

Technische Universität München  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

**Korrektur der Transferfunktionen**  
*CTF* und *MTF*  
**in der Kryoelektronentomographie**

Matthias J. M. Eibauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Bausch  
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Zacharias

Die Dissertation wurde am 11.08.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Physik am 02.11.2011 angenommen.

*Für Tanja, Hannah und Jonas.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2 Kryoelektronentomographie</b>	<b>15</b>
2.1 Bildentstehung . . . . .	15
2.2 Kontrastentstehung . . . . .	22
2.3 Transferfunktionen . . . . .	27
2.4 Aufnahme einer Kippserie . . . . .	35
2.5 Alignierung einer Kippserie . . . . .	38
2.6 Rekonstruktion eines Tomogramms . . . . .	41
2.7 Bildverarbeitung . . . . .	44
<b>3 Subtomogrammalignierung</b>	<b>49</b>
3.1 Algorithmus . . . . .	49
3.2 Klassifikation . . . . .	56
3.3 Auflösungsmessung . . . . .	57
3.4 Mustererkennung . . . . .	59
<b>4 Korrektur der Transferfunktionen</b>	<b>65</b>
4.1 Korrektur der Kontrasttransferfunktion . . . . .	67
4.2 Korrektur der Modulationstransferfunktion . . . . .	80
4.3 Implementierung . . . . .	82
<b>5 MspA</b>	<b>87</b>
<b>6 Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>

# Zusammenfassung

Die Strukturaufklärung von makromolekularen Komplexen und Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung ist eine große Herausforderung der Strukturbiologie. Hervorragend zur Lösung dieser Aufgabe geeignet ist die Kryoelektronentomographie (KET), die es ermöglicht, subzelluläre Strukturen direkt in ihrer zellulären Umgebung abzubilden. Durch die zusätzliche Anwendung von Subtomogrammalignment und -mittelung können Elektronendichten von Proteinkomplexen mit deutlich erhöhten Signal-Rausch-Verhältnissen rekonstruiert werden.

Die gegenwärtig erreichbare Auflösung hängt jedoch deutlich von der Genauigkeit ab, mit der die Kontrasttransferfunktion (*Contrast transfer function, CTF*) des Mikroskops und die Modulationstransferfunktion (*Modulation transfer function, MTF*) des Detektors bestimmt und anschließend korrigiert werden können. Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer Methode zur Korrektur dieser Transferfunktionen mit hoher Genauigkeit, um die Auflösungsbegrenzung der KET in Kombination mit Subtomogrammalignment zu umgehen.

Zur Bestimmung und Korrektur der *CTF* wurde ein neuer Ansatz entwickelt, der auf einem erweiterten Bildaufnahmeschema basiert. Dabei werden mit hoher Elektronendosis zwei zusätzliche Bilder aufgenommen, die diametral entlang der Kippachse räumlich entfernt von der Aufnahmestelle des Objekts, um Strahlenschaden zu vermeiden, platziert werden. Durch die hohe Elektronendosis wird das Signal dieser Bilder verstärkt, so dass die *CTF* extrahiert und der Defokus genau bestimmt werden kann. Diese Defokuswerte werden schließlich zur Interpolation des Defokus an der Aufnahmestelle und zur *CTF*-Korrektur verwendet. Zusätzlich wurde die Korrektur der *MTF* in den Prozess der Subtomogrammalignment eingebunden. Diese neue Methode verhindert, auf der Ebene der Subtomogramme, eine zu hohe Verstärkung des Rauschanteils.

Zur Validierung der Methode wurde das Porin MspA von *Mycobacterium smegmatis* eingesetzt. Durch die Anwendung von KET und Subtomogrammalignment auf MspA, rekonstruiert in Lipidvesikel, war es möglich, eine dreidimensionale Rekonstruktion des Porins in einer nahezu natürlichen Umgebung zu erhalten. Trotz seiner geringen Molekülmasse von 160 kDa und dem geringem Kontrastunterschied zwischen Protein und Lipidmembran wurde eine Auflösung von maximal 12 Å (*Fourier-shell correlation* nach dem 0.5 Kriterium) erzielt.

# Abstract

Elucidating the structure of macromolecular complexes and membrane proteins in their native environment is a major challenge of structural biology. Cryo-electron tomography (CET) is singularly suited to solve this task with its potential to image sub-cellular structures directly in their cellular environment. Additionally, sub-tomogram alignment and averaging can be applied, resulting in electron density maps of protein complexes with intelligibly increased signal to noise ratios.

However, the currently achievable resolution depends clearly on the accuracy with which the contrast transfer function (*CTF*) of the microscope and the modulation transfer function (*MTF*) of the detector can be determined and subsequently be corrected for. The major objective of this work was the development and validation of a method to correct for these transfer functions with high precision in order to overcome the resolution restriction of CET in combination with sub-tomogram alignment.

For *CTF* determination and correction a new approach was developed, based on an extended image acquisition scheme. It adds to the acquisition protocol two high-dose electron micrographs, which are placed diametrically oriented along the tilt-axis spatially separated from the exposure position of the object, in order to avoid beam damage. The high electron dose used for these micrographs generates an increased signal, suitable for *CTF* extraction and accurate defocus determination. Finally these defocus values are used to interpolate the defocus at the exposure position and correct for the *CTF*. Additionally, *MTF* correction was integrated into the sub-tomogram alignment process. This novel procedure avoids the over-amplification of noise on the sub-tomogram level.

For validation of the method the porin MspA of *Mycobacterium smegmatis* was chosen for analysis. By applying CET and sub-tomogram alignment to MspA, reconstituted in lipid vesicles, it was possible to obtain a three-dimensional reconstruction of this porin in its close-to-native environment. Despite its low molecular mass of 160 kDa and the minute contrast difference between protein and lipid membrane a resolution of maximal 12 Å (Fourier-shell correlation using the 0.5 criterion) was achieved.



# 1 Einleitung

Die Kryoelektronentomographie (KET) [1] ermöglicht es, komplexe biologische Strukturen, wie beispielsweise Zellen [2, 3, 4], Zellorganellen [5], Zellmembranen [6, 7] oder Viren [8, 9, 10] in ihrer Gesamtheit bis hin zu einzelnen Proteinkomplexen mit hoher Auflösung dreidimensional (3D) abzubilden und zu analysieren. Dazu werden von dem untersuchten Objekt in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) eine Serie von Projektionen unter verschiedenen Kippwinkeln (Kippserie) aufgenommen. Aus einer Kippserie kann dann wiederum das untersuchte Objekt 3D rekonstruiert werden (Tomogramm).

## Auflösung

Die Auflösung eines Tomogramms wird durch folgende vier Faktoren begrenzt: Elektronendosis und Objektstärke, Defokussierung und Detektorqualität. Dabei sind sowohl Dosislimitation als auch Dickenlimitation unüberbrückbar. Jedoch, die Beschränkung der Auflösung durch die vom Defokus abhängige Kontrasttransferfunktion (*Contrast transfer function*, *CTF*) und der vom Detektor abhängigen Modulationstransferfunktion (*Modulation transfer function*, *MTF*) kann durch Korrektur aufgehoben werden. In der Tat war genau das die Absicht dieser Arbeit, nämlich Methoden zur Korrektur von *CTF* und *MTF* in der KET zu entwickeln und zu validieren.

Beide Transferfunktionen können im Sinne von Punktverbreiterungsfunktionen verstanden werden, die einen idealen Bildpunkt entsprechend ihrer Charakteristik deformieren (Abb. 1.1) und die Auflösung eines Tomogramms limitieren. Beispielsweise wäre die Auflösung eines Tomogramms ohne *CTF*-Korrektur bei einem Defokus von  $-8\ \mu\text{m}$  auf 4 nm und bei  $-4\ \mu\text{m}$  auf 2.8 nm begrenzt<sup>1</sup>. Der Defokus kann jedoch nicht beliebig klein gewählt werden, da mit abnehmendem Defokus der Kontrast der Projektionen abnimmt und damit die Interpretation und Analyse eines Tomogramms erschwert beziehungsweise unmöglich macht.

---

<sup>1</sup>Dieser Beispielrechnung liegen folgende Mikroskopparameter zugrunde: sphärischer Aberrationskoeffizient der Objektivlinse 2.0 mm, Beschleunigungsspannung 300 kV, Pixelgröße 2.1 Å.

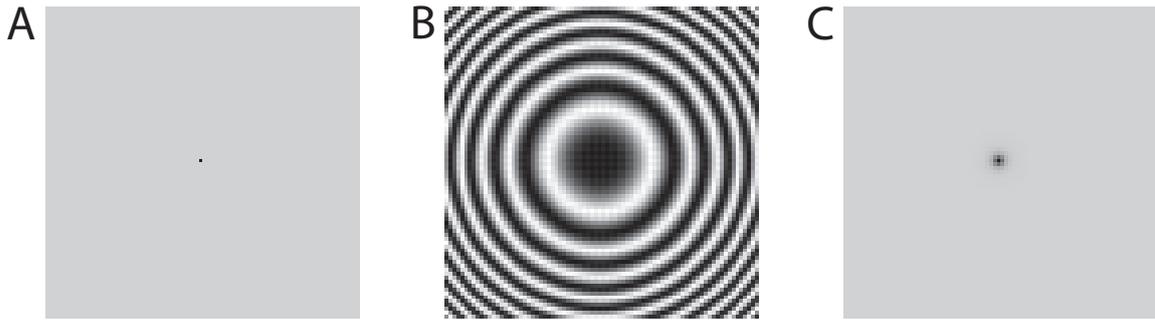


Abbildung 1.1: **A** Idealer Bildpunkt (ein Pixel). **B** Punktantwort der *CTF*. **C** Punktantwort der *MTF*.

### Vitrifikation der Probe

Im Vergleich zur klassischen Elektronenmikroskopie an biologischen Strukturen [11], zeichnet sich die KET durch ihre besondere Art aus, die Probe für das Hochvakuum im TEM zu fixieren. Während bei den klassischen Preparationstechniken [12] die untersuchte biologische Struktur im Allgemeinen dehydriert wird und dadurch aggregiert, darüber hinaus kontrastiert und chemisch fixiert wird, und dadurch ihr nativer Zustand zerstört wird [13], bleibt dieser in der KET durch Vitrifizierung erhalten. Dazu wird die Probe mit hoher Geschwindigkeit ( $\gtrsim 10^5$  K/s [4]) unter die Vitrifizierungstemperatur von Wasser ( $T_d \cong 140$  K [14]) abgekühlt, wodurch das im Objekt enthaltene Wasser einen direkten Phasenübergang in einen amorphen Zustand vollzieht und die Probe dadurch fixiert wird, ohne sie durch die Bildung von Eiskristallen zu zerstören [15].

### Dosislimitation

Die erste, fundamentale Limitation der KET ist durch die Begrenzung der Elektronendosis gegeben. Aufgrund der hohen Strahlungsempfindlichkeit vitrifizierter, biologischer Proben gegenüber Elektronenstrahlung sollte die Gesamtelektronendosis einer Kippserie etwa  $20 - 60 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  nicht überschreiten [16]. Erstens wird dadurch die Anzahl an Projektionen einer Kippserie und damit die Auflösung eines Tomogramms eingeschränkt. Zweitens ist dadurch das Verhältnis von Signal zu Rauschen (*Signal-to-noise ratio*, *SNR*) eines Tomogramms gering, typischerweise etwa 0.1 [17]. Dies erschwert die Interpretation von Tomogrammen und stellt hohe Anforderungen an die Algorithmen, die zu deren Analyse eingesetzt werden.

Darüber hinaus ist die Dosislimitation der Grund dafür, weshalb sich die Korrektur der *CTF* in der KET schwierig gestaltet und sich noch nicht als Standardmethode, wie beispielsweise in der Einzelpartikelanalyse [18, 19], etabliert hat. Gerade die genaue Messung der Defokussierung des Objekts, die Grundlage für die Korrektur der *CTF*, wird durch die geringe Elektronendosis erschwert, beziehungsweise verhindert. Der Hauptbestandteil der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode besteht deshalb darin, die Dosislimitation im Hinblick auf die Defokusmessung zu umgehen.

### Dickenlimitation

Die zweite, fundamentale Limitation der KET ist durch die Begrenzung der Objektstärke gegeben. Aufgrund der endlichen Durchdringungstiefe des Elektronenstrahls durch die Probe und der Zunahme inkohärenter Elektronenstreuung (Mehrfachstreuung) mit zunehmender Dicke des untersuchten Objekts ist diese auf etwa 750 nm beschränkt [16]. Erstens wird dadurch der Kippwinkelbereich der Projektionen einer Kippserie reduziert, da die Pfadlänge der Elektronen durch die Probe abhängig vom Kippwinkel zunimmt. Beispielsweise hat sich bei einem Kippwinkel  $\vartheta$  von  $\pm 60^\circ$  die effektive Dicke der Probe um den Faktor  $1/\cos\vartheta$  bereits verdoppelt [20]. Die fehlenden Projektionen bei höheren Kippwinkeln (als *Missing wedge* bezeichnet) [21, 22, 20] verringern die Auflösung eines Tomogramms in Richtung des Elektronenstrahls ( $z$ -Richtung) und ziehen eine unvollständige Rekonstruktion des untersuchten Objekts nach sich.

Zweitens wird durch die Dickenlimitation der Einsatzbereich der KET als Abbildungsmethode der Strukturbiologie geschmälert. Zwar sind kleinere Archaeen oder Bakterien im Ganzen [4] sowie flache Bereiche wesentlich größerer ( $10 - 30 \mu\text{m}$  [23]), eukaryotischer Zellen [3] der Abbildung mit KET zugänglich. Um jedoch auch das Innere eukaryotischer Zellen oder größerer Prokaryoten zu untersuchen, wurden gleichzeitig mit der KET immer auch Methoden entwickelt, um die Dicke vitrifizierter, biologischer Proben zu verringern.

Hier sind vor allem das Kryoschneiden [24] und die Kryo-FIB Technik [25] zu nennen. Bei der ersten Methode wird die Probe unter Kryobedingungen mittels eines ultrascharfen Diamantmessers in dünne Schichten geschnitten, die dann der Untersuchung mit KET zugänglich sind. Dabei wird die Probe jedoch Scherkräften ausgesetzt und in Schnittrichtung deformiert [6, 26]. Weitere Artefakte können durch den Schneidprozess induziert werden, darunter wellenförmige Dickenmodulationen (*Chatter*) und Messerrillen (*Knife marks*) in Schnittrichtung und mehr oder weniger tiefe Brüche (*Crevasses*) orthogonal zur Schnittrichtung [27].

Die zweite Methode hingegen ist frei von den unverkennbaren Artefakten eines Kryoschnitts. Dabei wird von der Oberfläche der Probe ebenfalls unter Kryobedingungen mittels eines fokussierten Galliumionenstrahls Schicht für Schicht abgetragen, solange bis das Objekt eine Dicke besitzt, die der Untersuchung mit KET zugänglich ist.

