Volumens der Partikel) und somit die Aussagegenauigkeit beträchtlich. Natürlich ist erforderlich, daß die Dosis so hoch gewählt wird, daß die elektronenstatistische Genauigkeit ausreicht, um die Einzelheiten signifikant zu erkennen. Wir arbeiten mit Dosen von ca.  $1.5 \cdot 10^5$  e/nm<sup>2</sup> – das ist um etwa den Faktor Tausend mehr als bei der Analyse nativer Kristalle. Man kann die Ergebnisse ähnlich wie in der Kristallographie quantitativ in Schichtlinienkarten der einzelnen Schnitte darstellen. Wir haben den Schichtlinienabstand so gewählt, daß er dem Doppelten bis Dreifachen der elektronenstatistischen Standardabweichung entspricht – Unterschiede zwischen Rekonstruktionen verschiedener Partikeln sind also sicherlich kein Rauschen, sondern chemisch (und strahlenchemisch) bedingt. Um zu prüfen, ob während einer Serie keine wesentlichen Änderungen auftreten, exponieren wir eine „Strahlenschädigungsreihe“ unter gleichen Bedingungen, aber ohne Kippung (natürlich an einer anderen Präparatstelle). Das mathematische Maß der Ähnlichkeit zweier Bilder ist der Kreuzkorrelationskoeffizient  $C_k$ <sup>[\*\*]</sup>. Wir überprüfen mit Kreuzkorrelation, visueller Betrachtung und Differenzbildung die Konstanz der Bilder in der Strahlenschädigungsreihe. Natürlich ist die organische Substanz schon bei der ersten Aufnahme völlig zerstört – ihr Skelett ist aber sehr stabil gegen weitere Bestrahlung; über kleinere Änderungen mittelt (wie die Theorie zeigt) das Rekonstruktionsverfahren. Allerdings setzt bei einer Dosis von ca.  $10^5$  e/nm<sup>2</sup> langsam Rekrystallisation des Kontrastierungsmittels ein<sup>[51, 84]</sup>, diese Dosis sollte deshalb nicht wesentlich überschritten werden. Da unsere Experimente unter Minimaldosisbedingungen vorgenommen werden, tritt keine zusätzliche Belastung durch Einstellprozesse auf.

Unsere Rekonstruktionen<sup>[85]</sup> betrafen mit Uranylsalzen kontrastierte 30S- und 50S-Untereinheiten von *E. coli* in verschiedenen Orientierungen. Untersucht wurden 3–5 Partikeln in jeder Orientierung. Ein einfacher Trick ermöglicht es zu vermeiden, daß für jede Partikel eine eigene Kippserie angefertigt werden muß. Bei Wahl entsprechender Präparationsbedingungen werden relativ viele Partikelprojektionen auf einer Mikroaufnahme (Vergrößerung ca. 80 000) abgebildet (ca. 500). Diese Bilder zeigen verschiedene „Erscheinungsformen“, deren Unterschiede auf ver-

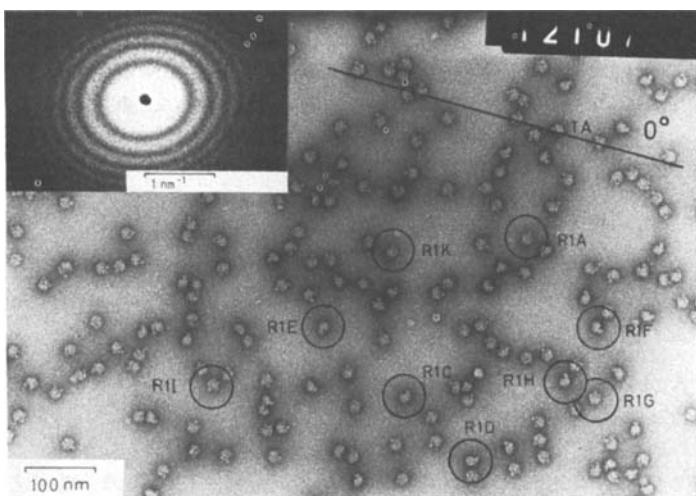


Fig. 22. Eine der 21 Aufnahmen (Kippung 0°) aus der Serie von +60° bis –60° (–60°-Aufnahme wegen Drift verworfen) mit dem Winkelinkrement von 6°. Ribosomale 50S-Untereinheiten von *E. coli* ohne den L7- und L12-Stengel. Vergrößerung 80000fach, mittlere Defokussierung  $\Delta z = 827$  nm, axiale Defokussierungsdifferenz  $dz = 386$  nm, Dosis  $\approx 7 \cdot 10^3$  e/nm<sup>2</sup>. Rekonstruierte Partikeln markiert, Richtung der Kippachse eingezzeichnet.

### 3.5.2. Dreidimensionale Analysen kontrastierter ribosomaler Partikeln

Der große experimentelle Aufwand macht bei diesen Objekten<sup>[\*]</sup> eine Beschränkung der Analyse auf wenige

[\*] Die experimentelle Mittelung in [82] stimmt mit der Projektion unseres 3D-Modells recht gut überein.

[\*\*] Wir danken Dr. M. Stöffler-Meilicke, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, für Präparationen von ribosomalen Partikeln und Ribosomen aus *E. coli*.

[\*]  $C_k = C_{12} / \sqrt{C_{11} C_{22}}$ .  $C_{12}$  ist die Höhe des Kreuzkorrelationsmaximums,  $C_{11}$  und  $C_{22}$  sind die Höhen der Autokorrelationsmaxima der verglichenen Strukturen. Unter der Annahme, daß das Kreuzkorrelationsmaximum im Nullpunkt liegt (daß also beide Bilder durch Korrelation genau ausgerichtet wurden), ergibt sich  $C_{12}$  als Integral über die Produkte der Dichten beider Bilder.  $C_{11}$  und  $C_{22}$  entsprechen dem Integral über die Quadrate der Dichten der Einzelbilder. Bei Gleichheit beider Bilder ist  $C_k = 1$ , bei unterschiedlichen Bildern nimmt  $C_k$  ab. Bei zwei Zufallsstrukturen ist  $C_k = 0$ .

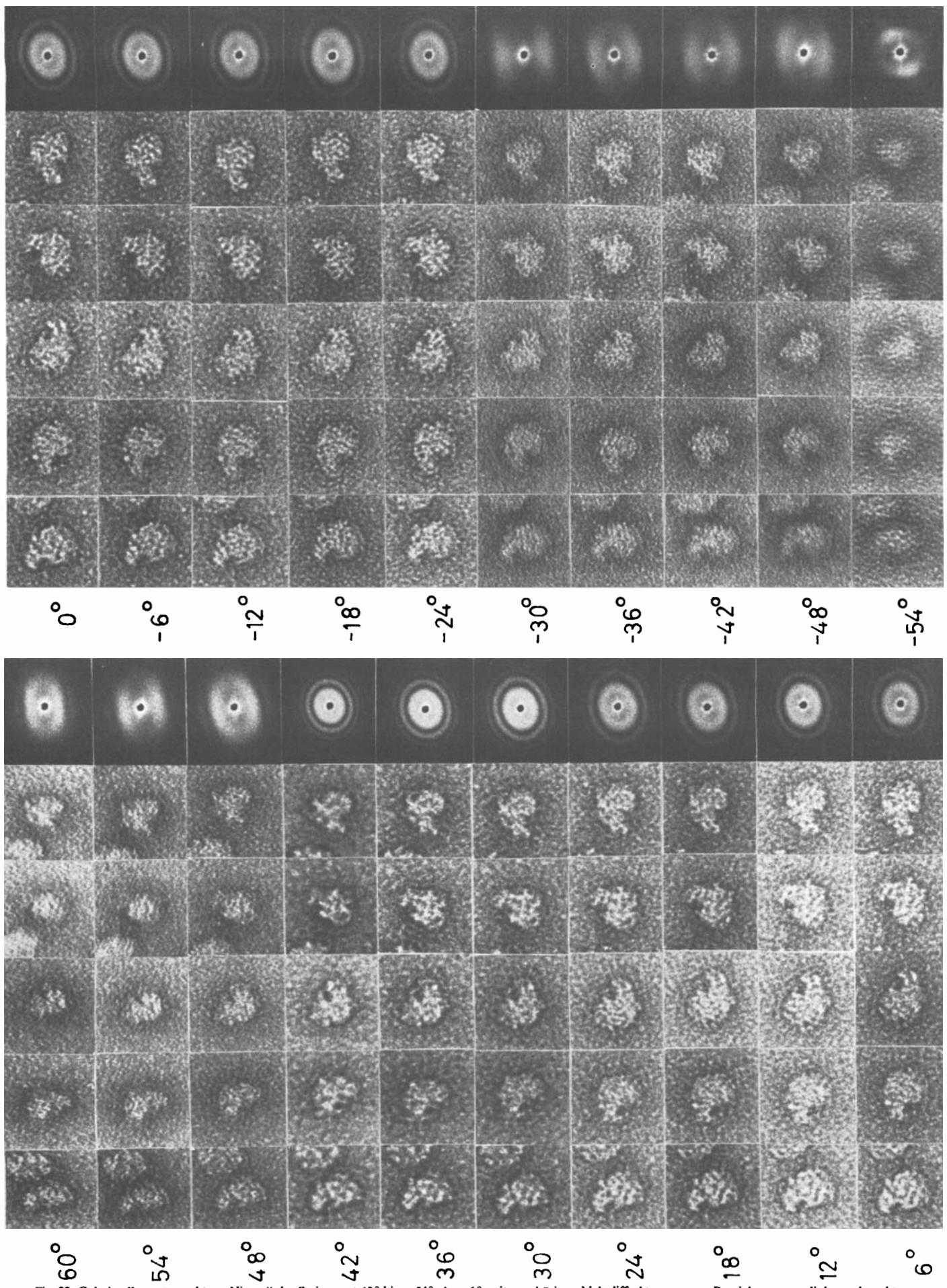


Fig. 23. Galerie aller untersuchten „Nieren“ der Serie  $\alpha = +60^\circ$  bis  $-54^\circ$ ,  $\Delta\alpha = 6^\circ$ , mit zugehörigen Lichtdiffraktogrammen. Bezeichnung von links nach rechts: RID, RIC, RIE, RIF, RIH (vgl. Fig. 22).

schiedene Orientierungen und auf Präparationseinfüsse zurückzuführen sind. Dabei treten häufig besonders charakteristische und im Umriß ähnliche Formen auf, welche der Elektronenmikroskopiker – wie schon erwähnt – als verschiedene Projektionen eines dreidimensionalen Körpers deutet. Sie werden in der Literatur mit verschiedenen Namen – z. B. asymmetrische und symmetrische Form bei 30S-Untereinheiten, Nieren- und Kronenform bei 50S-Untereinheiten – bezeichnet. Bei der Kippserie wird nun auf jeder Teilaufnahme etwa die gleiche Anzahl von Ribosomen abgebildet, so daß das dreidimensional untersuchte Präparat eigentlich eine Population von Ribosomen ist. Aus ihr werden nachträglich die zu rekonstruierenden Einzelpartikelbilder ausgewählt und in einem automatischen Densitometer gemessen. Man beachte die gewaltige Informationskapazität der Photoplatte, die es schwer machen wird, sie elektronisch zu ersetzen. Bei dem meist von uns verwendeten  $20\text{ }\mu\text{m}$ -Abtastraster (Durchmesser der Sondenfläche  $0.25\text{ nm}$  bei einer Vergrößerung von  $80000^{\times}$ ) enthält eine  $6 \times 9\text{ cm}^2$ -Photoplate  $13.5 \cdot 10^6$  Bildelemente, eine Serie mit 20 Aufnahmen  $2.7 \cdot 10^8$  Bildelemente! Von dieser Information wird nur ein winziger Bruchteil ausgenutzt. Bei größeren Kippwinkeln ändert sich die Defokussierung im Präparat beträchtlich. Da sie aber rechnerisch bestimmt und korrigiert wird, spielt das keine Rolle. Aus dem gleichen Grund ist es auch gleichgültig, wenn der Fokus an der Referenzstelle (bei der er eingestellt wird und die mehrere Mikrometer von der Aufnahmestelle entfernt ist) wegen mechanischer Ungenauigkeiten oder wegen der nicht völlig ebenen Präparafläche etwas variiert.

Figur 22 zeigt eine  $0^\circ$ -Aufnahme aus einer Serie von 21 Aufnahmen einer mit Uranylformiat kontrastierten Population von 50S-Untereinheiten (z-Auflösung  $2\text{ nm}$ ), die so präpariert wurden, daß zwei von den 34 Proteinen der Untereinheit (L7 und L12) abgetrennt wurden. Diese Proteine – im chemischen Aufbau nahe verwandt und in insgesamt bis zu vier Kopien vorhanden – befinden sich, wie vergleichende konventionelle Untersuchungen gezeigt hatten, in einer seitlichen stäbchenförmigen Ausbuchtung („Stengel“, engl. „stalk“) der Untereinheit. Wir haben parallel 50S-Untereinheiten mit und ohne Stengel untersucht, da uns interessierte, wie dieser chemische Eingriff die innere Struktur der Untereinheit beeinflußt. Wie schon erwähnt, sind künstliche und natürliche Modifikationen der Ribosomenstruktur verschiedenster Art charakteristisch für die Ribosomenchemie – wir haben es hier mit einem einfachen Modellfall zu tun. In der Aufnahme sind die ausgewählten Partikeln zweier Orientierungen (Nieren R1C, R1D, R1E, R1F, R1H, Kronen R1A, R1G, R1I, R1K) markiert. Figur 23 zeigt eine Galerie aller Kippaufnahmen von fünf ausgewählten „Nieren“ mit den zugehörigen Lichtdiffraktogrammen. Die Aufnahmen weisen so starke und so zufällig erscheinende Unterschiede auf, daß man die experimentellen Unterlagen geradezu als obskur ansehen könnte. Das ist aber falsch – es ist im Gegenteil bewundernswert, wie genau die Elektronenoptik zeichnet, wenn ihre Unregelmäßigkeiten korrigiert werden. Man mag die Bilder vielleicht

[\*] Nach Fourier-Prinzipien dürfen die Abtastelemente höchstens den halben Durchmesser der Auflösungselemente haben. Mit dieser Rastereinteilung kann man also Aufnahmen bis  $0.5\text{ nm}$  Auflösung verarbeiten, so daß bei der erforderlichen Rekonstruktionsauflösung von ca.  $1.0\text{ nm}$  (in der x,y-Ebene) genügend Sicherheit gegeben ist.

mit Projektionen von Früchten vergleichen, welche aus feuchter und lehmiger Erde ausgebuddelt wurden und die wie zufällig geformte Erdklumpen erscheinen, aber im Innern hochgeordnet sind.

Generell ist festzustellen, daß Partikeln in gleichen Orientierungen Strukturen haben, die zwar in Einzelheiten etwas differieren (verschiedene Färbungs- und Strahleneinwirkung), welche aber gerade auch in ihren allgemeinen Maßverhältnissen überraschend reproduzierbar sind. Sie lassen sich auch zu einer gut aufgelösten Mittelstruktur überlagern, wobei allerdings eine Korrektur der leicht verschiedenen Orientierungen durch aufwendige dreidimensionale Korrelationsverfahren erforderlich wird. Hingegen zeigen die Strukturen verschieden orientierter Partikeln beträchtliche Unterschiede; die naheliegende Vermutung, daß sich die Partikeln durch Oberflächenkräfte beim Eintröcknen stark abplatten, hat sich glücklicherweise nicht bestätigt (vgl. dazu [86]). Das Kontrastierungsmittel bildet einen Ring um die Partikel (vgl. z. B. Fig. 24), wobei vor allem bei dickeren Präparaten (z. B. bei Hochkantlagen) die Kontrastierungsintensität im Innern der Partikel von oben nach unten variiert. Am stärksten sind die Mittelschichten gefärbt. Alle Partikeln zeigen kontrastierte kanalähnliche Bereiche im Innern – die Vermutung liegt nahe, daß es sich zumindest zum großen Teil um positiv kontrastierte RNA handelt. Man beachte, daß in den Rekonstruktionen die Gebiete hoher Streudichte negativ dargestellt sind. Wegen der Normierung (Phasenkontrast!) erscheinen Gebiete schwachen Streuvermögens in allen Rekonstruktionen positiv, wobei positive Maxima Gebieten mit besonders niedrigem Streuvermögen entsprechen! Wir haben bisher die 50S-Untereinheiten genauer untersucht, da bei ihrer Kompattheit drastische Formänderungen nicht wahrscheinlich sind – bei der 30S-Untereinheit sehen wir Anzeichen für nicht unbeträchtliche orientierungsabhängige Formänderungen.