In Abb. 1.2 ist als Beispiel ein Tomogramm einer *Dictyostelium discoideum* Zelle abgebildet, die mittels der Kryo-FIB Technik vorbearbeitet wurde. Im Hinblick auf die Analyse von Tomogrammen wird dieses im weiteren Verlauf der Arbeit zu Demonstrationszwecken verwendet und als Tomogramm  $T_0$  bezeichnet.

### Analyse von Tomogrammen

Zur Extraktion biologischer Strukturinformation aus den verrauschten Tomogrammen eiseingebetteter Objekte kommen im Wesentlichen drei bildverarbeiterische Techniken zum Einsatz [28]: Segmentierung, Mustererkennung und Subtomogrammalignierung.

Durch Segmentierung [29, 30] werden pleomorphe, biologische Strukturen, wie beispielsweise Membranen [31] oder Aktinnetzwerke [32] im Tomogramm identifiziert, annotiert und als dreidimensionale Oberflächen dargestellt. In den meisten Fällen wird das Tomogramm vor der Segmentierung entrauscht [33, 17].

Durch Mustererkennung [34] können größere Proteinkomplexe ( $\gtrsim 500$  kDa [35]), deren Struktur von vornherein beispielsweise durch Kristallstrukturanalyse [36] oder Einzelpartikelanalyse bekannt ist, als Suchmuster (*Template*) eingesetzt und im Tomogramm lokalisiert werden (*Template matching*) [35, 37, 38]. Die identifizierten Proteinkomplexe können dann in einem bestimmten biologischen Kontext hinsichtlich ihrer Verteilung und Häufigkeit analysiert werden (*Visual proteomics*) [39, 40].

Durch Subtomogrammalignierung wiederum können im Tomogramm enthaltene, molekular identische, biologische Strukturen (als Subtomogramme oder auch als Partikel bezeichnet), unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen relativen räumlichen Verschiebung und Orientierung (Alignierung) zu einer Gesamtstruktur (Mittelung) zusammengefasst werden [41, 42, 43, 44, 45]. Die Auswahl der Subtomogramme kann dabei entweder manuell, automatisch oder durch Mustererkennung geschehen.

Durch diesen Ansatz kann sowohl die SNR als auch die Auflösung der Mittelung, bei einer genügend großen Anzahl von Partikeln und genauer Alignierung, im Vergleich zum Subtomogramm, deutlich verbessert werden. Letztlich ist es dadurch möglich, die Dosislimitation auf Subtomogrammebene zu umgehen. Darüber hinaus besitzt die Mittelung keinen *Missing wedge* und damit isotrope Auflösung, da sie aus räumlich unterschiedlich orientierten Subtomogrammen mit räumlich unterschiedlich orientierten Bereichen

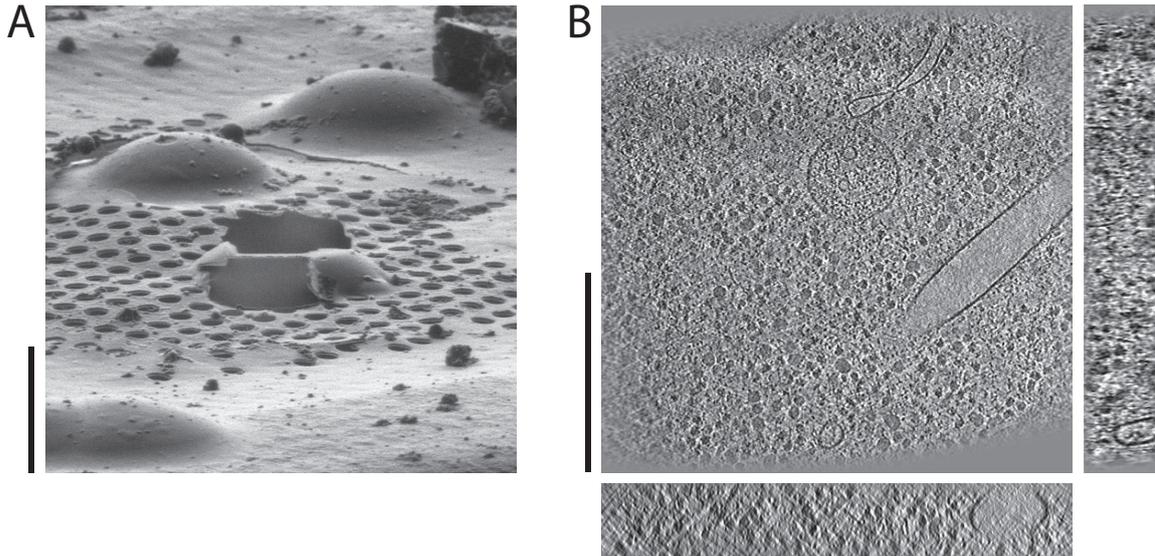


Abbildung 1.2: **A** Eiseingebettete *Dictyostelium discoideum* Zellen auf einem Objektträger, wie er gewöhnlich in der KET verwendet wird. Dieser besteht aus einem Kupfernetz, das mit einem gelochten Kohlefilm überzogen ist, wobei die Löcher einen Durchmesser von  $2\ \mu\text{m}$  besitzen. Die Zelle in der Mitte wurde mit der Kryo-FIB Technik keilförmig angeschnitten. An der Schnittkante besitzt sie eine Dicke, die der Untersuchung mit KET zugänglich ist. Das Bild wurde mit einem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen, welches in das Kryo-FIB Instrument integriert ist. Maßstab,  $10\ \mu\text{m}$ . **B** Tomogramm ( $xy$ -Schnitt; unten,  $xz$ -Schnitt; rechts,  $yz$ -Schnitt, Schnittdicke  $2.3\ \text{nm}$ ) einer vitrifizierten *Dictyostelium discoideum* Zelle, deren Dicke mittels der Kryo-FIB Technik auf etwa  $180\ \text{nm}$  verringert wurde. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieses Tomogramm zur Demonstration von Subtomogrammalignment und -klassifikation verwendet und als Tomogramm  $T_0$  bezeichnet. Die Gesamtelektronendosis beträgt  $36\ \text{e}^-/\text{\AA}^2$  bei einer Vergrößerung von  $22500\times$  und einem Defokus von  $-9\ \mu\text{m}$ , der die Auflösung des Tomogramms ohne *CTF*-Korrektur auf  $4.2\ \text{nm}$  begrenzt. Der Kippwinkelbereich der Projektionen erstreckt sich von  $-60^\circ$  bis  $+48^\circ$  mit einem Kippwinkelinkrement von  $2^\circ$ . Aufgrund der fehlenden Projektionen bei höheren Kippwinkeln (*Missing wedge*) ist das Tomogramm in  $z$ -Richtung elongiert und die Rekonstruktion unvollständig. Das Tomogramm zeigt einen Ausschnitt des Cytoplasmas der Zelle und besitzt ein Volumen von  $\sim 0.25\ \mu\text{m}^3$ . Grob abgeschätzt entspricht dies in etwa  $0.5\%$  des Gesamtvolumens der untersuchten Zelle. Speichervesikel, Ribosomen und andere Proteinkomplexe können deutlich erkannt werden. Darüber hinaus sind weitere Zellkompartimente in der Rekonstruktion enthalten, darunter ein Teil eines Mitochondriums (Tubuli-Typ), eines rauen Endoplasmatischen Retikulums, an dessen Membran Ribosomen zur Proteinbiosynthese und Membranproduktion gebunden sind, und eines Lysosoms, in dessen Membran V-Typ-ATPasen zum Aufbau eines Protonengradientens zwischen Cytoplasma und Lysosom integriert sind. Maßstab,  $500\ \text{nm}$ .

vorhandener Projektionen besteht. **Folglich ist die Auflösung einer Mittelung nur noch durch die beiden Transferfunktionen begrenzt.**

Darüber hinaus kann diese Methode durch Klassifikation der Subtomogramme auch auf die Untersuchung molekular heterogener Partikelensembles erweitert werden [46, 47, 48, 49] (Abb. 1.3). Beispielsweise können dadurch unterschiedliche Konformationszustände eines Proteinkomplexes untersucht und getrennt voneinander gemittelt werden. Zwei herausragende Beispiele, in denen KET mit Subtomogrammalignment und -klassifikation kombiniert wurde, sind die Arbeiten von Beck et al. [50, 51] am Kernporenkomplex von *Dictyostelium discoideum* und von Liu et al. [9] am env-Glykoproteinkomplex des humanen Immundefizienz-Virus.



Abbildung 1.3: Die Mittelungen **A** bis **D** zeigen das Ergebnis der Anwendung von Subtomogrammalignment und -klassifikation auf das Tomogramm  $T_0$ . Die verwendete Methode wird in Kap. 3 genauer beschrieben. **A** Mittelung der Ribosomen, die an die Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums gebunden sind. **B** Mittelung der cytoplasmatischen Ribosomen. Die Dichten benachbarter Ribosomen und deren charakteristische Orientierung [52, 53] sind deutlich zu erkennen. **C** Mittelung der V-Typ-ATPasen, die in die Membran des Lysosoms integriert sind. **D** Mittelung der cytoplasmatischen Speichervesikel. Die Mittelungen enthalten jeweils 131, 903, 136, 170 Subtomogramme. Die Auflösung von Mittelung **A** wurde mit  $\sim 61 \text{ \AA}$  und von Mittelung **B** mit  $\sim 50 \text{ \AA}$  durch *Fourier shell correlation* (0.5 Kriterium) bestimmt. Maßstab,  $200 \text{ \AA}$ .

## MspA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde KET in Kombination mit Subtomogrammalignment auf ein Membranprotein mit bekannter atomarer Struktur angewendet. Dabei handelt es sich um das Porin MspA des Bakteriums *Mycobacterium smegmatis*, welches von Faller et al. [54] durch Kristallstrukturanalyse mit einer Auflösung von  $2.5 \text{ \AA}$  gelöst wurde. Durch Vergleich dieser unabhängig erzeugten, hochaufgelösten Struktur mit der Mittelung, wurde die hier dargestellte Methode zur Korrektur der Transferfunktionen in der KET validiert. Den Ausgangspunkt des Experiments bildeten dabei vitrifizierte Liposomen, in deren Lipiddoppelschicht MspA rekonstituiert [55, 56, 57] wurde.

## Gliederung

Die vorliegende Arbeit ist in folgende Kapitel aufgliedert:

- In Kap. 2 werden die Grundlagen der KET beschrieben. Die Bild- und Kontrastentstehung im TEM wird in Grundzügen dargestellt und Aspekte der Aufnahme, Alignierung und Rekonstruktion von Kippserien beleuchtet. Die Transferfunktionen *CTF* und *MTF* werden eingeführt und grundlegende Operatoren (Rotation, Translation, Kreuzkorrelation) der 3D Bildverarbeitung definiert.
- In Kap. 3 werden die Grundlagen der Methode der Subtomogrammalignierung beschrieben. Am Beispiel von Tomogramm  $T_0$  wird die Anwendung der Methode skizziert und kurz erläutert.
- In Kap. 4 wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Korrektur der Transferfunktionen *CTF* und *MTF* in der KET behandelt.
- In Kap. 5 wird der konkrete Einsatz der Korrekturmethode zur Strukturbestimmung des Porins MspA in der Lipidschicht vitrifizierter Liposomen dargestellt. Darüber hinaus hat das Kapitel die Validation der Methode zum Gegenstand. Es wird gezeigt, wie sensitiv Struktur und Auflösung der Mittelung von der Defokussmessung abhängt.
- In Kap. 6 werden die Ergebnisse dieser Arbeit interpretiert, diskutiert und mögliche Erweiterungen der Methoden vorgeschlagen.



## 2 Kryoelektronentomographie

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der KET erläutert und dargestellt. Ihre Erweiterung um die Korrektur der Transferfunktionen ist Gegenstand von Kap. 4. Der Aufbau eines TEM und seine für den Einsatz in der KET notwendigen Erweiterungen sind in Abb. 2.1 dargestellt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Kippserien wurden mit einem Tecnai Polara TEM (FEI) aufgenommen, das in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinried installiert ist. Das TEM ist mit einer Feldemissionsquelle und einem GIF2002 Energiefilter (Gatan) ausgestattet, in den als Detektor eine  $2\text{k} \times 2\text{k}$  Multiscan CCD-Kamera (*Charge-coupled device*, CCD) integriert ist.

### 2.1 Bildentstehung

Die Bildentstehung im TEM beruht auf der Wechselwirkung der einfallenden Elektronenwelle mit den Atomen des untersuchten Objekts. Dabei wird zwischen inelastischer und elastischer Streuung unterschieden, die im folgenden betrachtet werden.

Die Wellenlänge  $\lambda$  der einfallenden Elektronenwelle ist unter Berücksichtigung relativistischer Effekte durch die folgende Gleichung gegeben [58, S. 21]:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0E(1 + \frac{E}{2E_0})}}, \quad (2.1)$$

wobei  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum,  $m_0$  die Ruhemasse,  $E$  die kinetische Energie und  $E_0$  die Ruheenergie eines Elektrons bezeichnet. Die kinetische Energie  $E$  der Elektronen ist durch das Produkt des Betrags der Elektronenladung  $e$  mit der Beschleunigungsspannung  $U$  gegeben. Beispielsweise ergibt sich für eine Beschleunigungsspannung von 300 kV eine Wellenlänge von 1.968 pm [58, S. 52].

### Inelastische Streuung

Im Fall inelastischer Streuung werden die einfallenden Elektronen an den Elektronenhüllen der Atome des untersuchten Objekts gestreut. Dadurch werden die Hüllenelektronen angeregt und die gestreuten Elektronen verlieren eine Energie  $\Delta E$ . Dabei werden im Energieverlustbereich  $\Delta E < 50$  eV hauptsächlich Intraband- und Interbandanregungen der äußeren Atomelektronen als auch die Anregung von Plasmonen beobachtet, die anschließend wieder in Photonen oder Phononen zerfallen [58, S. 10].

Werden jedoch Elektronen der inneren Elektronenschalen mit einer Anregungsenergie  $\Delta E \geq E_I$  in einen unbesetzten Energiezustand über das Fermi-niveau angeregt, kommt es zur Ionisation der jeweiligen Atome. Die minimale Ionisationsenergie  $E_I$  ist dabei eine elementspezifische Größe, die sich als Kante im Energieverlustspektrum äußert und dadurch zur Detektion bestimmter Elemente in der Probe verwendet werden kann. Diese Methode wird als Elektronenenergieverlustspektroskopie bezeichnet [58, S. 378 ff]. Für Kohlenstoff beträgt  $E_I$  zum Beispiel für Elektronen der *K*-Schale 285 eV [58, S. 10].

Der freigewordene Elektronenplatz in einer inneren Schale kann dann wiederum durch ein Elektron aus einer höheren Schale aufgefüllt werden. Die dabei freiwerdende Energie verläßt die Probe entweder als Röntgenstrahlung oder wird auf ein anderes Elektron übertragen, welches die Probe als Augerelektron verläßt. Dieser Prozess bildet die Grundlage der Auger-Elektronen-Spektroskopie [59].