Es ist natürlich nicht möglich, in einem Fortschrittsbericht alle Details aus diesen komplizierten Untersuchungen vorzuführen. Wir zeigen in Figur 25 je einen Schnitt

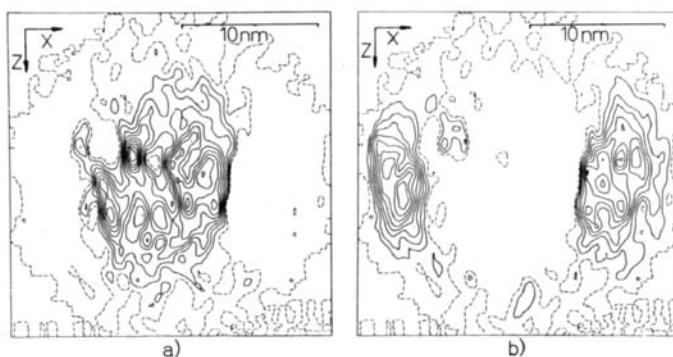


Fig. 24. „Um die Ecke sehen“ in der dreidimensionalen Elektronenmikroskopie. Bei einem dreidimensionalen Körper lassen sich in beliebigen Richtungen Projektionen berechnen, die auch „Aufnahmen“ entsprechen können, welche wegen der Aufnahmegerometrie nicht zugänglich wären. Gezeigt ist eine Projektion der aus R1C, R1D, R1E, R1F (vgl. Fig. 22) gemittelten „Niere“ in Richtung der y-Achse: a) positive Bereiche, b) negative Bereiche. Man beachte in a) eine allgemeine Kontrastabnahme von der Mittelebene nach oben und unten, die der Kontrastabnahme in den Schichten entspricht. Dennoch ist die Abgrenzung der Partikel oben und unten zu erkennen, da sich die verschiedenen strukturierten Folien unterhalb und oberhalb der Partikel bereits ausmachen (die Projektionen der Folien erscheinen mit geringerem Kontrast). In b) fällt vor allem die Projektion des ringförmigen Kontrastmittelbereiches auf. Daß der Partikelbereich „positiver“ erscheint als die Umgebung, ist durch die Normierung bedingt, die das Gesamtintegral aus positiven Dichten dem Integral der negativen Dichten gleichsetzt.

durch vier kontrastierte 50S-Partikeln in Kronenform (nach Korrelation der Orientierung). Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Schichtlinien der nicht-kontrastierten Struktur – die kanalartige kontrastierte Struktur erscheint daher weiß. Um die Vergleiche zu erleichtern, haben wir gemeinsame negative Bereiche durch „Führungspunkte“ gekennzeichnet – sie sind auch im Mittelstrukturschnitt AV2 enthalten. Nach Korrelation liegen die dreidimensionalen Kreuzkorrelationskoeffizienten zwischen 0.25 und 0.3. Eigentlich sind ihre Werte überraschend gering, wenn man die doch recht ausgeprägten Ähnlichkeiten in Figur 25 betrachtet. Der Grund liegt in der großen Empfindlichkeit des Kreuzkorrelationskoeffizienten gegen *alle* individuellen Änderungen. Wir können aber versuchen, nach Prinzipien der Mustererkennung die grundsätzliche strukturelle Information – hier also die spezielle kanalartige Färbung – herauszuarbeiten und zu vergleichen. Hierbei kann man zwei Stufen unterscheiden. In der ersten Stufe verlangt man gleiche Maßverhältnisse (lässt also keine Verzerrungen zu), möchte aber von Einzelheiten wie z. B. Intensität und Struktur in den gefärbten Bereichen oder im Bereich der Leichtatomstruktur abstrahieren. Eine Möglichkeit bietet dazu das Führungspunkt-Konzept. Ordnet man in jeder Einzelstruktur Führungs-

punkte in den negativen Bereichen im ungefähren Auflösungsabstand an, so erhält man bei Fourier-Darstellung mit 1.5 nm Auflösung (bei welcher die Punkte verschmiert werden)<sup>[87]</sup> ein schlauchartiges Modell der kontrastierten Struktur. Figur 25 (AV2) zeigt einen Schnitt. Man kann nun die aus den verschiedenen Strukturen exzerpierten Modelle miteinander korrelieren und gelangt zu (dreidimensionalen) Korrelationskoeffizienten zwischen 0.6 und 0.7 – ein deutliches Zeichen, wie sehr analog die Strukturen der abgebildeten Einzelpartikeln wirklich sind. Es soll nicht verschwiegen werden, daß die einfachste Methode der Modellbildung (bei Fehlen von großräumigen Verzerrungen) eigentlich eine Mittelbildung über genügend Einzelstrukturen wäre – nur ist dieses Verfahren recht aufwendig.

Genau die gleiche Analyse wurde mit 50S-Untereinheiten mit dem Stengel L7, L12 durchgeführt. Es kann nur als überraschend bezeichnet werden, wie genau die Mittelstruktur aus vier Untereinheiten „mit Stengel“ AV3 mit der Mittelstruktur „ohne Stengel“ AV2 übereinstimmt (Fig. 26) – der Korrelationskoeffizient  $C_k$  beträgt ca. 0.5. Wie Figur 26 zeigt, ist die aus AV2 und AV3 gemittelte Struktur AV4 (der Stengel wurde bei diesen Vergleichen rechnerisch abgeschnitten) nur noch wenig verschieden von AV2 und

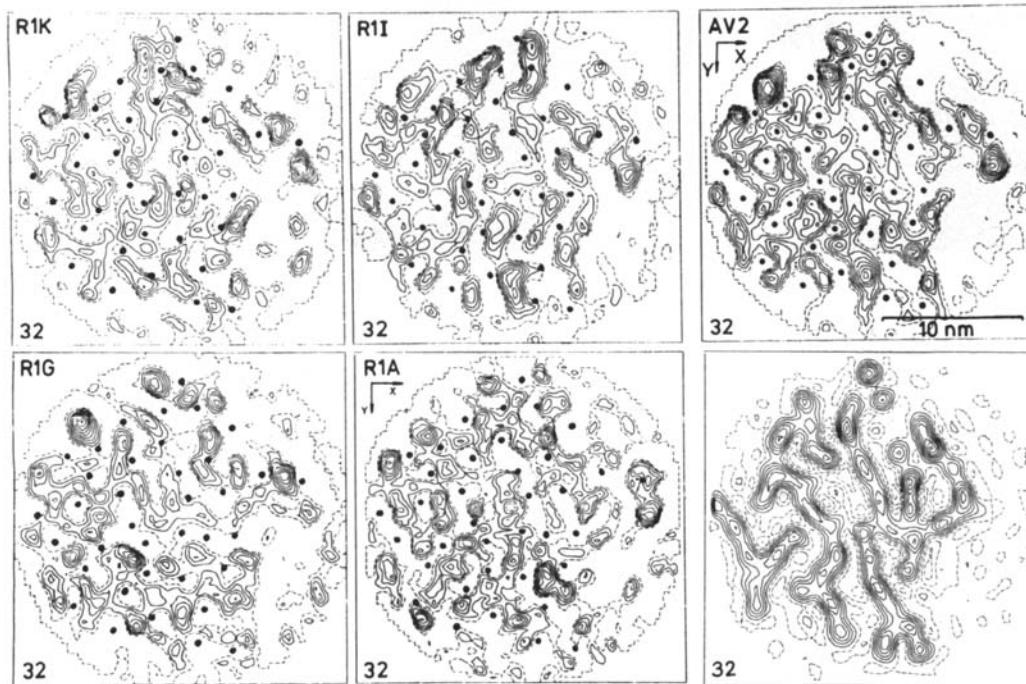


Fig. 25. Analyse der Kronenform ribosomaler 50S-Partikeln (ohne Stengel). Der Rekonstruktionskörper ist ein Zylinder (Erstreckung entlang der Kippachse (y)) mit einem Durchmesser von  $D = 23.8$  nm und einer Länge von  $L = 23.8$  nm. Er ist unterteilt in kubische Rasterelemente der Kantenlänge  $D/64 = 0.37$  nm. Die Auflösung ist  $\Delta x = 1.3$  nm,  $\Delta z = 2.0$  nm.  $\Delta y$  ist gleich der mittleren elektronenoptischen Auflösung, die in den Aufnahmen zwischen 0.7 und 1 nm schwankt (als Richtwert nehmen wir  $\Delta y = 1$  nm an). Man kann den Rekonstruktionskörper in beliebigen Orientierungen in Schichten zerschneiden und erhält z. B. 64 x,y-Schichten senkrecht zur optischen Achse (z-Achse). Zum Vergleich muß man freilich die einzelnen Partikeln in Lage und Orientierung dreidimensional miteinander korrelieren. Der Vergleich zeigt in allen Schichten überraschend starke Ähnlichkeiten. Als Beispiele sind die mittleren Schnitte (Nr. 32) der „Kronen“ R1A, R1G, R1I, R1K gezeigt. Wie schon bei Fig. 24 erläutert, entsprechen negative Gebiete Strukturelementen hohen Streuvermögens, im besonderen kontrastierten Strukturen. Die Verwendung der Null-Linie zur Charakterisierung der Trennung schwach kontrastierter Strukturen (Leichtatomstrukturen, positiv) von stark kontrastierten Strukturen (Schweratomstrukturen, negativ) ist etwas willkürlich. Die Schichtlinien in den negativen Gebieten sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Um den Vergleich zu erleichtern, sind gemeinsame negative Bereiche der einzelnen Partikeln durch Führungspunkte gekennzeichnet. Die gemittelte Struktur AV2 hat praktisch die gleiche Auflösung (nur geringe Verzerrungen der Partikel!) und zeigt nun noch klarer die kanalähnlichen negativen Bereiche; zusätzlich ist unterhalb des Schnittes 32 von AV2 der Schnitt 32 eines „Modells“ der Struktur von AV2 gezeigt, das durch Besetzung der negativen Bereiche mit Punkten im Abstand von 2 nm entsteht. Wenn dieses Modell mit einer Auflösung von 2 nm abgebildet wird, entstehen schlauchähnliche Gebilde, da benachbarte Punktilder miteinander verschmelzen (vgl. Abbildung). Man beachte, daß im Modell die kontrastierten Gebiete positiv (nicht negativ wie in den Schichtlinienkarten) gezeichnet sind! Analoge Modelle der Einzelpartikeln haben untereinander Kreuzkorrelationskoeffizienten von  $\approx 0.7$  (statt 0.25–0.3).

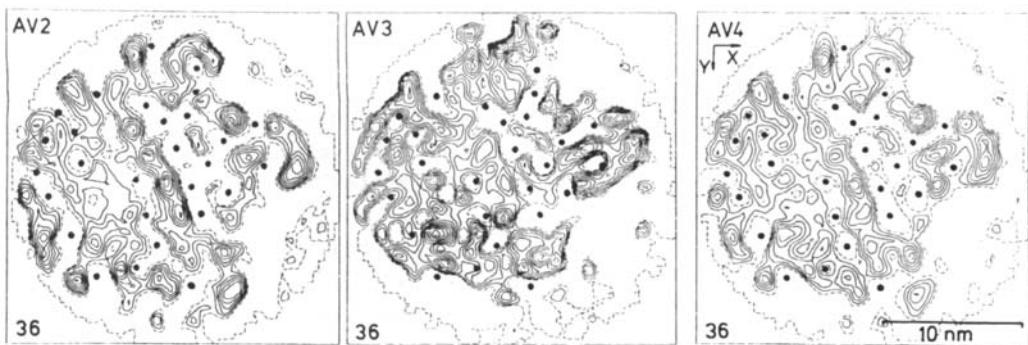


Fig. 26. Vergleich der Mittelstrukturen von je vier 50S-Untereinheiten „ohne L7- und L12-Stengel“ (AV2) und „mit L7- und L12-Stengel“ (AV3) (Schnitte Nr. 36). In AV3 ist der Stengel mathematisch abgeschnitten. Der Rekonstruktionskörper von AV3 wurde nachträglich auf die Größe des Rekonstruktionskörpers von AV2 verkleinert; der Korrelationskoeffizient zwischen AV2 und AV3 beträgt  $\approx 0.5$ . Die aus AV2 und AV3 gemittelte Struktur AV4 ist AV2 und AV3 sehr ähnlich.

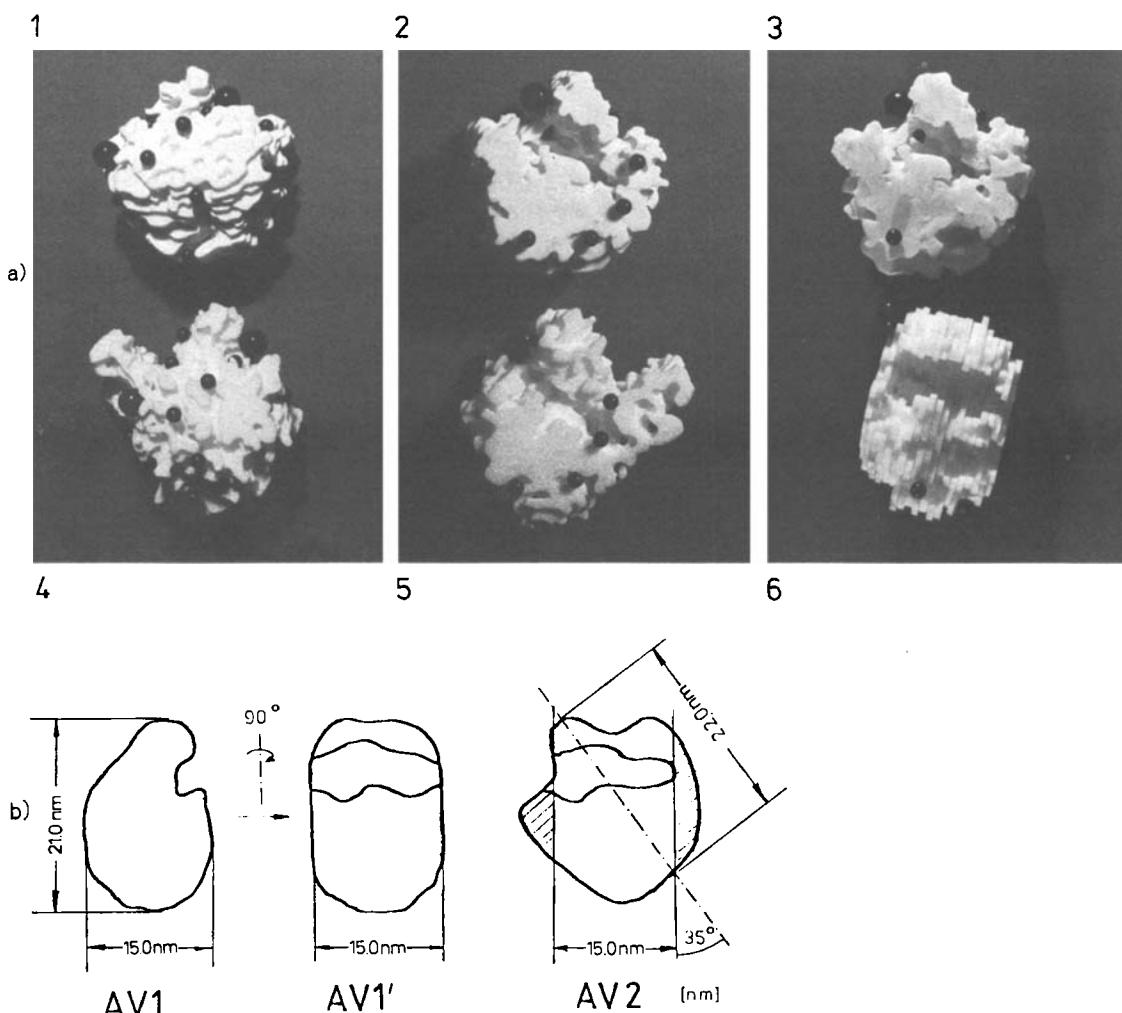


Fig. 27. a) Vergleich der Modelle der 50S-Untereinheit (Kronenorientierung) ohne Stengel [von oben (1) und von unten (2) photographiert] und der 50S-Untereinheit (Kronenorientierung) mit Stengel [von oben (4) und von unten (5) photographiert]; Vergleich des Modells der „Krone“ [ohne Stengel (3)] mit dem der „Niere“ [ohne Stengel (6)]. Wegen des geringen Kontrastes der obersten und untersten Schichten sind diese im Modell der „Niere“ nicht wiedergegeben. Die kleinen und großen schwarzen Punkte kennzeichnen Gebiete, wo Kanäle die Oberfläche durchstoßen. Regionen, die durch große schwarze Punkte markiert sind, entsprechen Regionen, in welchen die RNA nach früheren konventionellen Aufnahmen (unter Markierung mit entsprechenden Effektoren) an die Oberfläche tritt. b) Schematische Darstellung der gegenseitigen Orientierung von „Niere“ und „Krone“ (Mittelstrukturen AV1 und AV2, vgl. Fig. 25 und 26). AV1 zeigt die Orientierung auf der Folie; bei Drehung um  $90^\circ$  um die Längssachse erhält man AV1'. Die Längssachse von AV1' ist um ca.  $35^\circ$  gegen die Längssachse von AV2 gekippt. Oben und unten liegende Gebiete sind in der nur schwach kontrastierten „Niere“ nicht gut erkennbar, deshalb im Modell nicht gezeigt.

**AV3.** Das chemische Abschneiden des Stengels berührt also die Reststruktur überhaupt nicht. Diese beiden Analysen können übrigens als vorzüglicher Konsistenztest der Methode aufgefaßt werden: Es handelt sich um chemisch verschiedenartige, elektronenmikroskopisch verschiedene

Präparate und – nicht zuletzt – um Analysen in sehr verschiedenen Defokussierungsbereichen<sup>[\*]</sup>. In den nächsten

[\*] Die zweite Analyse wurde in der Nähe des Scherzer-Fokus vorgenommen. Die damit verbundene Schwächung der niederen Ortsfrequenzen bewirkte eine Verringerung des Allgemeinkontrastes der Aufnahmen.