Die mit der inelastischen Streuung verbundene Ionisation des Objekts führt zur Bildung und Diffusion von freien Radikalen. Diese wiederum führen zum Bruch molekularer Bindungen und damit zur molekularen Fragmentierung, bis hin zu makroskopisch sichtbaren Strahlschäden (Blasenbildung [60]) und letztlich zur Zerstörung des Objekts. Dabei wird bereits bei einer Elektronendosis  $< 1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  die Sekundärstruktur der beteiligten Makromoleküle beschädigt [61].

Aus diesem Zusammenhang folgt die Dosislimitation der KET. Aufgrund der hohen Strahlungsempfindlichkeit vitrifizierter, organischer Proben sollte eine Kippserie mit einer möglichst geringen Gesamtelektronendosis von etwa  $20 - 60 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  aufgenommen werden [16], um das untersuchte Objekt im Hinblick auf seine molekulare Struktur nur geringfügig zu verändern und zu beschädigen.

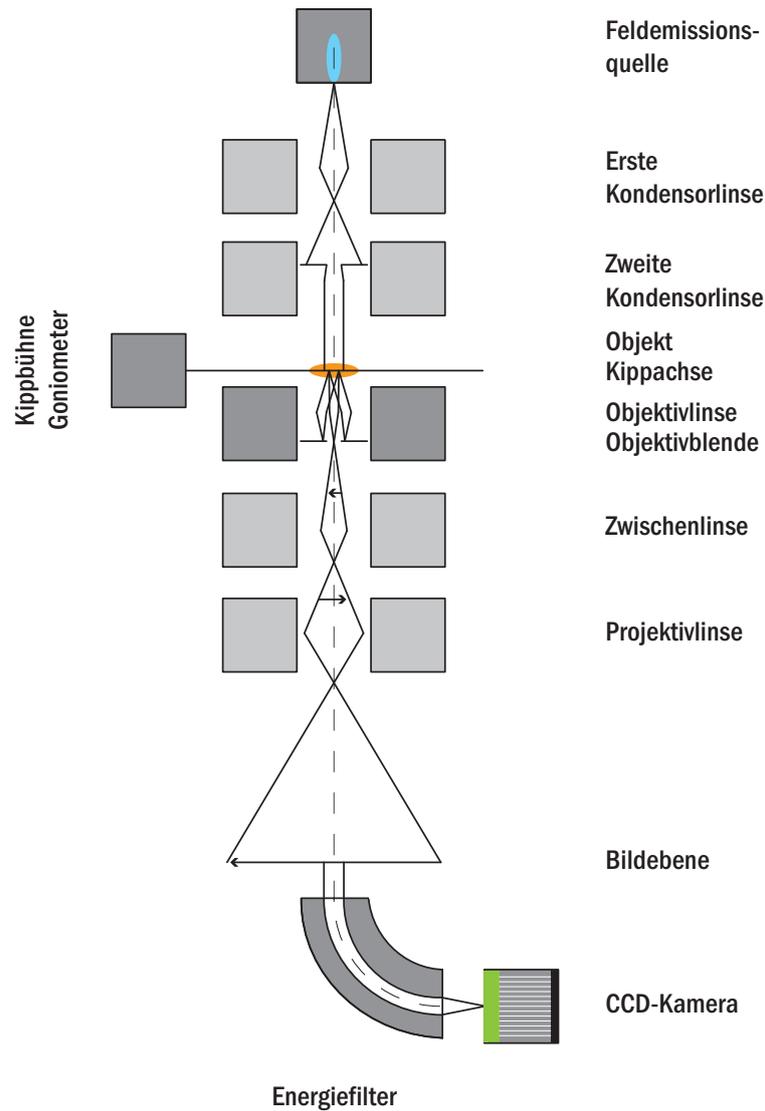


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines TEM. In der KET wird ein TEM mit einer Kippbühne ausgestattet, die es ermöglicht, eine Projektion des untersuchten Objekts unter einem bestimmten Kippwinkel aufzunehmen. Das Objekt wird dabei um die Kippachse rotiert. Der Kippwinkel wird über das Goniometer ausgelesen. Darüber hinaus wird ein TEM in der KET mit einem Energiefilter erweitert. Dadurch können Elektronen, die durch inelastische Streuung einen Energieverlust  $\Delta E$  erlitten haben, aus dem Elektronenstrahl herausgefiltert und deren Anteil am Bildkontrast entfernt werden. Typischerweise wird in der KET als Detektor eine CCD-Kamera verwendet. Sie ist aus drei Schichten aufgebaut: Szintillator, Glasfaseroptik und CCD-Sensor.

## Elastische Streuung

Im Fall elastischer Streuung werden die Elektronen durch die Coulombkraft an den Atomkernen des untersuchten Objekts gestreut, wobei die Energieübertragung zwischen Elektron und Atomkern bei kleinen Streuwinkeln  $\theta$  vernachlässigt werden kann [58, S. 9].

Die elastische Streuung ist die Wichtigste zum Bildkontrast beitragende Wechselwirkung und grundlegend für das Verständnis von Amplitudenkontrast und Phasenkontrast. In diesem Abschnitt soll nun die Herleitung des differentiellen Wirkungsquerschnitts  $d\sigma/d\Omega$  der elastischen Elektronenstreuung an den leichten Elementen organischer Proben nachvollzogen werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass TEM sei mit einer Feldemissionsquelle zur Herstellung eines Elektronenstrahls mit hoher räumlicher und zeitlicher Kohärenz ausgestattet [58, S. 97 ff].

Dann kann in guter Näherung der einfallende Elektronenstrahl als ebene Welle  $\psi$  mit Amplitude  $\psi_0$  und Wellenvektor  $\mathbf{k}_0 = (1/\lambda)\mathbf{e}_z$  beschrieben werden, die sich entlang der optischen Achse des Mikroskops ( $z$ -Achse, Einheitsvektor  $\mathbf{e}_z$ ) ausbreitet [58, S. 136]:

$$\psi = \psi_0 \exp(2\pi i \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r}), \quad (2.2)$$

wobei  $\mathbf{r}$  eine beliebige Raumkoordinate mit Abstand  $r$  zum Koordinatenursprung bezeichnet. Dabei falle der Koordinatenursprung mit dem Atomkern des streuenden Atoms zusammen. Die Wechselwirkung der einfallenden Elektronenwelle mit einem Atom des Objekts wird durch die relativistische Schrödingergleichung beschrieben [58, S. 59]:

$$\nabla^2 \psi + \frac{2m_0}{\hbar^2} \left[ E \left( 1 + \frac{E}{2E_0} \right) - V(r) \left( 1 + \frac{E}{E_0} \right) \right] \psi = 0, \quad (2.3)$$

wobei  $\hbar$  das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum bezeichnet. Das Coulombpotential des Atomkerns  $V(r)$  und seine Abschirmung durch die Hüllenelektronen kann durch das Wentzelsche Atommodell vereinfacht dargestellt werden [58, S. 142]:

$$V(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi\epsilon_0 r} e^{-r/R} \quad \text{mit } R = a_H Z^{-1/3}, \quad (2.4)$$

wobei  $Z$  die Kernladungszahl des Atoms,  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante und  $a_H$  den Bohrschen Radius bezeichnet. Im Fernfeld läßt sich die Lösung der Schrödingergleichung als Überlagerung der ungestreuten, ebenen Welle mit einer, gerade durch die Streuung

erzeugten, kugelförmigen Welle schreiben [58, S. 141]:

$$\psi_S = \psi_0 \exp(2\pi i \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r}) + i\psi_0 f(\theta) \frac{\exp(2\pi i k r)}{r}. \quad (2.5)$$

Die Wellenfunktion  $\psi_S$  wird im Folgenden als Objektwellenfunktion bezeichnet. Dabei ist der kugelförmige Anteil von  $\psi_S$  gegenüber dem ebenen Anteil um  $\pi/2$  phasenverschoben und die Streuamplitude  $f(\theta)$  ist eine komplexe Funktion [58, S. 141]:

$$f(\theta) = |f(\theta)| e^{i\eta(\theta)}, \quad (2.6)$$

wobei die zusätzliche Phasenverschiebung  $\eta(\theta)$  vom Streuwinkel  $\theta$  abhängt.

Nun können in der KET zur Berechnung der Streuamplitude  $f(\theta)$  zwei wesentliche Näherungen gemacht werden. Dabei wird angenommen, dass eine organische Probe, die im Wesentlichen aus leichten Elementen besteht, sich als schwaches Phasenobjekt verhält [62, 63] und deshalb die zusätzliche Phasenverschiebung  $\eta(\theta)$  vernachlässigt werden kann. Dann ist die Streuamplitude  $f(\theta)$  proportional zur Fourier-Transformierten des Potentials (Bornsche Näherung) [64] und es gilt [58, S. 145]:

$$f(\theta) = -\frac{2\pi}{\lambda^2 E} \frac{E + E_0}{E + 2E_0} \int V(\mathbf{r}) e^{-2\pi i \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d^3 \mathbf{r}. \quad (2.7)$$

Daraus folgt unter Verwendung des Wentzelschen Atommodells und der weiteren Näherung kleiner Streuwinkel die Streuamplitude der elastischen Elektronenstreuung an den leichten Elementen organischer Proben [58, S. 147]:

$$f(\theta) = \frac{2ZR^2(1 + E/E_0)}{a_H[1 + (\theta/\theta_0)^2]} \quad \text{mit} \quad \theta_0 = \frac{\lambda}{2\pi R} \quad (2.8)$$

und schließlich der differenzielle Wirkungsquerschnitt  $\frac{d\sigma}{d\Omega} = |f(\theta)|^2$  [58, S. 137]. Der Winkel  $\theta_0$  wird als charakteristischer Streuwinkel der elastischen Streuung bezeichnet.

Der in Gln. 2.7 eingeführte Vektor  $\mathbf{q} = \mathbf{k} - \mathbf{k}_0$  stellt den Streuvektor dar und dessen Betrag die Raumfrequenz  $q$ . Im weiteren Verlauf wird  $\mathbf{q}$  als Koordinate in der Beugungsebene der Objektivlinse beziehungsweise im Raumfrequenzspektrum der gemessenen Intensitäten verwendet. Zwischen Wellenlänge, Streuwinkel und Raumfrequenz besteht unter der Näherung kleiner Streuwinkel folgender wichtiger Zusammenhang [58, S. 71]:

$$q = \frac{\theta}{\lambda}. \quad (2.9)$$

### Mehrfachstreuung

Die Rekonstruktion eines Objekts aus einer Kippserie erfordert, dass die gemessenen Kontrastintensitäten Projektionen des elektrostatischen Potentials des untersuchten Objekts sind. Diese Bedingung ist dann vollständig erfüllt, wenn nur Kontrastintensitäten einfach gestreuter Elektronen in den Projektionen enthalten sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass bereits gestreute Elektronen bei einer bestimmten Beschleunigungsspannung weitere Male gestreut werden, hängt von der Zusammensetzung und der Dicke des Objekts ab. Aus diesem Zusammenhang folgt die Dickenlimitation der KET.

Der inelastisch gestreute Anteil kann durch Energiefilterung (siehe nächster Abschn.) entfernt werden. Eine Abschätzung der maximalen Objektdicke kann dann über die Betrachtung der mittleren freien Weglänge  $\Lambda$  zwischen zwei elastischen Streuereignissen erfolgen [63]. Beispielsweise beträgt  $\Lambda$  bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV in Kohlenstoff 518 nm (Tab. 2.1). Experimentell sind in der KET Probendicken bis zu etwa 750 nm bei  $U = 300$  kV und mit Energiefilterung zugänglich [16].

Tabelle 2.1: Elastische, mittlere freie Weglänge von Elektronen in Kohlenstoff und Platin in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung [63].

U [kV]	Kohlenstoff [nm]	Platin [nm]
17.3	45.9	3.03
25.2	65.5	3.78
41.5	102	5.41
62.1	145	6.57
81.8	181	7.83
102.2	216	8.95
150	321	10.9
300	518	14.7
750	632	23.6

## Energiefilterung

Der Kontrast einer Projektion kann als Überlagerung der Kontrastanteile dargestellt werden, die jeweils von den ungestreuten beziehungsweise elastisch und inelastisch gestreuten Elektronen erzeugt werden [65]. Jedoch eignet sich der inelastisch gestreute im Vergleich zum elastisch gestreuten Anteil nicht zur Untersuchung eines Objekts mit hoher Auflösung. Angenommen, es soll eine periodische Struktur mit Periodizität  $\tau$  aufgelöst werden, so müsste die untersuchte Struktur bis zu einem Winkel  $\lambda/\tau$  streuen [58, S. 153].

Der charakteristische Streuwinkel der inelastischen Streuung beträgt aber lediglich etwa 0.1 mrad, im Gegensatz zu  $\theta_0$ , der sich um zwei Größenordnungen unterscheidet und etwa 10 mrad beträgt [58, S. 156]. Durch die Erweiterung eines TEM mit einem Energiefilter [66] können jedoch Elektronen, die durch inelastische Streuung einen Energieverlust erlitten haben, aus dem Elektronenstrahl herausgefiltert werden. Dadurch kann der Kontrast der Projektionen beträchtlich verbessert werden [65, 16].

Allgemein können Energiefilter aufgrund ihres Konstruktionsprinzips in drei Klassen aufgeteilt werden: Elektrische und magnetische Energiefilter und darüber hinaus Energiefilter, die elektrische und magnetische Felder kombinieren. Eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Bauweisen wird von Rose et al. [67] gegeben. Das grundlegende Prinzip, beispielsweise eines magnetischen Energiefilters [58, S. 379], beruht auf der Lorentzkraft, die Elektronen, die sich in einem homogenen Magnetfeld  $B$  bewegen, welches senkrecht zu ihrer Bewegungsrichtung angelegt ist, auf eine Kreisbahn mit Radius  $r$  zwingt. Es gilt folgender Zusammenhang [58, S. 23]:

$$r = \frac{\sqrt{2m_0E(1 + \frac{E}{2E_0})}}{eB}. \quad (2.10)$$

Daraus folgt, dass der Radius der Elektronenbahn proportional zur kinetischen Energie der Elektronen ist. Dadurch können Elektronen mit einem Energieverlust  $\Delta E$  mit einer geeigneten Blende mit Breite  $\Xi$  aus dem Elektronenstrahl herausgefiltert werden. Dabei ist  $\Xi$  nach unten nur durch die Energiebreite des Elektronenstrahls begrenzt, die bei einer Feldemissionsquelle etwa im Bereich zwischen 0.2 und 0.5 eV liegt [65]. Mit  $\Xi$  im Bereich zwischen 5 und 20 eV kann der Anteil inelastisch gestreuter Elektronen größtenteils aus einer Projektion herausgefiltert werden, da für die meisten Objekte die Anregungsenergie von Plasmonen  $\gtrsim 5$  eV beträgt [65].