Analysenschritten wurde nun versucht, „Kronen“ und „Nieren“ miteinander zu vergleichen. Für die Rechnungen wurden Schlauchmodelle herangezogen, da sie einen gleichmäßig erfüllten reziproken Raum (ohne blinde Bereiche) besitzen, was eine wichtige Voraussetzung für eine gute Korrelation bei großen Winkelunterschieden ist. Die Korrelation konvergierte recht gut, allerdings konnte nur ein Kreuzkorrelationskoeffizient von  $C_k = 0.26$  erreicht werden, ein deutliches Zeichen, wie sehr die Präparationsbedingungen die Struktur beeinflussen. Wie schon öfters erwähnt, sollte man also nicht von der Struktur der Ribosomen, sondern von Reaktionsproduktstrukturen sprechen. Dennoch ist die allgemeine Verformung so gering, daß die Form aus der Kombination beider Ergebnisse abgeleitet werden kann. Bei einer Rekonstruktion von „Krone“ oder „Niere“ allein grenzt die Partikel nur seitlich an Kontrastierungsmittel, so daß die Abgrenzung nach unten (zur Unterlagsfolie) und bei Sandwichpräparaten (wie im vorliegenden Fall) auch nach oben Schwierigkeiten bereitet (Fig. 27).

### 3.5.3. Die Struktur der Uranyl-kontrastierten ribosomalen 50S-Untereinheit aus *E. coli* in Kronenform

Aus unseren Untersuchungen wird deutlich, daß die 50S-Partikel in Kronenform besonders gut strukturell abgebildet ist. Sie liegt flach auf der Unterlage, ist gut durchfärbt und gegen das Kontrastierungsmittel gut abgrenzbar. Es liegt ferner eine Mittelstruktur aus acht Partikeln (AV3) vor, wobei die Untersuchungen gezeigt haben, daß die Änderungen der Innenstruktur bei Präparationen mit und ohne Stengel vernachlässigbar klein sind. Da sich die zufälligen Strukturen der Unterlagsfolien bei der Mittelung über acht Partikeln bereits gut ausmitteln<sup>[\*]</sup>, ist die Abgrenzung nach „unten“ und nach „oben“ recht gut zu erkennen (wenn auch ihre Bestätigung durch die Nierenstruktur sehr wertvoll ist). Man kann nun Kreuzkorrelationskoeffizienten in verschiedenen Mittelungskombinationen berechnen, welche mit den statistischen Erwartungen gut übereinstimmen. Besonders interessant ist der Kreuzkorrelationskoeffizient mit der (extrapolierten) Mittelungsstruktur über „unendlich“ viele Partikeln, der mit  $C_k = 0.8$  so groß ist, daß nur noch geringe Unterschiede gegenüber der aus unendlich vielen Partikeln bestimmten Struktur zu erwarten sind. Das bedeutet aber, daß praktisch die gleichen Resultate wie bei einem hypothetischen „Kristall“ vorliegen. Dabei sind zusätzlich die Verwacklungen der Partikeln gegenüber der z-Richtung (ca. 3–4°) berücksichtigt, welche bei einer Kristallanalyse nicht korri-

[\*] Wenn der Kreuzkorrelationskoeffizient für je zwei Partikeln gleich  $C_k$  ist und man annimmt, daß die Partikeln nur durch „weißes Rauschen“ gestört sind (keine Änderung der grobräumigen Struktur), so lassen sich die Korrelationskoeffizienten zwischen der Mittelstruktur aus  $n_1$  Partikeln und der Mittelstruktur aus  $n_2$  Partikeln berechnen:

$$C_{1,2} = C_k / \sqrt{\left[ C_k + \frac{1}{n_1} (1 - C_k) \right] \left[ C_k + \frac{1}{n_2} (1 - C_k) \right]}$$

Ist  $n_2$  gleich unendlich, folgt

$$C_{1,\infty} = \sqrt{C_k / C_k + \frac{1}{n_1} (1 - C_k)}$$

(Ich danke Dr. R. Henderson, Cambridge, für den Hinweis auf diese statistischen Beziehungen). Das quasistatistische Verhalten wurde durch Berechnung verschiedener experimenteller Mittelungen geprüft.

giert werden können. Figur 28 zeigt die Gesamtstruktur der Mittelpartikel.

### 3.5.4. Zur Strahlenschädigung bei ribosomalen Partikeln

In einer weiteren Untersuchung haben wir uns mit dem Problem des Strahleneinflusses etwas näher befaßt<sup>[88]</sup>. Wir hatten eine Kippserie von 30S-Untereinheiten mit 3° Winkelinkrement aufgenommen, welche eigentlich aus zwei um 3° gegeneinander verschwenkten 6°-Serien bestand. Damit war es möglich, nicht nur eine Rekonstruktion größerer Bereiche oder mit höherer Auflösung durchzuführen, sondern auch beide 6°-Serien (nach Korrektur der Verkipfung) zu vergleichen, um den Einfluß der Bestrahlung zu studieren<sup>[\*]</sup>. Allerdings war die Bestrahlung der zweiten Serie wesentlich größer, als wir es sonst tolerieren. Tatsächlich zeigt ein Vergleich Änderungen – der Kreuzkorrelationskoeffizient hat die Größenordnung  $C_k = 0.7$ . Die Rekonstruktionen zeigen, daß man vorsichtig bei Vergleich von feinen Einzelheiten sein muß, Migrationen von Schweratomen bei Bestrahlung treten auf<sup>[\*]</sup>. Wichtig (und eigentlich zu erwarten) ist, daß sich an der grobräumigen Struktur nichts ändert – Verzerrungen sind also sicherlich im Wesentlichen durch Präparation bedingt. Man beachte übrigens, daß selbst bei dieser Strahlenbelastung die Ähnlichkeit der beiden verschiedenen strahlenbelasteten Strukturen der gleichen Partikel größer ist als bei zwei verschiedenen Partikeln gleicher Orientierung.

### 3.5.5. Mustererkennung mit Berücksichtigung von Verzerrungen

Diese Untersuchungen beweisen, daß ribosomale 50S-Partikeln in Kronenform (das Gleiche gilt für die Nierenform) die gleichen grobräumigen Strukturen zeigen – sonst müßte bei der Mittelung eine drastische Reduktion der Auflösung eintreten. Sie erklären aber auch den Sprung des Kreuzkorrelationskoeffizienten zwischen einzelnen Partikeln von ca. 0.25 auf ca. 0.7, wenn man Mustererkennungen der ersten Art (keine Verzerrungen) vornimmt (vgl. Fig. 25). Besonders wertvoll sind die Ergebnisse für die Untersuchung von aperiodischen Strukturen, bei denen ja Mittelungen nicht möglich sind – es ist zu erwarten, daß das Resultat topologisch sinnvoll interpretiert werden kann. Interessant dürfte die Analyse der 30S-Struktur in verschiedenen Orientierungen mit solchen topologisch geglätteten Modellen werden, nachdem schon die Analyse von „Kronen“ und „Nieren“ deutlich topologische Unterschiede erkennen läßt. Man muß dann Mustererkennungsverfahren der zweiten Art ausarbeiten, welche – analog wie etwa bei Vergleich verschiedener Handschriften – auch Verzerrungen tolerieren. Sicherlich sind dann einfache Mittelungsprozesse nicht mehr ausreichend.

[\*] Gesamtdosis nach der ersten Serie  $9.6 \cdot 10^4$  e/nm<sup>2</sup>, nach der zweiten Serie  $20.1 \cdot 10^4$  e/nm<sup>2</sup>. Man beachte aber, daß die bei den Abbildungen wirksame Dosis im ersten Fall nur halb so groß ist wie die Gesamtdosis (gilt für alle Serien ohne Vorbelichtung), da die Teilbilder von verschiedenen lang bestrahlten Partikeln (die erste Aufnahme sogar von der unbestrahlten Partikel) herrühren (mittlere Belastung  $4.3 \cdot 10^4$  e/nm<sup>2</sup>). Bei der zweiten Serie ist diese Belastung wegen der Vorbelichtung etwa dreimal so groß wie bei der ersten Serie ( $14.7 \cdot 10^4$  e/nm<sup>2</sup>).