## 2.2 Kontrastentstehung

In diesem Abschnitt wird dargestellt, durch welche Mechanismen Bildkontrast durch ein TEM erzeugt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein Bild dann als Projektion bezeichnet, wenn die folgenden Aufnahmebedingungen gelten: Erstens, das Bild wurde unter Niedrigdosisbedingungen erstellt. Zweitens, das untersuchte, organische Objekt hat eine Dicke, die unter der elastischen, mittleren freien Weglänge der abbildenden Elektronen in Kohlenstoff liegt. Drittens, das Bild wurde nach Energiefilterung des Elektronenstrahls aufgenommen.

Ein Beispiel für eine Projektion ist in Abb. 2.2 dargestellt. In der gemessenen Intensität sind zwei fundamental unterschiedliche Kontrastmechanismen realisiert, namentlich Amplitudenkontrast und Phasenkontrast, die aber trotz ihrer Unterschiedlichkeit gemeinsam durch die *CTF* beschrieben werden können. Betrachtet man die Wechselwirkung der einfallenden Elektronen mit den Atomen des Objekts, so kann der Amplitudenkontrast innerhalb des Teilchenbildes und der Phasenkontrast innerhalb des Wellenbildes verstanden werden.

### Amplitudenkontrast

Den grundlegenden Mechanismus des Amplitudenkontrasts bildet die Absorption von Elektronen, die mit Streuwinkeln  $\theta \geq \alpha_0$  gestreut wurden, durch die Objektivblende des TEM. Dabei nimmt der Anteil der Elektronen, die durch die Objektivblende transmittiert werden ( $\theta < \alpha_0$ ), abhängig von der Kernladungszahl  $Z$  der im Streuprozess beteiligten Atome ab.

Der Winkel  $\alpha_0$  wird als Objektivapertur bezeichnet und liegt typischerweise im Bereich zwischen 4 und 40 mrad [65]. Näherungsweise gilt  $\alpha_0 \approx r_0/f_0$ , wobei  $r_0$  den Radius der Objektivblende und  $f_0$  ihren Abstand zur Objektivlinse bezeichnet [58, S. 114].

Durch die Objektivblende wird Streukontrast in Amplitudenkontrast umgewandelt, der in der Bildebene des TEM mit einem Detektor aufgezeichnet werden kann. Dabei entstehen Bereiche der Projektion mit niedriger Intensität durch das Nichtvorhandensein von Elektronen, die auf ihrem Weg durch die Probe an schweren Elementen mit großen Streuwinkeln gestreut wurden. Nahezu alle Kontrastanteile einer Projektion, die im mittleren Auflösungsbereich ( $\gtrsim 2 - 3$  nm) liegen, werden durch diesen Mechanismus erzeugt [63]. Gerade auch die Goldpartikel, die der Probe als Referenzpunkte zur Aligrierung einer Kippserie zugegeben werden, sind durch ihren starken Amplitudenkontrast auch in extrem verrauschten Projektionen klar erkennbar.

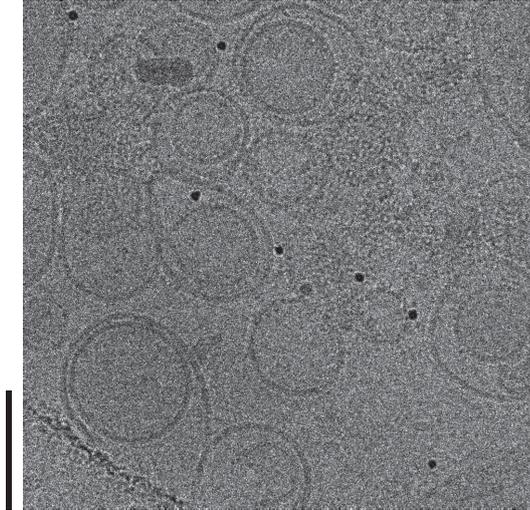


Abbildung 2.2: Beispiel für eine energiegefilterte Projektion, die unter Niedrigdosisbedingung aufgenommen wurde. Das Objekt besitzt eine Dicke von etwa 130 nm und besteht aus vitrifizierten Liposomen, in deren Lipiddoppelschicht MspA rekonstituiert wurde. Der Probe wurden zur Alignierung der Kippserie Goldpartikel zugemischt. Sie werden hauptsächlich im Amplitudenkontrast abgebildet, während die Liposomen hauptsächlich im Phasenkontrast abgebildet werden. Die Pixelgröße der Projektion beträgt  $2.1 \text{ \AA}$  bei einer Vergrößerung von  $61000\times$ . Anmerkung: Die Projektion ist verkleinert wiedergegeben. Die Interpolation wirkt dabei als Entrauschungsfilter, der gleichzeitig die Auflösung der Projektion limitiert. Die Abbildung soll die Kontrastunterschiede zwischen Amplituden- und Phasenkontraststrukturen illustrieren, aber nicht den Rauschgehalt der Originalprojektion. Maßstab, 100 nm.

Durch Kontrastierung der Probe mit Schwermetallsalzen (*Staining*) [68], einer Standardtechnik der klassischen Elektronenmikroskopie an biologischen Strukturen, werden diese mit schweren Elementen umschlossen und dadurch ein hohes Maß an Amplitudenkontrast erzeugt. Jedoch wird dadurch der native Zustand der untersuchten Struktur zerstört und die Auflösung ist beschränkt auf etwa 2 nm [63, 69].

### Phasenkontrast

Der grundlegende Mechanismus des Phasenkontrasts hingegen ist nicht Absorption, sondern Interferenz. Die Phasenkontrastanteile einer Projektion generieren hochaufgelöste Strukturinformation ( $< 2 \text{ nm}$ ) über das untersuchte Objekt. Dabei wird die Phaseninformation, die in der Objektwellenfunktion  $\psi_S$  enthalten ist, durch Interferenz in der Bildebene des TEM in Intensitätsvariationen umgewandelt, die mit einem Detektor gemessen werden können.

Die Objektwellenfunktion  $\psi_S$  kann als Überlagerung zwischen der einfallenden Welle mit Amplitude  $\psi_0$  und einer im Bildpunkt  $P$ , durch ein Atom des Objekts erzeugten, kugelförmigen Welle mit Amplitude  $\psi_0 f(\theta)$  betrachtet werden. Dieser Anteil ist gegenüber dem Ersten um  $\pi/2$  phasenverschoben und enthält die Phaseninformation über das streuende Atom in einer zusätzlichen Phasenverschiebung  $\eta(\theta)$ . Eine ideale Objektivlinse, frei von jeglichen Aberrationen, würde nun den kugelförmigen Anteil durch eine bestimmte Phasenverschiebung in eine weitere Kugelwelle umwandeln, die unter einer bestimmten Vergrößerung im Bildpunkt  $P'$  konvergiert und dort mit dem Primärstrahl interferiert.

Bezeichne nun  $\psi_i$  die Amplitude der ungestreuten, ebenen Welle und  $\psi_{sc}$  die Amplitude der gestreuten, kugelförmigen Welle in der Bildebene des TEM. Unter der Voraussetzung einer idealen Linse gilt dann für die gemessene Intensität [58, S. 199]:

$$I_M = |\psi_i + i\psi_{sc}|^2. \quad (2.11)$$

Da aber die zusätzliche Phasenverschiebung  $\eta(\theta)$  für leichte Elemente vernachlässigbar klein ist, unterscheidet sich  $I_M$  nur unwesentlich von der Intensität  $I_0 = |\psi_i|^2$  des Primärstrahls und Phasenobjekte bleiben unsichtbar [58, S. 199]:

$$\psi_{sc} \ll \psi_i \implies I_M \approx I_0. \quad (2.12)$$

Gelänge es nun aber, die Phase der gestreuten Welle um weitere  $\pi/2$  beziehungsweise  $3\pi/2$  ( $-\pi/2$ ) zu drehen, so würden sich  $I_M$  und  $I_0$  unterscheiden und Bildkontrast leichter Elemente könnte beobachtet werden. Der erste Fall ( $I < I_0$ ) wird dabei als positiver Phasenkontrast und der zweite Fall ( $I > I_0$ ) als negativer Phasenkontrast bezeichnet.

In der Tat kann eine Phasendrehung dieser Art durch eine Zernike Phasenplatte erzeugt werden. Diese besteht in der Elektronenmikroskopie aus einer Folie aus Kohlenstoff, die in die Beugungsebene der Objektivlinse eingebracht wird und in ihrem Zentrum ein Loch enthält, durch das der Primärstrahl unverändert hindurchgeht. Die Phasenverschiebung wird dabei durch das innere Potential der Phasenplatte hervorgerufen. Zum Beispiel müsste die Folie eine Dicke von 23 nm besitzen, um bei einer Beschleunigungsspannung von 100 keV eine Phasendrehung von  $\pi/2$  zu bewirken [58, S. 200]. Dieser Ansatz zur Phasenkontrasterzeugung hat sich in der KET in den letzten Jahren beeindruckend weiterentwickelt [70, 71].

Hauptsächlich jedoch wird Phasenkontrast in der KET durch das Zusammenspiel aus Defokussierung des Objekts und der sphärischen Aberration der Objektivlinse erzeugt. Aufgrund sphärischer Aberration entsteht nach der Objektivlinse eine Kugelwelle, deren Wellenfronten, abhängig vom Abstand zur optischen Achse stärker gekrümmt werden. Relativ zur optischen Achse resultiert daraus eine Winkelabweichung zwischen den Elektronentrajektorien, die jeweils durch eine ideale Linse beziehungsweise durch eine Linse mit sphärischer Aberration erzeugt würden. Diese Winkelabweichung zieht eine Änderung der optischen Pfadlänge und damit letztlich eine bestimmte Phasenverschiebung nach sich.

Die gesamte Winkelabweichung  $\varepsilon$  ist dabei die Summe aus drei einzelnen Winkelabweichungen, die folgendermaßen zustande kommen: Erstens, die Winkelabweichung  $\varepsilon_s$ , die durch die sphärische Aberration der Linse hervorgerufen wird. Zweitens, die Winkelabweichung  $\varepsilon_a$ , die durch eine Abstandsänderung zwischen Objekt und Linse in Richtung der optischen Achse verursacht wird. Drittens, die Winkelabweichung  $\varepsilon_f$ , die durch eine Änderung der Fokusslänge der Linse erzeugt wird. Für die gesamte Winkelabweichung  $\varepsilon$  ergibt sich in der Summe [58, S. 81]:

$$\varepsilon = \varepsilon_s + \varepsilon_a + \varepsilon_f = C_s \left( \frac{R^3}{f^4} \right) - (\Delta f - \Delta a) \left( \frac{R}{f^2} \right), \quad (2.13)$$

wobei  $C_s$  als sphärischer Aberrationskoeffizient bezeichnet wird, der für elektronenmikroskopische Objektivlinsen zwischen 0.5 und 4 mm beträgt [58, S. 38]. Darüber hinaus enthält die Gleichung folgende Faktoren:  $R$  ist der Abstand zwischen optischer Achse und Durchgangspunkt einer Elektronentrajektorie durch die Linse,  $f$  ist die Fokusslänge der Linse,  $\Delta f$  ist die Änderung der Fokusslänge und  $\Delta a$  die Änderung der Objektposition.

Die Winkelabweichung  $\varepsilon$  verursacht eine Änderung der optischen Pfadlänge  $ds$  einer Elektronentrajektorie in Abhängigkeit von einer Änderung des Durchgangspunkts  $dR$  durch die Objektivlinse. Durch Integration über alle Pfadlängenunterschiede  $ds = \varepsilon dR$  kann der gesamte Pfadlängenunterschied und daraus schließlich die gesamte Phasendrehung erhalten werden. Unter Verwendung der Raumfrequenz (Gln. 2.9) folgt [58, S. 82]:

$$W(q, \Delta z) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^R \varepsilon dR = \pi \lambda q^2 \left( \frac{1}{2} C_s \lambda^2 q^2 - \Delta z \right), \quad \text{Scherzer-Formel} \quad (2.14)$$

wobei  $\Delta z = \Delta f - \Delta a$  gerade die Defokussierung des Objekts angibt. Typischerweise liegen die verwendeten Defokuswerte in der KET zwischen  $-2$  und  $-12 \mu\text{m}$  (Unterfokus). Obige Gleichung wurde zuerst von Scherzer et al. [72] hergeleitet und ist von fundamentaler Bedeutung für die Elektronenmikroskopie. Sie beschreibt die zusätzliche Phasendrehung der Objektwellenfunktion  $\psi_S$  durch eine Objektivlinse mit sphärischer Aberration in Abhängigkeit vom Defokus  $\Delta z$  des Objekts.

Diese Phasenverschiebung wiederum stellt den eigentlichen Mechanismus für die Entstehung von Phasenkontrast in der KET dar. Dies bedeutet aber auch, dass nicht das gesamte Raumfrequenzspektrum mit maximalem positivem beziehungsweise negativem Phasenkontrast abgebildet wird. Nur die Raumfrequenzen, bei denen die Phasenverschiebung  $W(q, \Delta z)$  gerade ein ganzzahliges Vielfaches von  $\pi/2$  beträgt, werden mit maximalem Phasenkontrast abgebildet [58, S. 200]:

$$W(q, \Delta z) \stackrel{!}{=} (2m - 1) \frac{\pi}{2} \begin{cases} m = \text{gerade:} & \text{maximaler negativer Phasenkontrast} \\ m = \text{ungerade:} & \text{maximaler positiver Phasenkontrast.} \end{cases} \quad (2.15)$$

Jedoch werden Raumfrequenzen, deren Phasenverschiebung  $W(q, \Delta z)$  ein ganzzahliges Vielfaches von  $\pi$  beträgt, nicht abgebildet.

## 2.3 Transferfunktionen

Beide Kontrastmechanismen, sowohl Amplitudenkontrast als auch Phasenkontrast, können in einer Gleichung, welche die Bildentstehung im TEM beschreibt, zusammengefasst werden. Sei dazu  $F(q)$  die Wellenfunktion in der Beugungsebene der Objektivlinse. Sie wird durch Fourier-Transformation aus der Objektwellenfunktion  $\psi_S$  erhalten [73]. Diese Wellenfunktion wird nun in der Beugungsebene durch die Phasendrehung  $W(q, \Delta z)$  moduliert. Gleichzeitig kann aber die Objektivblende als multiplikative Maskenfunktion  $M(q)$  berücksichtigt werden. Die gesuchte Wellenfunktion  $\psi_M$  in der Bildebene des TEM wird schließlich unter Beachtung der Vergrößerung  $M$  durch inverse Fourier-Transformation [73] der modifizierten Wellenfunktion in der Beugungsebene erhalten [58, S. 84]:

$$\psi_M = \frac{1}{M} \int \int F(q) \underbrace{\{e^{-iW(q, \Delta z)} M(q)\}}_{H(q, \Delta z)} e^{2\pi i \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} d^2 \mathbf{q}. \quad (2.16)$$

Dabei ist die Maskenfunktion  $M(q)$  wie folgt definiert [58, S. 84]:

$$M(q) = \begin{cases} 1 & \text{falls } q < q_0 \\ 0 & \text{falls } q \geq q_0 \end{cases} \quad \text{mit} \quad q_0 = \frac{\alpha_0}{\lambda}. \quad (2.17)$$

Die mathematische Struktur obiger Gleichung entspricht einer Faltung der Objektwellenfunktion  $\psi_S$  mit der von  $W(q, \Delta z)$  und  $M(q)$  erzeugten Punktverbreiterungsfunktion, die durch inverse Fourier-Transformation aus  $H(q, \Delta z)$  hervorgeht [58, S. 84]. Dies hat die Konsequenz, dass ein punktförmiges Objekt nicht auf einen ebenso punktförmigen Bildpunkt abgebildet wird. Vielmehr enthält jeder Bildpunkt sowohl Informationen über das Objekt als auch über den Abbildungsprozess.