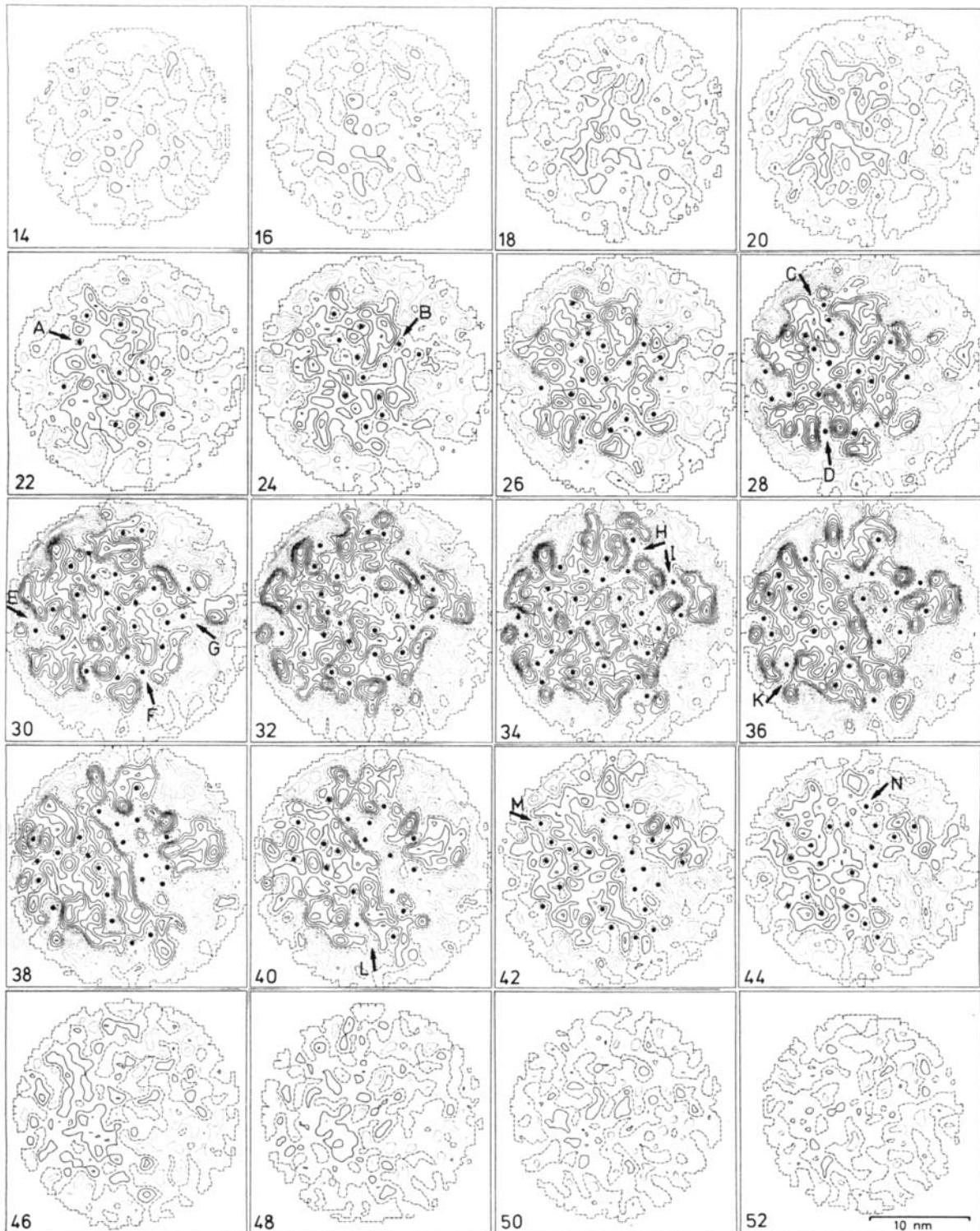


Fig. 28. Fast ein „künstlicher Kristall“ der Uranyl-kontrastierten ribosomalen 50S-Untereinheit aus *E. coli* in Kronenorientierung. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Partikeln (Dosis ca.  $10^5$  e/ $\text{nm}^2$ ) ist so vorzüglich, daß bereits eine Mittelung über 8 Partikeln einen Korrelationskoeffizient zur (hypothetischen) „Kristallstruktur“ von  $C_k = 0.8$  ergibt. Mittelungen über weitere beliebig viele Partikeln würden das Modell nur unwesentlich ändern. Darstellung der Struktur in 64 Schichten im Abstand von 0.4 nm; die geradzahligen Schichten von 14 bis 52 sind abgebildet (Null-Linie gestrichelt, positive Bereiche ausgezogen, negative Bereiche punktiert). Positive (negative) Schichtlinien bilden schwach (stark) streuende Gebiete ab, hohe positive Maxima entsprechen also besonders schwach streuenden Strukturteilen. Der Schichtlinienabstand ist beliebig, die Struktur entspricht aber in guter Näherung der durch den Bildpunkteinfluß verzerrten Potentialverteilung in den Partikeln. Auflösung in z-Richtung ca. 2 nm, in der x,y-Ebene 1 bis 1.5 nm. Merkmale: Kontrastierung in den einzelnen Schichten verschieden stark, in den Mittelschichten am stärksten. Die Partikel erstreckt sich ungefähr von Schicht 20 bis Schicht 46. Ab Schicht 22 bis Schicht 44 sind in den negativen Führungs punkten im Abstand von ca. 2 nm (in den Kanälen) eingezeichnet. Deren Abbildung in 2 nm Auflösung ergibt eine schlauchartige Modellstruktur (vgl. Fig. 25). Die Unterseite der Untereinheit ist relativ eben mit einer relativ eng begrenzten Furche, welche aber nicht die gesamte Partikel durchschneidet. Man beachte die starke Kontrastierung in der Furche. Schwächer kontrastiert ist die komplizierte Kanalstruktur im Innern, die im wesentlichen der ribosomalen RNA entsprechen sollte. Allerdings muß man bei der Deutung vorsichtig sein, da Kontrastierungsartefakte auftreten können (Kontrastierungsvariabilität stärker als strahleninduzierte Variabilität!). Untersuchungen mit anderen Präparationsmethoden stehen noch aus. Die Struktur zeigt mehrere Durchtrittstellen der gefärbten Kanäle (A bis N) zur Oberfläche, wobei nach Befunden mit konventioneller Markierungsmikroskopie C dem 3'-Ende der 23S-RNA und G dem 3'-Ende der 5S-RNA entsprechen dürfte. Man beachte auch die sehr differenzierte Oberfläche, welche die Partikel gegenüber dem Negativkontrastmittel abgrenzt.

## 4. Ausblick

Die Problematik der Ribosomenanalyse hat besonders deutlich gemacht, welcher Wert der weiteren Entwicklung der Methoden (möglichst mit Automatisierung) zuzumessen ist. Was wirklich interessiert, ist die Funktion. Strukturanalysen haben keinen Selbstzweck, sondern sollen zum Verständnis der Proteinfabrik Ribosom führen. Darum glauben wir nicht, daß mit einer einzigen Analyse eines nativen Kristalls – so wichtig sie natürlich wäre – sehr viel für das Verständnis der Ribosomenwirkung gewonnen wäre. Man muß Reaktionen durchführen und die Produkte der Reaktionen mit kleinen und großen Partnern untersuchen. Nur ein unverbesserlicher Optimist könnte hoffen, daß alle Reaktionsprodukte kristallisierbar wären. Eigentlich weist uns schon die konventionelle Ribosomenmikroskopie den Weg. Dort werden nicht nur die Reaktionsprodukte mit dem Präparationsreagens, sondern mit einer Vielzahl von Effektoren untersucht. Man muß nur die etwas hilflosen zweidimensionalen Methoden durch dreidimensionale Analysen ersetzen. Es ist dabei keineswegs selbstverständlich, daß die „schmutzigen Ribosomenknödel“ definierte und reproduzierbare Strukturen im Innern trotz grober Präparation und Bestrahlung gezeigt haben.

Sie hätten auch wesentlich stärker gestört sein können – auch dann wäre es ein signifikantes Ergebnis gewesen, das man hätte akzeptieren müssen.

Aber natürlich möchte man individuelle organische Strukturen auch ohne das Stützkorsett der Schweratomfärbung studieren. Wir glauben, daß hier Untersuchungen bei tiefen Temperaturen (flüssiges Helium) weiterhelfen werden. Bei Raumtemperatur entwickeln sich die wirklichen strukturellen Katastrophen eigentlich sekundär. Bindungen werden aufgebrochen, große und kleine Fragmente entstehen. Die kleinen Fragmente suchen ihren Weg ins Freie, und schließlich bleibt nach Masseverlusten von ca. 40% ein Skelett übrig, das vielleicht (wenn man Glück hat) noch gewisse Beziehungen zur nativen Struktur zeigen kann – wir wissen es nicht.

Der experimentell nachgewiesene Vorteil der Kryomikroskopie ist, daß kein Masseverlust eintritt. Wahrscheinlich behalten die niedermolekularen Fragmente ihren Platz im wesentlichen bei. Damit bliebe die großräumige Architektur erhalten. Es hat zur Zeit wenig Sinn zu spekulieren, was im einzelnen passiert. Vielleicht kann man Gedanken der Spurstrukturanalyse (vgl. [46]) anwenden und zum nativen Ausgangszustand extrapolieren. Aber man kann sicherlich experimentieren, da es gelungen ist, hochauflösende Kryomikroskope zu bauen (vgl. [23]).

Ideal für die Kryomikroskopie wäre ein Mikroskop, in welchem die relative Richtungsänderung durch Kippen des Primärstrahls (statt durch Kippen des Präparats) elektronisch erzeugt wird. Somit treten keine Lagefehler auf, welche ein nachträgliches Bestimmen des gemeinsamen Ursprungs erforderlich machen. Das ist von Bedeutung bei geringen Strahlendosen, bei denen die bisherigen Korrelationsmethoden versagen dürften. Es gibt bereits Vorschläge<sup>[89]</sup> und sogar Versuche zur Realisierung<sup>[90]</sup>.

Noch gar nicht erwähnt wurde die Erhöhung der Auflösung bis zur atomaren Grenze – es ist fast selbstverständlich, daß sie versucht werden muß. Wie dieser Bericht demonstrieren möchte, liegt es – wenn die neu entwickelten

Feldemissionskathoden verwendet werden – nicht mehr an der grundsätzlichen experimentellen Methodik. Freilich wird man noch (nicht nur im biologischen Bereich) sehr viel Präparationschemie zu lernen haben. Und atomare Auflösung muß mit dreidimensionaler Analyse gekoppelt werden. Nur in drei Dimensionen ist die Materie „löchrig“ – man wird dann auch strukturelle Einschränkungen zur Analyse mitverwenden können, wie wir es schon vor längerer Zeit vorgeschlagen hatten<sup>[24a]</sup>. Die Gegenprüfung zum chemischen „Sinn“ (Bindungslängen, -winkel) wird die Analyse erleichtern.

Zum Schluß noch eine nachdenkliche Bemerkung: Es ist die starke Wechselwirkung, die es (im Prinzip) ermöglicht, den Ort eines Atoms durch Streuung von Elektronen in verblüffend kurzen Zeiten zu bestimmen. Jahrhunderte an Meßzeit wären nötig, wenn man das gleiche mit Röntgenstrahlen erreichen wollte. Somit ist ein experimenteller Informationsfluß in kurzen Zeiten erhältlich, neben dem das experimentelle Datenmaterial bei den kompliziertesten Röntgen- oder Neutronenbeugungsanalysen winzig ist. Aber seine Bewältigung ist nur mit sehr effektiven Computern möglich. Die phasenbestimmende Elektronendiffraktometrie ist ein echtes Kind unseres Computerzeitalters.

*Die Berichtszeit von mehr als zwanzig Jahren läßt es kaum zu, allen Mitarbeitern einzeln zu danken. Auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie – von der instrumentellen Technik bis zu informationstheoretischen Beiträgen – wurden mehr als 50 Diplom- und Doktorarbeiten vergeben. Ich bitte daher um Entschuldigung, wenn ich nur einige Weggefährten der letzten Jahre nenne: E. Demm, B. Grill, R. Guckenberger, H. Hebert (Gast vom Karolinska Institut, Stockholm), R. Hegerl, U. Jakubowski, V. Knauer, G. Nützel, H. Ötl, H. R. Tietz, D. Typke. Mit dem Aufbau eines He-Kryomikroskops werden in unserem Laboratorium Arbeiten in einem wichtigen Teilgebiet möglich. Ich danke Frau Dr. I. Dietrich und ihren Mitarbeitern (Siemens AG, München) sehr für verständnisvolle Zusammenarbeit. Für finanzielle Unterstützung bin ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie zu Dank verpflichtet.*

Eingegangen am 18. Januar 1983 [A 455]

- [1] H. Boersch, *Z. Tech. Phys.* 19 (1938) 337.
- [2] H. Boersch, Diskussionsbemerkung zu einem Vortrag von C. Peters, *Z. Elektrochem. Angew. Phys. Chem.* 46 (1940) 449.
- [3] W. L. Bragg, *Nature (London)* 143 (1939) 678.
- [4] W. Hoppe, *Z. Kristallogr. Kristallgeom. Kristallphys. Kristallchem.* 107 (1956) 28.
- [5] W. Hoppe, R. Huber, *Chem. Ber.* 98 (1965) 2353.
- [6] M. Menzel, Diplomarbeit, Technische Universität München 1961.
- [7] W. Hoppe, *Naturwissenschaften* 48 (1961) 736.
- [8] W. Hoppe, *Optik (Stuttgart)* 20 (1963) 599.
- [9] H. Boersch, *Z. Naturforsch. A* 2 (1947) 615.
- [10] O. Scherzer, *J. Appl. Phys.* 20 (1949) 20.
- [11] W. Hoppe, R. Langer, Int. Conf. Electron Diffraction and Crystal Defects, Melbourne 1965, *Abstr. I* 0–5.
- [12] R. Langer, W. Hoppe, *Optik (Stuttgart)* 24 (1966/1967) 740.
- [13] R. Langer, W. Hoppe, *Optik (Stuttgart)* 25 (1967) 413.
- [14] R. Langer, W. Hoppe, *Optik (Stuttgart)* 25 (1967) 507.
- [15] O. Scherzer, *Z. Phys.* 101 (1936) 593.
- [16] F. Lenz, W. Scheffels, *Z. Naturforsch. A* 13 (1958) 226.
- [17] F. Thon, *Z. Naturforsch. A* 20 (1965) 154.
- [18] F. Thon, *Z. Naturforsch. A* 21 (1966) 476.
- [19] G. Möllenstedt, R. Speidel, W. Hoppe, R. Langer, K.-H. Katerbau, F. Thon, Proc. 4th Eur. Congr. Electron Microsc., Rome 1968, Vol. 1, S. 125.