Von nun an wird die Fourier-Transformation mit dem Operator  $\mathcal{F}$  und die inverse Fourier-Transformation mit dem Operator  $\mathcal{F}^{-1}$  bezeichnet. Damit ist insbesondere die diskrete Fourier-Transformation, sowohl von zweidimensionalen (2D) Bildern (Projektionen, Schnitten, Powerspektren etc.), als auch von 3D Volumen (Tomogrammen, Subtomogrammen, Mittelungen etc.) gemeint.

### Kontrasttransferfunktion

Anders ausgedrückt, verhält sich ein TEM wie ein linearer Filter<sup>1</sup> des Raumfrequenzspektrums des untersuchten Objekts [63]. Die *CTF* beschreibt nun die genauen Eigenschaften dieses Filters [74, 75] im Raumfrequenzspektrum  $\mathcal{F}\{I_M\}$  der gemessenen Intensität  $I_M$ . Der Ausgangspunkt für die Herleitung der *CTF* besteht in der Annahme eines Objekts, das nur eine Raumfrequenz  $q$  besitzt. Dann kann, unter der Voraussetzung, das Objekt verhalte sich sowohl wie ein schwaches Amplituden- als auch wie ein schwaches Phasenkontrastobjekt, die Objektwellenfunktion  $\psi_S$  in eine Taylorreihe entwickelt werden [58, S. 217]:

$$\psi_S = 1 - \varepsilon_q \cos(2\pi qx) + i\varphi_q \cos(2\pi qx) + \dots, \quad (2.18)$$

wobei  $\varepsilon_q$  die Amplitudenmodulation ( $\varepsilon_q \ll 1$ ) und  $\varphi_q$  die Phasendrehung ( $\varphi_q \ll 1$ ) durch das Objekt bezeichnen. Die Objektwellenfunktion  $\psi_S$  hat dann in der Beugungsebene folgende Gestalt [58, S. 217]:

$$F(\pm q) = \frac{1}{2}(-\varepsilon_q + i\varphi_q). \quad (2.19)$$

Die Wellenfunktion  $\psi_M$  in der Bildebene kann nun unter Verwendung von Gln. 2.16 berechnet werden. Sei dazu die Vergrößerung auf Eins normalisiert und die Maskenfunktion auf vollständige Transmission eingestellt. Für die gemessene Intensität  $I_M$  in der Bildebene folgt unter Vernachlässigung des quadratischen Terms [58, S. 218]:

$$I_M = 1 + ACTF(q) \varepsilon_q \cos(2\pi qx') + PCTF(q) \varphi_q \cos(2\pi qx'). \quad (2.20)$$

---

<sup>1</sup>Diese Aussage gilt unter der Voraussetzung, dass außer der sphärischen Aberration andere Aberrationen [58, S. 37 ff] vernachlässigt werden können. Beispielsweise kann Astigmatismus durch Alignierung des TEM behoben werden und Kontrastanteile chromatischer Aberration können durch Energiefilterung entfernt werden [65].

Dabei sind die Amplitudenkontrasttransferfunktion  $ACTF$  und die Phasenkontrasttransferfunktion  $PCTF$  wie folgt definiert [58, S. 218]:

$$ACTF(q, \Delta z) = -2 \cos W(q, \Delta z), \quad \text{Amplitudenkontrasttransferfunktion} \quad (2.21)$$

$$PCTF(q, \Delta z) = +2 \sin W(q, \Delta z). \quad \text{Phasenkontrasttransferfunktion} \quad (2.22)$$

Beide Transferfunktionen zusammengenommen bilden schließlich die  $CTF$ . Sei dazu  $A = \varepsilon_q/\varphi_q$  als das Verhältnis von Amplitudenkontrast zu Phasenkontrast definiert. Dann folgt für die Definition der  $CTF$  [76]:

$$CTF(q, \Delta z) = 2 \left( \sin W(q, \Delta z) - A \cos W(q, \Delta z) \right). \quad \text{Kontrasttransferfunktion} \quad (2.23)$$

Diese Gleichung ist von ebenso fundamentaler Bedeutung für die Elektronenmikroskopie, wie die in ihr enthaltene Scherzer-Formel. Sie ist die vollständige Beschreibung der Modulation des Raumfrequenzspektrums der Projektionen eines schwachen Phasenobjekts durch die Abbildung im TEM (Abb. 2.3). Die  $CTF$  ist dabei lediglich von vier Parametern abhängig: Dem Verhältnis von Amplitudenkontrast zu Phasenkontrast  $A$ , dem sphärischen Aberrationskoeffizient der Objektivlinse  $C_s$ , der Beschleunigungsspannung  $U$  und schließlich der Defokussierung des Objekts  $\Delta z$ .

Der Wert von  $A$  ist abhängig vom Objekt [77] und rangiert von 0.07 [78, 79] bis 0.14 [80] für eiseingebettete Proteine und bis zu 0.35 [81] für kontrastierte Proteine. Die  $CTF$  kann ihrerseits noch um weitere Dämpfungsfunktionen erweitert werden, mit denen beispielsweise die Auswirkungen von räumlicher Ausdehnung der Elektronenquelle, Probedrift und Probenaufladung auf das Raumfrequenzspektrum modelliert werden können [76]. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Effekte vernachlässigt. Jedoch wurde die weitaus stärkere Dämpfung durch die  $MTF$  berücksichtigt.

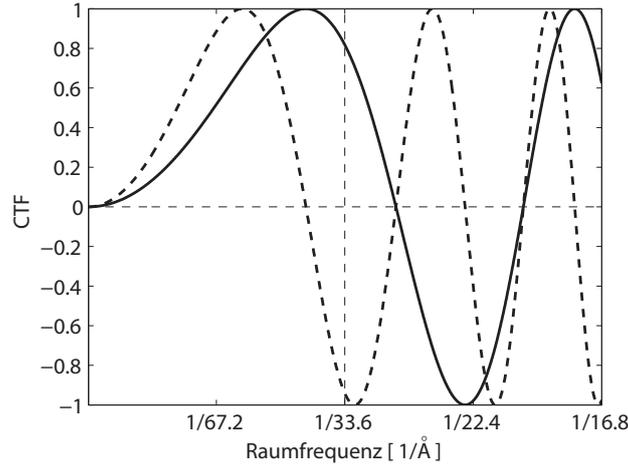


Abbildung 2.3: Die  $CTF$  induziert oszillatorische Phasenumkehrungen im Raumfrequenzspektrum der Projektionen. Raumfrequenzen, die den Nullstellen der  $CTF$  entsprechen, sind in den Projektionen nicht enthalten. Die durchgezogene  $CTF$  besitzt einen Defokus von  $-4\ \mu\text{m}$ , die gestrichelte  $CTF$  von  $-8\ \mu\text{m}$ . Das Verhältnis von Amplitudenkontrast zu Phasenkontrast ist auf Null gesetzt ( $A = 0$ , reiner Phasenkontrast). Im ersten Fall ist die Auflösung durch die erste Nullstelle der  $CTF$  auf  $\sim 28\ \text{\AA}$ , im zweiten Fall auf  $\sim 40\ \text{\AA}$  beschränkt. Es wurden folgende Mikroskopparameter angenommen: sphärischer Aberrationskoeffizient der Objektivlinse  $2.0\ \text{mm}$ , Beschleunigungsspannung  $300\ \text{kV}$ , Pixelgröße  $8.4\ \text{\AA}$ . Die horizontale, gestrichelte Linie markiert die halbe Nyquist-Frequenz.

Die Auflösungslimitierung einer Projektion, eines Tomogramms, eines Subtomogramms und schließlich einer Mittelung ist durch die erste Nullstelle der  $CTF$  gegeben. Ab dieser Raumfrequenz ist die Abbildung nicht mehr interpretierbar, da sich positive und negative Phasenbereiche oszillatorisch abwechseln. Dennoch ist die Strukturinformation über das Objekt im Raumfrequenzspektrum, bis auf die Nullstellen der  $CTF$ , vollständig enthalten [18]. Die Strukturinformation muss nur richtig entschlüsselt werden und dieser Schlüssel ist das Wissen über die Defokussierung des Objekts  $\Delta z$ .

Angenommen, diese ist bekannt, dann kann das Raumfrequenzspektrum invers (unter Beachtung der Nullstellen) mit der passenden  $CTF$  gefiltert werden [19] und damit die durch den Abbildungsprozess induzierte Punktdeformation und Auflösungsbegrenzung entfernt werden. Unter günstigen Voraussetzungen kann der Defokus aus dem Powerspektrum  $|\mathcal{F}\{p\}|^2$  der Projektion  $p$  direkt bestimmt werden, insbesondere wenn das Objekt dünn ( $< 100\ \text{nm}$ ) und die Elektronendosis hoch ist ( $> 20\ \text{e}^-/\text{\AA}^2$ ). Beide Eigenschaften treffen jedoch auf die KET nicht zu (Abb. 2.4).

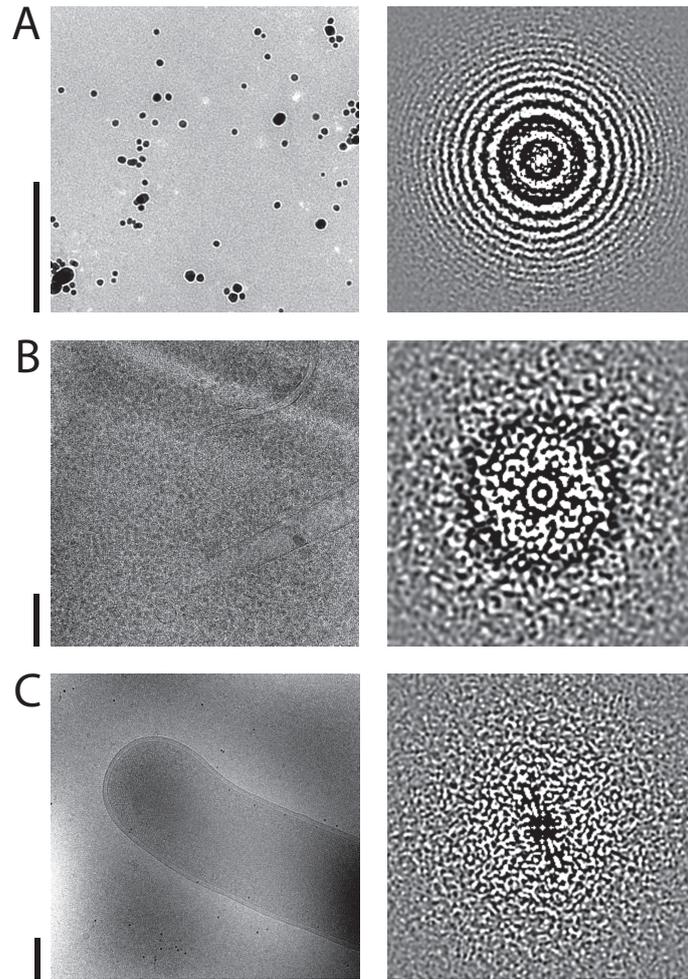


Abbildung 2.4: Visualisierung der Powerspektren (rechte Spalte) verschiedener Projektionen (linke Spalte). Die Nullstellen der *CTF* erzeugen im Powerspektrum schwarze Ringe, die als Thon-Ringe bezeichnet werden und zur Defokussmessung verwendet werden können. Mit zunehmender Objektstärke und abnehmender Elektronendosis verschwinden die Thon-Ringe im Rauschen des Powerspektrums. Der Kippwinkel der dargestellten Projektionen beträgt  $0^\circ$ . **A** Projektion einer Kohlefolie mit Goldpartikeln. Objektstärke  $\sim 10$  nm, Elektronendosis  $\sim 20$   $e^-/\text{\AA}^2$ , Pixelgröße  $2.3$   $\text{\AA}$ . Im Spektrum können Thon-Ringe bis zur dreizehnten Nullstelle der *CTF* klar erkannt werden. **B** Die Projektion stammt aus der Kippserie, die Tomogramm  $T_0$  zugrundeliegt. Objektstärke  $\sim 180$  nm, Elektronendosis  $\sim 0.6$   $e^-/\text{\AA}^2$ , Pixelgröße  $5.72$   $\text{\AA}$ . Nur noch der Thon-Ring erster Ordnung ist erkennbar. **C** Projektion einer *E. coli* Zelle. Objektstärke  $\sim 500$  nm, Elektronendosis  $\sim 0.5$   $e^-/\text{\AA}^2$ , Pixelgröße  $7.13$   $\text{\AA}$ . Im Spektrum können keine Thon-Ringe mehr erkannt werden. Maßstab, jeweils  $200$  nm.

Die Nullstellen der *CTF* äußern sich im Powerspektrum als schwarze (per Definition!) Ringe, die als Thon-Ringe bezeichnet werden [82]. Durch Anpassung einer theoretischen *CTF* an die Thon-Ringe [76, 18, 77] kann der Defokus bestimmt und  $I_M$  entsprechend korrigiert werden [19]. Wahrscheinlich jede hoch aufgelöste, durch Einzelpartikelanalyse gewonnene Struktur eines makromolekularen Komplex [83] oder Virus [84] wurde auf diese Weise im Hinblick auf die *CTF* korrigiert. Das Objekt in der Einzelpartikelanalyse ist jedoch dünn und die Elektronendosis einer ganzen Kippserie kann in nur einer Projektion konzentriert werden. Eine interessante, methodische Variante dieser grundlegenden Herangehensweise an die *CTF*-Korrektur in der Einzelpartikelanalyse ist in der Arbeit von Sander et al. [85] dargestellt. Hier ist der Defokusbemessung eine Klassifikation und Mittelung der betrachteten Powerspektren vorgeschaltet. Auf diese Weise kann das Signal der Powerspektren erhöht und die Defokusbemessgenauigkeit gesteigert werden.

Der deutlichste Unterschied zwischen Einzelpartikelanalyse und KET ist im Hinblick auf die *CTF*-Korrektur jedoch durch den Defokusgradienten gegeben, der durch die Kippung des Objekts geometrisch generiert wird. Dabei befinden sich abhängig von der räumlichen Orientierung des Objekts bestimmte Bereiche näher an der Fokusebene, während andere Bereiche weiter von ihr entfernt sind. Daher kann im Gegensatz zur Einzelpartikelanalyse die Punktverbreiterungsfunktion in der KET nicht mehr als räumlich invariant angesehen werden.

### Modulationstransferfunktion

In der KET werden als Detektoren zur Aufzeichnung einer Projektion hauptsächlich CCD-Kameras eingesetzt [86]. Diese sind aus drei Schichten aufgebaut: In der ersten Schicht, dem Szintillator [87], werden die einfallenden Elektronen in Photonen umgewandelt; diese werden dann in der zweiten Schicht durch eine Glasfaseroptik auf die dritte Schicht, den eigentlichen CCD-Sensor geleitet. Die Auflösung einer CCD-Kamera wird hauptsächlich durch die Diffusion der einfallenden Elektronen im Szintillator und der numerischen Apertur der Glasfaseroptik bestimmt. Zusammengenommen führen diese beiden Effekte zu einer weiteren Punktverbreiterungsfunktion in der KET, deren Transferfunktion als *MTF* [88] bezeichnet wird.

Im Gegensatz zur *CTF* lässt sich die *MTF* ohne tiefgehende Schwierigkeiten messen. Eine Standardmethode dafür ist die Kantenmethode [89]. Dabei wird eine scharfe Kante in den Strahlengang des TEM eingebracht und abgebildet (Abb. 2.5).



Abbildung 2.5: Kantenbild. Verwendeter Detektor:  $2\text{ k} \times 2\text{ k}$  Multiscan CCD-Kamera (Gatan). Pixelgröße:  $30\ \mu\text{m}$ . Maßstab:  $15\ \text{mm}$ .

Die beobachtete Verbreiterung der Kante wird als Kantenverbreiterungsfunktion (*Edge spread function*,  $ESF$ ) bezeichnet. Aus dieser läßt sich dann die  $MTF$  durch Fourier-Transformation bestimmen [90]:

$$MTF = \mathcal{F}\left\{\frac{d}{dn_{\perp}}ESF\right\}, \quad (2.24)$$

wobei  $n_{\perp}$  die Richtung senkrecht zur Kante bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde folgendes Modell zur mathematischen Beschreibung einer  $MTF$  verwendet: Es wurde näherungsweise angenommen, die  $MTF$  dämpfe das Raumfrequenzspektrum der Projektionen exponentiell:

$$MTF(q, \sigma) = e^{-\frac{q}{\sigma}}, \quad (2.25)$$

wobei  $\sigma$  als Abklingfaktor der CCD-Kamera bezeichnet wird. Dieser wird durch Anpassung des Modells an die gemessene  $MTF$  erhalten. In Abb. 2.6 ist Messung und Modell der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten CCD-Kamera dargestellt.

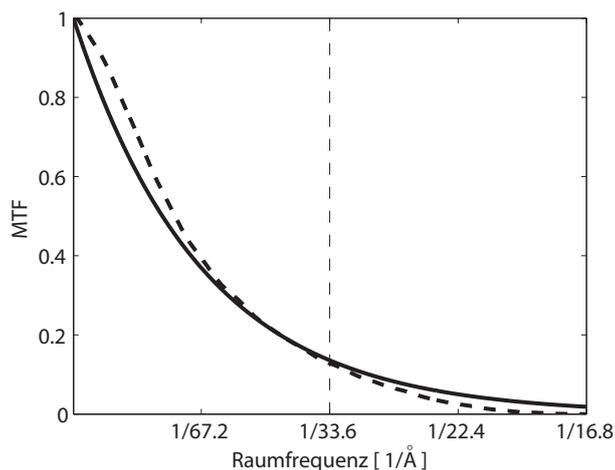


Abbildung 2.6: Die  $MTF$  induziert näherungsweise eine exponentielle Dämpfung des Raumfrequenzspektrums der Projektionen. Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf der mittels der Kantenmethode gemessenen  $MTF$  wieder. Die durchgezogene Linie gibt die mittels exponentieller Dämpfung modellierte  $MTF$  wieder. Dabei wurde der Abklingfaktor  $\sigma$  mit  $(1/4)\nu$  bestimmt, wobei  $\nu$  die Nyquist-Frequenz bezeichnet. Die modellierte  $MTF$  unterschätzt den Signalübertrag bei tiefen und überschätzt den Signalübertrag bei hohen Frequenzen geringfügig. Bei der hier verwendeten  $2\text{ k} \times 2\text{ k}$  Multiscan CCD-Kamera (Gatan) fällt die Signalübertragung bei  $(1/2)\nu$  (horizontale, gestrichelte Linie) auf etwa 13% des Ausgangswertes ab.

In den letzten Jahren wurden Kameras entwickelt und zur Marktreife gebracht, die auf einer direkten Elektronendetektion [91, 92, 93] ohne zwischengeschalteten Szintillator beruhen. Diese Kameras werden als DDD-Kameras bezeichnet (*Direct detection device*, DDD). Beispielsweise berichtet Gatan über seine neue K2 DDD-Kamera, dass die  $MTF$  bei der halben Nyquist-Frequenz auf lediglich etwa 33% des Ausgangswertes abfällt [94].

## 2.4 Aufnahme einer Kippserie

Die Schwierigkeit bei der Aufnahme einer Kippserie erwächst aus der mechanischen Ungenauigkeit der Kippbühne [95]. Während der Kippung der Probe verspringt diese zufällig in alle drei Raumrichtungen. Abhängig von der Kippbühne liegen diese Verschiebungen heutzutage etwa im Bereich von  $\pm 500$  nm (im Gegensatz zu etwa  $\pm 1$   $\mu$ m in den 1990er Jahren [96]), wobei ihre Größe tendenziell mit der Größe des Betrags des Kippwinkels oder durch Umkehr der Kipprichtung zunimmt.

Angenommen, diese zufälligen Verschiebungen der Probe würden nicht korrigiert, dann beschriebe der Schwerpunkt des Objekts während der Aufnahme einer Kippserie eine 3D Zufallsbewegung (*Random walk*). Abhängig vom Verhältnis zwischen der Genauigkeit der Kippbühne und der Bildgröße stiege die Wahrscheinlichkeit, dass das Objekt in  $xy$ -Richtung aus dem Aufnahmebereich der Kippserie herauswandert. Zumindest eine automatische Aufnahme einer Kippserie bei Vergrößerungen  $\gtrsim 1000 \times$  [96] wäre dann nicht mehr möglich. Darüber hinaus verlöre das Objekt in  $z$ -Richtung seinen vor Aufnahme der Kippserie durch Autofokussierung (siehe unten) eingestellten Defokus.

Freilich darf das zur Korrektur dieser Verschiebungen eingesetzte Verfahren das Objekt keiner zusätzlichen Elektronendosis aussetzen. Die automatisierte Aufnahme einer Kippserie unter Niedrigdosisbedingung beruht nun auf der Idee [96, 97], die zur Korrektur der Verschiebungen benötigten zusätzlichen Bilder an einer zusätzlichen Probenstelle aufzunehmen, wobei diese entlang der Kippachse in ausreichender Entfernung ( $\sim 4$   $\mu$ m, abhängig vom Durchmesser des Elektronenstrahls) von der eigentlichen Aufnahmestelle des Objekts platziert wird, um Strahlenschaden zu vermeiden (Abb. 2.7).

Die Platzierung der zusätzlichen Aufnahmestelle erfolgt dabei über das Strahlverschiebungssystem des TEM, das bei höheren Vergrößerungen ( $> 27500 \times$ ) eine Reichweite von  $36$   $\mu$ m<sup>2</sup> um die optische Achse besitzt [97]. Dabei zeichnen sich Probenstellen entlang der Kippachse durch ihre Stationarität relativ zum Strahlverschiebungssystem aus, da ihre Position während der Aufnahme der Kippserie nur abhängig von den zufälligen Verschiebungen, aber unabhängig vom Kippwinkel der Probe ist.

Die eigentliche Korrektur der Verschiebungen wird in zwei Operationen aufgeteilt: Erstens, die als Zentrierung bezeichnete Korrektur des Verschiebungsanteils in  $xy$ -Richtung. Zweitens, die als Autofokussierung bezeichnete Korrektur des Verschiebungsanteils in  $z$ -Richtung. Die Probenstelle wird, je nach Operation, die auf ihr ausgeführt wird, als Zentrierungs- beziehungsweise Autofokussierungsstelle bezeichnet.

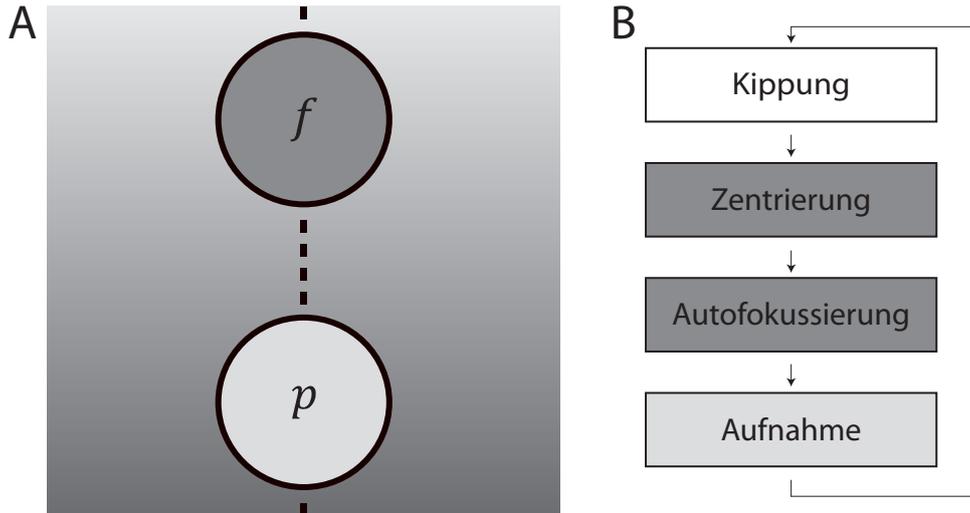


Abbildung 2.7: **A** Schematische Darstellung des Aufnahmeschemas einer Kippserie unter Niedrigdosisbedingung. Die Probenstelle  $f$  wird für Zentrierung und Autofokussierung verwendet. Diese ist entlang der Kippachse, als gestrichelte Linie eingezeichnet, in ausreichender Entfernung ( $\sim 4 \mu\text{m}$ ) von der Objektstelle  $p$  platziert, um Strahlenschaden zu vermeiden. Die Probe ist im Hintergrund als Grauverlauf dargestellt. Damit soll illustriert werden, dass im Allgemeinen die Probe entlang der Kippachse um einen bestimmten Winkel geneigt sein kann. Dadurch unterscheidet sich die eigentliche Defokussierung des Objekts bis zu einem bestimmten Grad vom durch Autofokussierung eingestellten Defokus. **B** Ablaufschema der Aufnahme einer Kippserie. Das Objekt wird im Schritt  $i$  um den Kippwinkel  $\vartheta_i$  gekippt und verspringt dabei zufällig. Im ersten Korrekturschritt wird durch Zentrierung der Verschiebungsanteil in  $xy$ -Richtung korrigiert. Dann wird durch Autofokussierung der Verschiebungsanteil in  $z$ -Richtung korrigiert. Schließlich wird die Projektion  $p_i$  des untersuchten Objekts unter Niedrigdosisbedingung aufgenommen.

Die Zentrierungsoperation ist nun wie folgt realisiert [96]: Die im Schritt  $i$  von der Zentrierungs-Stelle aufgenommene Projektion wird durch Auswertung der Kreuzkorrelationsfunktion auf die im Schritt  $i - 1$  aufgenommene Projektion registriert und die dabei berechnete Verschiebung wird über das Strahlverschiebungssystem des TEM ausgeglichen. Es sei angemerkt, dass die Registrierung von Bildern durch Kreuzkorrelation eine der wichtigsten Techniken der Bildverarbeitung in der Elektronenmikroskopie darstellt. Sie wird im Abschn. 2.7 näher beschrieben.

Für die Genauigkeit der Registrierung ist es entscheidend, die relative Stauchung der Bilder zueinander in der Richtung orthogonal zur Kippachse aufgrund der Kippung des Objekts zu kompensieren [98]. Hierzu wird das im Schritt  $i$  aufgenommene Bild orthogonal zur Kippachse um einen Faktor  $\cos \vartheta_{i-1} / \cos \vartheta_i$  gedehnt und dann die Registrierung

mit dem auf diese Weise korrigierten Bild durchgeführt. Hierbei bezeichnet  $\vartheta_{i-1}$  den Kippwinkel im Schritt  $i - 1$  und  $\vartheta_i$  den Kippwinkel im Schritt  $i$ .

Bei der Umsetzung des Autofokus [99, 100, 97] wird das Strahlkippsystem des TEM genutzt. Dabei wird verwendet, dass durch eine Strahlkippsung um den Winkel  $\beta$  eine Bildverschiebung  $d$  hervorgerufen wird, die linear mit  $\Delta z$  verknüpft ist [100]:

$$d = M(C_s\beta^2 - \Delta z)\beta. \quad (2.26)$$

Streng genommen ist diese Gleichung nur für den Fall reinen Amplitudenkontrasts gültig. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von Astigmatismus und Fehlalignierung des Elektronenstrahls vernachlässigt. Auf die Herleitung der Autofokussierungsgleichung für Phasenkontrast [100] wird an dieser Stelle verzichtet, da diese durch Tiefpassfilterung in obige Gleichung übergeht.

Die Autofokussierungsoperation wird nun iterativ realisiert. Durch Strahlkippsung  $\beta$  wird eine Bildverschiebung  $d$  induziert, die durch Auswertung der Kreuzkorrelationsfunktion gemessen wird. Dadurch kann auf den Defokus  $\Delta z$  geschlossen werden, der dann entsprechend angepasst wird. Diese Schleife wird solange wiederholt bis die angestrebte Defokussierung des Objekts innerhalb einer bestimmten Genauigkeitsgrenze erreicht wird [97].

Dabei kann bei der Autofokussierungsoperation von einem Fehler mit einer Standardabweichung von etwa 50 nm [101] ausgegangen werden. Erfahrungsgemäß liegt der Fehler bei der Zentrierungsoperation in derselben Größenordnung. Desweiteren ist zu beachten: Da die Autofokussierung in einiger Entfernung von der eigentlichen Objektstelle ausgeführt werden muss, führt eine Neigung der Probe in Richtung der Kippachse zu einer systematischen Abweichung zwischen tatsächlichem und angestrebtem Defokus.

Zur Aufnahme einer Kippserie stehen eine Reihe von Computerprogrammen zur Verfügung, beispielsweise `SerialEM` [102] oder `TOM2` [101]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Kippserien wurden mit `Xplore3D` des Mikroskopherstellers FEI aufgenommen. Das Programm zeichnet sich durch eine einfache Bedienweise und verlässliche, automatisierte Datenaufnahme auch bei hoher Vergrößerung aus. Es bietet jedoch ebenfalls die Möglichkeit, die automatisierten Routinen zu unterbrechen und manuell einzugreifen, wodurch der Benutzer flexibel mit dem TEM interagieren kann.