- [20] W. Hoppe, K.-H. Katerbau, R. Langer, G. Möllenstedt, R. Speidel, F. Thon, *Siemens Rev.* 36 (1969), 3rd Spec. Issue „X-Ray and Electron Microscopy News“.
- [21] K. H. von Grote, G. Möllenstedt, R. Speidel, *Optik (Stuttgart)* 22 (1965) 252.
- [22] A. Hirt, R. Langer, W. Hoppe, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 74 (1970) 1101.
- [23] I. Dietrich, F. Fox, E. Knappek, G. Lefranc, K. Nachtrieb, R. Weyl, H. Zerbst, *Ultramicroscopy* 2 (1977) 241.
- [24] Diskussionstagung der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, Hirschgägg, 15.–18. März 1970; vgl. dazu a) W. Hoppe, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 74 (1970) 1090; b) J. Frank, P. Bussler, R. Langer, W. Hoppe, *ibid.* 74 (1970) 1105; c) R. Langer, J. Frank, A. Feltynowski, W. Hoppe, *ibid.* 74 (1970) 1120.
- [25] Symposium on New Developments in Electron Microscopy, Royal Society, London, 12. März 1970; vgl. dazu W. Hoppe, *Philos. Trans. R. Soc. London B* 261 (1971) 71; auch in H. E. Huxley, A. Klug: *Recent Development in Electron Microscopy*, The Royal Society, London 1971.
- [26] K. J. Hanßen, B. Morgenstern, *Z. Angew. Phys.* 19 (1965) 215; vgl. auch (kohärente Lichtoptik) P. Elias, D. S. Grey, D. Z. Robinson, *J. Opt. Soc. Am.* 42 (1952) 127; O. Bryngdal, A. Lohmann, *ibid.* 58 (1968) 620; A. Marechal, P. Croce, *C. R. Acad. Sci.* 237 (1953) 607.
- [27] P. Schiske, *Proc. 4th Eur. Congr. Electron Microsc., Rome 1968*, Vol. I, S. 145.
- [28] K. J. Hanßen, *Proc. 4th Eur. Congr. Electron Microsc., Rome 1968*, Vol. I, S. 153.
- [29] F. Thon, B. M. Siegel, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 74 (1970) 1116.
- [30] W. Hoppe, *Acta Crystallogr. A* 26 (1970) 414; vgl. auch (anomale Streuung) L. Reimer, *Z. Naturforsch. A* 24 (1969) 377.
- [32] W. Hoppe, R. Langer, F. Thon, Vortrag bei der gemeinsamen Tagung der Österreichischen und der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, Wien, September 1969.
- [33] W. Hoppe, *Z. Naturforsch. A* 26 (1971) 1155.
- [34] W. Hoppe, D. Köstler, D. Typke, N. Hunsmann, *Optik (Stuttgart)* 42 (1975) 43.
- [35] a) W. Hoppe, D. Köstler, *Proc. 6th Eur. Congr. Electron Microsc., Jerusalem 1976*, Vol. I, S. 99; b) D. Typke, D. Köstler, *Ultramicroscopy* 2 (1977) 285.
- [36] a) B. Grill, Diplomarbeit, Technische Universität München 1973; b) W. Hoppe, *Naturwissenschaften* 61 (1974) 239.
- [37] *International Tables for X-Ray Crystallography*, Vol. 4, S. 176, The Kynoch Press, Birmingham 1974.
- [38] D. Typke, M. Radermacher, *Ultramicroscopy* 9 (1982) 131.
- [39] H. P. Erickson, A. Klug, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 74 (1970) 1129; *Philos. Trans. R. Soc. London B* 261 (1971) 105.
- [40] W. Hoppe, *Chem. Scr.* 14 (1978/1979) 227; vgl. auch *Angew. Chem.* 77 (1965) 484; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 4 (1965) 508; *ibid.* 78 (1966) 289 bzw. 5 (1966) 267.
- [41] V. Witt, H. P. Englmeier, W. Hoppe, *Proc. 5th Eur. Congr. Electron Microsc., Manchester 1972*, Vol. I, 632.
- [42] F. Thon, DBP 1564658 (1966), Siemens AG.
- [43] a) R. Brüders, K. H. Hermann, D. Krahl, H.-P. Rust, *Proc. 6th Eur. Congr. Electron Microsc., Jerusalem 1976*, Vol. I, S. 318, 320; b) W. Kerzendorf, Dissertation, Technische Universität München 1979.
- [44] W. Hoppe, *Acta Crystallogr. A* 25 (1969) 495, 508; W. Hoppe, G. Strube, *ibid. A* 25 (1969) 502.
- [45] H. Berndt, R. Doll, *Optik (Stuttgart)* 51 (1978) 93; *ibid.*, im Druck.
- [46] W. Hoppe, *Ultramicroscopy* 10 (1982) 187.
- [47] A. Klug, J. E. Berger, *J. Mol. Biol.* 10 (1964) 565.
- [48] D. J. DeRosier, A. Klug, *Nature (London)* 217 (1968) 130.
- [49] R. Hart, *Science* 159 (1968) 1464.
- [50] W. Hoppe, R. Langer, G. Knesch, C. Poppe, *Naturwissenschaften* 55 (1968) 333.
- [51] P. N. T. Unwin, *Z. Naturforsch. A* 29 (1974) 158; *J. Mol. Biol.* 87 (1974) 657.
- [52] R. A. Crowther, A. Klug, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 161.
- [53] D. Wrinch, *Nature (London)* 157 (1946) 226.
- [54] J. N. Champness, A. C. Bloomer, G. Bricogne, P. J. G. Butler, A. Klug, *Nature (London)* 259 (1976) 20.
- [55] K. C. Holmes, G. J. Stubbs, E. Mandelkow, U. Gallwitz, *Nature (London)* 254 (1975) 192.
- [56] W. Hoppe, *Naturwissenschaften* 55 (1968) 65.
- [57] R. Langer, C. Poppe, H. J. Schramm, W. Hoppe, *J. Mol. Biol.* 93 (1975) 159.
- [58] a) R. M. Glaeser, *J. Ultrastruct. Res.* 36 (1971) 466; b) R. M. Glaeser, I. Kuo, T. F. Budinger, *Annu. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.* 29 (1971) 466; c) R. M. Glaeser in B. Siegel, D. R. Beaman: *Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis*, Wiley, New York 1975.
- [59] F. Parak, R. L. Mössbauer, W. Hoppe, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 74 (1970) 1207.
- [60] R. C. Williams, H. W. Fisher, *J. Mol. Biol.* 52 (1970) 121.
- [61] Vgl. z. B. W. Hoppe in: *Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie*, 3. Aufl., Bd. 2/1, Urban und Schwarzenberg, München 1961, S. 529; W. Hoppe in W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler: *Biophysik*, 2. Aufl., Springer, Berlin 1982, S. 54.
- [62] Vgl. z. B. A. Gieren, M. Kokkinidis, *Z. Naturforsch. C* 37 (1982) 977.
- [63] J. D. McLachlan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44 (1958) 948.
- [64] J. R. Breedlove, G. T. Trammel, *Science* 170 (1970) 1310.
- [65] R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Nature (London)* 257 (1975) 28.
- [66] Vgl. z. B. W. Baumeister, W. Vogell: *Electron Microscopy at Molecular Dimensions*, Springer, Berlin 1980.
- [67] W. Hoppe, H. Wenzl, H. J. Schramm, *Proc. 6th Eur. Congr. Electron Microsc., Jerusalem 1976*, Vol. 2, S. 58.
- [68] W. Hoppe, H. Wenzl, H. J. Schramm, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358 (1977) 1069.
- [69] W. Hoppe, *Isr. J. Chem.* 10 (1972) 321; W. Hoppe, R. May, P. Stöckel, S. Lorenz, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann, H. L. Crespi, J. J. Katz, K. Ibel in B. P. Schoenborn: *Neutron Scattering for the Analysis of Biological Structures*, Brookhaven Symposia in Biology No. 27 (1975), S. IV-38.
- [70] Vgl. z. B. R. Gruehn, W. Mertin, *Angew. Chem.* 92 (1980) 531; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 505.
- [71] R. Hegerl, W. Hoppe, *Z. Naturforsch. A* 31 (1976) 1717.
- [72] B. E. H. Saxberg, W. O. Saxton, *Ultramicroscopy* 6 (1981) 85.
- [73] W. Hoppe, R. Hegerl, *Ultramicroscopy* 6 (1981) 205.
- [74] N. Hunsmann, P. Bussler, W. Hoppe, *Proc. 5th Eur. Congr. Electron Microsc., Manchester 1972*, Vol. I, S. 654.
- [75] W. Hoppe, *Naturwissenschaften* 61 (1974) 534.
- [76] R. Guckenberger, *Ultramicroscopy* 9 (1982) 167.
- [77] Vgl. W. Hoppe, *Adv. Struct. Res. Diffr. Methods* 7 (1979) 213.
- [78] a) W. Hoppe, *Optik (Stuttgart)* 29 (1969) 617; b) M. Radermacher, W. Hoppe, *Proc. 9th Int. Congr. Electron Microsc., Toronto 1978*, Vol. I, S. 218.
- [79] R. A. Crowther, D. J. DeRosier, A. Klug, *Proc. R. Soc. London A* 317 (1970) 319.
- [80] V. Knauer, Diplomarbeit, Technische Universität München 1975.
- [81] W. Hoppe, J. Gassmann, N. Hunsmann, H. J. Schramm, M. Sturm, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355 (1974) 1483; W. Hoppe, H. J. Schramm, M. Sturm, N. Hunsmann, J. Gassmann, *Z. Naturforsch. A* 31 (1976) 645, 1370, 1380.
- [82] N. A. Kiselev, V. Ya. Stel'mashuk, E. V. Orlowa, V. D. Vasilev, O. M. Selivanova, *Mol. Biol. Rep.* 8 (1982) 191.
- [83] J. Frank, A. Verschoor, M. Boulik, J. S. Wall, J. F. Hainfeld, *Proc. 10th Int. Congr. Electron Microsc., Hamburg 1982*, Vol. 3, S. 97.
- [84] W. Kunath, V. Lamvik, *20. Tagung für Elektronenmikroskopie, Innsbruck 1981*, S. 8.
- [85] V. Knauer, H. J. Schramm, W. Hoppe, *Proc. 9th Int. Congr. Electron Microsc., Toronto 1978*, Vol. 2, S. 4; V. Knauer, W. Hoppe, *Proc. 7th Eur. Congr. Electron Microsc., Den Haag 1980*, Vol. 2, S. 702; W. Hoppe, *Proc. 10th Int. Congr. Electron Microsc., Hamburg 1982*, Vol. I, S. 97; V. Knauer, R. Hegerl, W. Hoppe, *J. Mol. Biol.* 163 (1983) 409; H. Oettl, R. Hegerl, W. Hoppe, *ibid.* 163 (1983) 431.
- [86] E. Kellenberger, M. Häner, M. Wurtz, *Ultramicroscopy* 9 (1982) 139.
- [87] W. Hoppe, H. Oettl, unveröffentlicht.
- [88] V. Knauer, M. Hintermaier, W. Hoppe, unveröffentlicht.
- [89] W. Hoppe, *Z. Naturforsch. A* 27 (1972) 919; D. Typke, W. Hoppe, *Proc. 5th Eur. Congr. Electron Microsc., Manchester 1972*, Vol. I, S. 70; D. Typke, W. Hoppe, W. Sessler, M. Burger, *Proc. 6th Eur. Congr. Electron Microsc., Jerusalem 1976*, Vol. I, S. 334; E. Plies, D. Typke, *Z. Naturforsch. A* 33 (1978) 1361; E. Plies, *Proc. 9th Int. Congr. Electron Microsc., Toronto 1978*, Vol. I, S. 50; D. Typke, *Nucl. Instrum. Methods* 187 (1981) 217; E. Plies, *ibid.* 187 (1981) 227.
- [90] M. Burger, Dissertation, Technische Universität München 1978; D. Typke, M. Burger, N. Lemke, G. Lefranc, *Proc. 7th Eur. Congr. Electron Microsc., Den Haag 1980*, Vol. I, S. 82.
- [91] E. R. Podack, H. J. Müller-Eberhard, H. Horst, W. Hoppe, *J. Immunol.* 128 (1982) 2353.
- [92] B. Grill, Dissertation, Technische Universität München 1980.
- [93] D. E. Olins, A. L. Olins, H. A. Levy, R. C. Durfee, S. M. Margle, E. P. Tinnel, S. D. Dover, *Science* 220 (1983) 498.
- [94] J. Frank, W. Goldfarb, D. Eisenberg, T. S. Baker, *Ultramicroscopy* 3 (1978) 283.
- [95] W. Knauer, unveröffentlicht.
- [96] W. Hoppe in [66], S. 278.