## 2.5 Alignierung einer Kippserie

Die Aufgabe der Alignierung einer Kippserie besteht in der exakten Bestimmung der Geometrie des Kippexperiments. Die hochauflösende Rekonstruktion eines Tomogramms aus den Projektionen einer Kippserie bedingt, dass diese mit hoher Genauigkeit im Subpixelbereich (typischerweise  $< 10 \text{ \AA}$ ) auf einen gemeinsamen Koordinatenursprung bezogen werden können. Dazu werden im Rahmen der Alignierung die entsprechenden Transformationsparameter der Projektionen berechnet. Diese werden als Alignierungsparameter bezeichnet. Ihre inverse Anwendung auf die Projektionen liefert dann die alignierte Kippserie, aus der schließlich das Tomogramm rekonstruiert werden kann.

Zur Alignierung einer Kippserie stehen im Wesentlichen drei Methoden zur Verfügung: Erstens, die Alignierung mittels Kreuzkorrelation [98, 103]. Zweitens, die Alignierung mittels Merkmalverfolgung [104, 105, 106, 107]. Drittens, die Alignierung mittels Markierungspunkten [108, 109, 110]. Die beiden ersten Methoden werden hauptsächlich dann eingesetzt, wenn keine Möglichkeit besteht, der Probe Markierungspunkte hinzuzufügen. Dies ist insbesondere der Fall bei Proben, die vor Aufnahme der Kippserie beispielsweise durch die Kryo-FIB Technik geschnitten wurden. So wurde das Tomogramm  $T_0$  mit Merkmalverfolgung aligniert. Auf diese beiden Methoden soll hier jedoch nicht mehr weiter eingegangen werden, da die Entwicklung einer neuen Merkmalverfolgungsmethode Bestandteil meiner Diplomarbeit war [106] und beide Techniken dort sehr ausführlich beschrieben sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde fast ausschließlich die dritte Methode angewendet. Diese soll nun näher beleuchtet werden. Als Markierungspunkte werden typischerweise Goldnanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 10 nm verwendet, die in kolloidaler Lösung verfügbar sind und mit der Probe vor Vitrifikation gemischt werden. Aufgrund ihres starken Amplitudenkontrasts sind diese auch in extrem verrauschten Projektionen gut erkennbar.

Die erste Aufgabe besteht darin, die Koordinaten von jeweils dem selben Markierungspunkt in den Projektionen einer Kippserie zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck das interaktive Computerprogramm `tom_setmark` verwendet. Dieses Programm ist Bestandteil der TOM Toolbox [111], ein speziell für die Bildverarbeitung von KET Daten entwickeltes Programmpaket, auf das im Abschn. 2.7 näher eingegangen wird. Abhängig von der Anzahl der Projektionen und der angestrebten Genauigkeit werden typischerweise die 2D Koordinaten von 3 bis 12 Markierungspunkten benötigt, um daraus die Alignierungsparameter einer Kippserie zu berechnen.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass bei dieser Alignierungsmethode vorausgesetzt wird, dass die Markierungspunkte ein fixes Koordinatensystem im Objekt installieren. Dies bedingt insbesondere, dass diese während der Aufnahme der Kippserie ortsfest sind beziehungsweise das Objekt nicht verformt wird. Probleme dieser Art tauchen aber eher bei zu hohen Elektronendosen auf und bedeuten deshalb keine Einschränkung der hier beschriebenen Alignierungsmethode.

Es werden nun die folgenden Transformationen der Projektionen betrachtet: Erstens, die Projektionen können relativ zueinander verschoben vorliegen. Diese Verschiebungen werden durch die mechanische Ungenauigkeit der Kippbühne verursacht und bleiben während der Aufnahme der Kippserie durch den Fehler der Zentrierungsoperation unkorrigiert. Zweitens, die Projektionen werden durch die magnetische Elektronenoptik rotiert. Dabei führen Änderungen der Mikroskopparameter, zum Beispiel durch Fehler der Autofokussierungsoperation, zu unterschiedlichen Rotationswinkeln der einzelnen Projektionen relativ zueinander. Drittens, die Projektionen können relativ zueinander isotrop skaliert sein, wobei die unterschiedlichen Vergrößerungen ebenfalls durch Änderung der Mikroskopparameter hervorgerufen werden können. Im folgenden werden die Verschiebungen der Projektionen mit  $\mathbf{t}_i$ , die Rotationen mit  $\varphi_i$  und die Skalierungen mit  $s_i$  bezeichnet. Diese bilden die gesuchten Alignierungsparameter  $\sigma = \{s_i, \varphi_i, \mathbf{t}_i\}$  mit Index  $i = 1, \dots, N_p$ , wobei  $N_p$  die Anzahl der Projektionen bezeichnet.

Hier wird davon ausgegangen, dass die Kippwinkel  $\vartheta_i$  mit ausreichend hoher Genauigkeit durch das Goniometer der Kippbühne gemessen werden können. In der Tat sind die Kippwinkel mit einem vernachlässigbaren Fehler von etwa  $\pm 0.1^\circ$  [95] behaftet und werden deshalb nicht als Alignierungsparameter behandelt. Die Alignierung mit Markierungspunkten ist aber in dieser Hinsicht nicht beschränkt und die Kippwinkel könnten ebenfalls optimiert werden. Ebenso ist es möglich, anstatt isotroper Skalierung der Projektionen eine allgemeine 3D Skalierung des Objekts einzuführen. Von dieser Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein Gebrauch gemacht.

Bezeichne nun  $N_m$  die Anzahl der Markierungspunkte und  $j = 1, \dots, N_m$  den Index eines Markierungspunktes. Sei  $\mathbf{q}_i^j = (q_{x_i}^j \ q_{y_i}^j)^T$  die 2D Koordinate des  $j$ ten Markierungspunktes in der  $i$ ten Projektion. Diese Koordinaten werden als Projektionskoordinaten bezeichnet. Schließlich bezeichne  $\mathbf{m}^j = (x^j \ y^j \ z^j)^T$  die 3D Koordinate des  $j$ ten Markierungspunktes im Koordinatensystem des Objekts. Diese Koordinaten werden als Objektkoordinaten bezeichnet.

Die Alignierungsparameter  $\sigma$  verknüpfen nun gerade die Projektionskoordinaten  $\mathbf{q}_i^j$  mit den Objektkoordinaten  $\mathbf{m}^j$  und liefern dadurch die Transformationen, die auf die

Projektionen angewendet werden müssen, um diese zu einer Rekonstruktion des Objekts zusammenfassen zu können. Die Beziehung zwischen  $\mathbf{q}_i^j$  und  $\mathbf{m}^j$  wird durch das Lawrence-Modell beschrieben [108]:

$$\mathbf{q}_i^j = \mathcal{P}\mathbf{m}^j + \mathbf{t}_i. \quad \text{Lawrence-Modell} \quad (2.27)$$

Dabei wird der Operator  $\mathcal{P}$  als Projektionsoperator bezeichnet und sei wie folgt definiert:

$$\mathcal{P}(s_i, \varphi_i, \vartheta_i) = s_i \begin{pmatrix} \cos \varphi_i & -\sin \varphi_i \\ \sin \varphi_i & \cos \varphi_i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \vartheta_i & 0 & -\sin \vartheta_i \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \vartheta_i & 0 & \cos \vartheta_i \end{pmatrix}. \quad (2.28)$$

Dabei beschreibt die rechte Matrix die Rotation der Markierungspunkte um den Kippwinkel  $\vartheta_i$ , wobei hier ohne Beschränkung der Allgemeinheit die  $y$ -Achse als Kippachse definiert wurde. Die mittlere Matrix beschreibt die Projektion der Markierungspunkte in Richtung der optischen Achse ( $z$ -Achse). Schließlich beschreibt die rechte Matrix die Rotation der Markierungspunkte in der Projektionsebene um den Winkel  $\varphi_i$ . Diesem Winkel kommt eine besondere Bedeutung zu, da er die Orientierung der Kippachse in den Projektionen beschreibt. Im folgenden wird  $\varphi_i$  deshalb als Kippachse bezeichnet.

Eine Lösung des Lawrence-Modells in Hinblick auf die gesuchten Alignierungsparameter kann durch Minimierung des Funktionals

$$Q(s_i, \varphi_i, \mathbf{t}_i, \mathbf{m}^j) = \sum_i \sum_j (\hat{\mathbf{q}}_i^j - \mathbf{q}_i^j)^T (\hat{\mathbf{q}}_i^j - \mathbf{q}_i^j) \quad (2.29)$$

bezüglich der Alignierungsparameter  $\{s_i, \varphi_i, \mathbf{t}_i\}$  erhalten werden, wobei hier die tatsächlich gemessene 2D Koordinate des  $j$ ten Markierungspunktes in der  $i$ ten Projektion als  $\hat{\mathbf{q}}_i^j$  bezeichnet wird. Die Lösung dieser Optimierungsaufgabe war Bestandteil meiner Diplomarbeit und ist dort ausführlich beschrieben [106].

Schließlich werden die gefundenen Alignierungsparameter invers auf die Projektionen der Kippserie angewendet. Wenn die alignierten Projektionen in schneller Abfolge dargestellt werden, verlaufen die Markierungspunkte auf Geraden die parallel zur  $x$ -Achse liegen. Diese Beobachtung stellt ein einfaches Qualitätskriterium für die erfolgreiche Alignierung einer Kippserie dar.

## 2.6 Rekonstruktion eines Tomogramms

Zur Rekonstruktion eines Tomogramms aus den alignierten Projektionen einer Kippserie stehen iterative Realraummethoden [112, 113, 114], direkte Fourierraummethoden [115] und modifizierte Rückprojektionsmethoden [21, 22] zur Verfügung [116]. Standardmäßig wird in der KET die gewichtete Rückprojektion eingesetzt. Sie ist eine der modifizierten Rückprojektionsmethoden und wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich verwendet.

Diese Methode setzt sich aus zwei Teilen zusammen: Der Rückprojektion der alignierten Projektionen in das Rekonstruktionsvolumen und der anschließenden Wichtung. Das Prinzip der Rückprojektion ist in Abb. 2.8 illustriert. Dabei werden die Intensitätswerte der Projektionspixel unter Berücksichtigung des Kippwinkels  $\vartheta_i$  in das Rekonstruktionsvolumen zurückgestrahlt und dort voxelweise<sup>2</sup> aufsummiert.

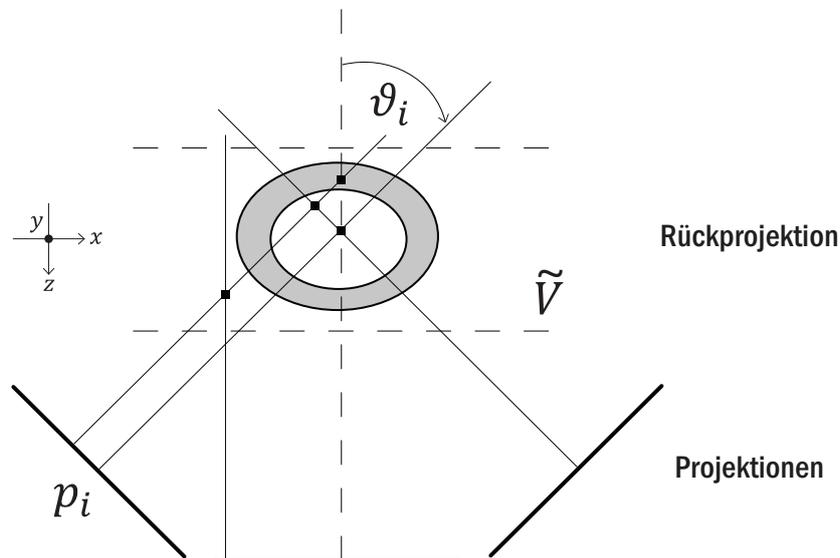


Abbildung 2.8: Prinzip der Rückprojektion. Die Intensitätswerte der Projektionen  $p_i$  werden unter dem Kippwinkel  $\vartheta_i$  in das Rückprojektionvolumen  $\tilde{V}$  zurückgestrahlt und dort voxelweise aufsummiert. Im Zuge der Alignierung wurden die Projektionen invers um die Alignierungsparameter  $\{s_i, \varphi_i, \mathbf{t}_i\}$  skaliert, rotiert und verschoben. Dadurch wird sichergestellt, dass zusammengehörige Intensitätswerte verschiedener Projektionen im selben Voxel aufsummiert werden. In der Abbildung steht die Kippachse ( $y$ -Achse) senkrecht auf der Zeichenebene.

Die Rückprojektion lässt sich sehr einfach implementieren. Dazu werden Volumen  $V_i$  der Größe des Rekonstruktionsvolumens schichtweise mit den alignierten Projektionen  $p_i$

<sup>2</sup>Ein 3D Pixel wird mit dem Kunstwort Voxel (*Volumetric picture element*) bezeichnet.

aufgefüllt und um  $\vartheta_i$  um die Kippachse gedreht. Die elementweise Summe dieser Rückprojektionskörper  $V_i$  ergibt schließlich die Rückprojektion  $\tilde{V}$  des Objekts.

Diese ist jedoch eine unscharfe Repräsentation des Objekts. Der Grund hierfür kann wie folgt erklärt werden: Nach dem Projektionstheorem [117, 43] bilden die Projektionen zentrale Schnitte durch die Fouriertransformation des Rückprojektionsvolumens, wobei diese Schnitte um jeweils  $\vartheta_i$  gekippt sind. Dabei überlagern sich die Projektionsschnitte im Fourierspektrum bei niedrigen Raumfrequenzen, wobei diese verstärkt werden und die Rekonstruktion unscharf erscheint (Abb. 2.9).

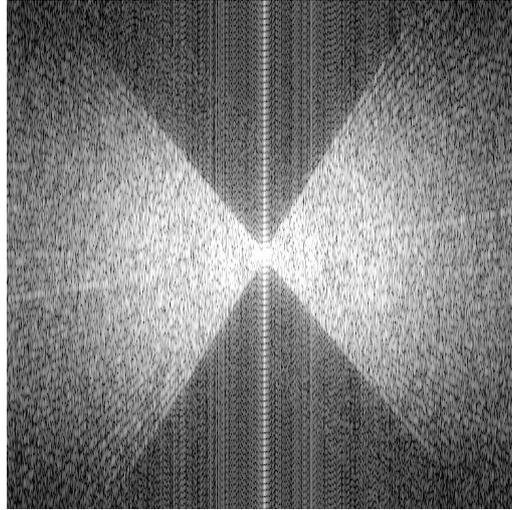


Abbildung 2.9: Powerspektrum ( $xz$ -Schnitt) von Tomogramm  $T_0$ . Die Projektionen  $p_i$  bilden zentrale, um  $\vartheta_i$  gekippte Schnitte durch die Fouriertransformation des Volumens. Bei niedrigen Raumfrequenzen überlagern sich die Projektionsschnitte, während sie bei höheren Raumfrequenzen abhängig vom Inkrement des Kippwinkels voneinander separiert bleiben. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der niedrigen Raumfrequenzen in einer ungewichteten Rückprojektion, die deshalb eine unscharfe Repräsentation des Objekts bildet. Die Verstärkung der niedrigen Raumfrequenzen wird durch die Wichtung des Rückprojektionsvolumens ausgeglichen. Deutlich ist auch der *Missing wedge* zu erkennen. Ein doppelkeilförmiger Bereich wird nicht mit Strukturinformationen aufgefüllt, wobei die Größe dieses Bereichs vom Kippwinkelbereich abhängt, der seinerseits wiederum durch die Dickenlimitation beschränkt ist. Das streifenförmige Muster im *Missing wedge* entsteht durch die limitierte, numerische Genauigkeit der verwendeten Interpolationsalgorithmen.

Dieser Effekt wird durch eine Wichtung des Fourierspektrums der Rückprojektion ausgeglichen. Der Wichtungsfiler  $Z$  kann mittels dieser Gleichung konstruiert werden [116]:

$$Z = \sum_i 2a \operatorname{sinc} \left( 2a\pi(x \sin \vartheta_i \cos \psi_i + y \sin \vartheta_i \sin \psi_i + z \cos \vartheta_i) \right), \quad (2.30)$$

wobei der Parameter  $a$  die Objektdicke  $T$  in die Wichtung miteinbezieht. Diese kann aus der ungewichteten Rückprojektion einfach abgeschätzt werden und es wird  $a \approx T/2$  gesetzt [116]. Der Winkel  $\psi_i$  hingegen beschreibt die Projektionsrichtung der Projektion  $p_i$ . Bei den in dieser Arbeit betrachteten Einachsenkippserien<sup>3</sup> kann  $\psi_i \equiv 0$  gesetzt werden.

Die gewichtete Rückprojektion  $V$  wird schließlich aus der ungewichteten Rückprojektion  $\tilde{V}$  durch Dekonvolution mit dem Wichtungsfiler  $Z$  erhalten [116]:

$$V = \mathcal{F}^{-1} \{ \mathcal{F} \{ \tilde{V} \} \cdot Z^{-1} \}. \quad (2.31)$$

Es ist zu beachten, dass die Rekonstruktion  $V$  des untersuchten Objekts aufgrund des *Missing wedge* unvollständig und in Richtung der optischen Achse elongiert ist [21, 1]. Darüber hinaus kann aufgrund der Dosislimitation nur eine beschränkte Anzahl  $N_p$  von Projektionen  $p_i$  zu einem Tomogramm  $V$  kombiniert werden. Die Auflösung  $d_C$  einer Rekonstruktion kann über das Crowther-Kriterium abgeschätzt werden [112]:

$$d_C \simeq \frac{\pi T}{N_p}, \quad \text{Crowther-Kriterium} \quad (2.32)$$

Dabei wird vorausgesetzt, dass die Rekonstruktion keinen *Missing wedge* besitzt, der Kippwinkelbereich also  $\pm 90^\circ$  beträgt. Das Crowther-Kriterium gibt folglich eine obere Schranke der Auflösung an. Ebenfalls werden Fehler in der Alignierung einer Kippserie nicht berücksichtigt.

Sei abschließend eine Beispielrechnung betrachtet. Angenommen, das Objekt hätte eine Dicke  $T$  von 100 nm und die Kippserie würde im Kippwinkelbereich  $\pm 60^\circ$

<sup>3</sup>Bei Zweiachsenkippserien [90, 110, 106] werden zwei Einachsenkippserien desselben Objekts in einem Tomogramm vereinigt, wobei die Projektionen der zweiten Kippserie unter einer um etwa  $90^\circ$  gedrehten Projektionsrichtung  $\psi_i$  aufgenommen werden. Bei Zweiachsenkippserien kann der *Missing wedge* zu einer *Missing pyramid* verkleinert werden. Beispielsweise nimmt bei einem Kippwinkelbereich von  $\pm 60^\circ$  das Volumen des *Missing wedge* 33%, der *Missing pyramid* aber lediglich 16% des Fourierspektrums der Rekonstruktion ein [1]. Dadurch zeichnen sich Zweiachsontomogramme durch eine reichhaltigere Rekonstruktion des Objekts und verbesserte Isotropie der Auflösung aus [118].

mit  $1.5^\circ$  Kippwinkelinkrement aufgenommen, was mit der Dosislimitation ohne besondere Schwierigkeiten vereinbar wäre. Dann würde die Auflösung des Tomogramms nach dem Crowther-Kriterium etwa 4nm betragen. In diesem Fall wären bereits die Transferfunktionen *CTF* und *MTF* die auflösungslimitierenden Faktoren, nicht mehr die Anzahl der Projektionen. Ganz besonders trifft dies natürlich auf eine Mittelung zu, bei der  $d_C \rightarrow 0$  geht.

## 2.7 Bildverarbeitung

Die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Daten wurde mittels der TOM Toolbox<sup>4</sup> durchgeführt, ein von Nickell et al. [111] speziell für die wissenschaftliche Bildverarbeitung von KET Daten entwickeltes Programmpaket, welches systemübergreifend und transparent in MATLAB implementiert ist. Die TOM Funktionen können dabei an spezielle Fragestellungen angepasst, beziehungsweise können mit der zugrundeliegenden MATLAB Programmiersprache neue Funktionen hinzugefügt werden. Dabei kann auf eine große Anzahl von Basisfunktionen, wie beispielsweise Anlegen und Verwalten von mehrdimensionalen Variablen, Umsetzung mathematischer Operationen auf mehrdimensionalen Variablen, diskrete Fouriertransformation, Optimierung, Plotten von Graphen etc. die in MATLAB ausführlich getestet und hoch dokumentiert vorhanden sind, zugegriffen werden.

Eine ganze Reihe TOM Funktionen haben ihren Ursprung in dem von R. Hegerl entwickelten EM System [119], was vor allem im Hinblick auf die Alignierung und Rekonstruktion von Kippserien den Vorgänger der heutigen TOM Toolbox darstellt. Ein anderes, ebenfalls hervorragendes Programmpaket ist IMOD [120]. Dieses hat aber eher den Charakter eines abgeschlossenen Anwendungsprogramms und kann deshalb von außen nur schwer erweitert werden, obwohl der Quelltext des Programms ebenfalls öffentlich zugänglich ist.

Soweit sinnvoll, wird in dieser Arbeit auf die entsprechenden TOM Funktionen hingewiesen. Diese werden in der MATLAB Umgebung mit den Funktionsnamen `tom_funktionsname` aufgerufen. Durch Eingabe des Befehls `help tom_funktionsname` in der MATLAB Kommandozeile wird eine Kurzbeschreibung der Funktion ausgegeben. Mittels des Befehls `edit tom_funktionsname` läßt sich die Programmierung einsehen und verändern. Abhängig von den Eingabeparametern sind TOM Funktionen sowohl für

---

<sup>4</sup>Die TOM Toolbox kann auf dieser Internetseite heruntergeladen werden:  
[http://www.biochem.mpg.de/baumeister/tom\\_e/index.html](http://www.biochem.mpg.de/baumeister/tom_e/index.html).

2D Bilder (Projektionen, Schnitte, Powerspektren etc.) als auch für 3D Volumen (Tomogramme, Subtomogramme, Mittelungen etc.) implementiert. Falls zur Funktionsauswertung Interpolation (beispielsweise bei einer Rotation) erforderlich ist, so ist diese als bilineare Interpolation für 2D und trilineare Interpolation für 3D Daten programmiert.

Die Funktionalität der TOM Toolbox im Hinblick auf die Alignierung und Rekonstruktion einer Kippserie soll hier noch kurz dargestellt werden. Die Koordinatenmessung der Markierungspunkte auf den Projektionen kann mittels der graphischen Benutzeroberfläche `tom_setmark` ausgeführt werden. Wenn keine Markierungspunkte zur Verfügung stehen, kann mit dem Programm `tom_markGui` Merkmalverfolgung auf die Kippserie angewendet werden. Darauf folgt die Berechnung der Alignierungsparameter mit der Funktion `tom_alignment3d`. Die Rückprojektion kann mit `tom_backproj3d` durchgeführt werden und die Berechnung des Wichtungsfilters mit `tom_calc_weight_function`. Diese Funktionen sind alle in der graphischen Benutzeroberfläche `tom_Rec3dGUI` zusammengefasst, welche ich im Rahmen meiner Diplomarbeit programmiert habe [106].

Alle in der vorliegenden Arbeit betrachteten Tomogramme wurden auf diese Weise aligniert und rekonstruiert. Die hier dargestellte Methode zur Korrektur der Transferfunktionen in der KET wurde als Erweiterung der TOM Toolbox konzipiert und implementiert. Auf die entsprechenden Programme wird in Kap. 4 hingewiesen. Zum Abschluß des Kapitels werden noch drei bildverarbeiterische Basisoperationen eingeführt, namentlich Rotation, Translation und Kreuzkorrelation, auf die in der TOM Toolbox mittels der Funktionsaufrufe `tom_rotate`, `tom_shift` und `tom_corr` zugegriffen werden kann, sowie eine einfache Methode zur Ermittlung der Symmetrie einer Struktur.

## Rotation

Der 3D Rotationsoperator  $\mathcal{R}$  rotiert ein Volumen  $V$  um die Rotation  $r$  und erzeugt dabei ein rotiertes Volumen  $V'$ :

$$V' = \mathcal{R}_r V. \quad (2.33)$$

Die Rotation  $r$  wird durch die drei Eulerwinkel  $(\psi, \vartheta, \varphi)$  beschrieben, wobei hier folgende Konvention verwendet wird: Das Volumen wird zuerst um den Winkel  $\varphi$  um die  $z$ -Achse rotiert, dann um den Winkel  $\vartheta$  um die neue  $y$ -Achse und schließlich um den Winkel  $\psi$  um die neue  $z$ -Achse.

Damit gilt für den Rotationsoperator (*zyz*-Konvention):

$$\mathcal{R}_{(\psi, \vartheta, \varphi)} = \begin{pmatrix} \cos \psi & -\sin \psi & 0 \\ \sin \psi & \cos \psi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \vartheta & 0 & -\sin \vartheta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \vartheta & 0 & \cos \vartheta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \varphi & -\sin \varphi & 0 \\ \sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (2.34)$$

In der KET werden hauptsächlich die *zyz*-Konvention und die *xxz*-Konvention [41] oder Quaternionen [121] zur 3D Rotationsbeschreibung verwendet (für einen Überblick über die gängigen Konventionen [122]). Bei einer 2D Rotation geht  $\mathcal{R}$  in eine  $2 \times 2$ -Rotationsmatrix über [123].

### Translation

Der 3D Translationsoperator  $\mathcal{T}$  verschiebt ein Volumen  $V$  um die Translation  $\mathbf{t}$  und erzeugt dabei ein verschobenes Volumen  $V'$ :

$$V' = \mathcal{T}_{\mathbf{t}} V. \quad (2.35)$$

Für den Fall, dass die Verschiebung  $\mathbf{t} = (\Delta x, \Delta y, \Delta z)^T$  mit Subpixelgenauigkeit ausgeführt werden muss, kann der Translationsoperator wie folgt realisiert werden:

$$\mathcal{T}_{\mathbf{t}} = e^{-2\pi i \mathbf{t} \cdot \mathbf{q}}, \quad (2.36)$$

wobei  $\mathcal{T}_{\mathbf{t}}$  als Phasenverschiebung auf das Raumfrequenzspektrum  $\mathcal{F}\{V\}$  des Volumens  $V$  angewendet wird. Wenn jedoch nur ganzzahlige Verschiebungen betrachtet werden, kann das Volumen einfach im Realraum verschoben werden.

### Kreuzkorrelation

Durch Auswertung der Kreuzkorrelationsfunktion (*Cross-correlation function, CCF*) kann die Ähnlichkeit und Verschiebung zwischen 2D Bildern und 3D Volumen gemessen werden. Im nächsten Kapitel wird gezeigt, wie diese Technik um die Ermittlung von Rotationen zwischen Subtomogrammen erweitert werden kann. Im Hinblick auf die Bildverarbeitung von KET Daten ist die *CCF* von zentraler Bedeutung [124, 125, 35, 44].

Seien  $A$  und  $B$  zwei beliebige Bilder oder Volumen gleicher Dimension. Dann läßt sich die  $CCF$  zwischen  $A$  und  $B$  durch Anwendung von Fouriertransformationen effizient wie folgt berechnen [124]:

$$CCF(\mathbf{t}) = A \star B = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{A\} \cdot \mathcal{F}^*\{B\}\}, \quad (2.37)$$

wobei  $\star$  die Kreuzkorrelationsoperation und  $*$  komplexe Konjugation bezeichnet. Die  $CCF$  ist eine Funktion der Verschiebungen  $\mathbf{t}$  von  $B$  relativ zu  $A$  und ihre Werte liefern eine Maßzahl für die Ähnlichkeit von  $A$  und  $B$  unter der jeweiligen Verschiebung. Die Koordinate  $\mathbf{t}_{\max}$  des Maximums der Kreuzkorrelationsfunktion  $\max\{A \star B\}$  liefert nun genau die Verschiebung von  $B$ , welche die Euklidische Distanz zwischen  $A$  und  $B$  minimiert [124].

Wenn jedoch nur die Ähnlichkeit zwischen KET Daten, ohne Berücksichtigung etwaiger Verschiebungen, bewertet werden soll, ist die Berechnung des Kreuzkorrelationskoeffizienten (*Cross-correlation coefficient*,  $CCC$ ) ausreichend. Sei dazu  $N_V$  die Anzahl an Datenpunkten und  $v = 1, \dots, N_V$  der Index eine Pixels beziehungsweise Voxels von  $A$  und  $B$ . Dann ist der  $CCC$  wie folgt definiert:

$$CCC(A, B) = \frac{\sum_v (A^v - \langle A \rangle)(B^v - \langle B \rangle)}{\sqrt{\sum_v (A^v - \langle A \rangle)^2} \cdot \sqrt{\sum_v (B^v - \langle B \rangle)^2}}, \quad (2.38)$$

wobei  $\langle A \rangle$  und  $\langle B \rangle$  die Mittelwerte von  $A$  beziehungsweise  $B$  bezeichnen.

### Symmetriemessung

Durch Kombination von Kreuzkorrelationskoeffizient und Rotationsoperator kann eine einfache Methode zur Messung der Symmetrie einer Struktur realisiert werden [126]. Dabei wird  $CCC_i(A, \mathcal{R}_{r_i}A)$  mit  $r_i = (0, 0, \phi_i)$  für  $\phi_i = 0, 1, \dots, 360^\circ$  ausgewertet und geplottet. Die Anzahl der Maxima des Funktionsgraphen minus Eins widerspiegelt dann die Symmetrie von  $A$  in der Ebene orthogonal zur  $z$ -Achse. Diese Methode ist als TOM Funktion implementiert (`tom_check_symmetry`).



## 3 Subtomogrammalignierung

In diesem Kapitel werden die mathematischen und algorithmischen Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Alignierung von Subtomogrammen dargestellt. Der konkrete Einsatz zur Strukturbestimmung des Porins MspA in der Lipiddoppelschicht vitrifizierter Liposomen wird in Kap. 5 beschrieben. Zum Abschluß des Kapitels wird als Beispiel die Anwendung der Methode auf Tomogramm  $T_0$  erläutert.

### 3.1 Algorithmus

Die Methode der Alignierung von Subtomogrammen wurde ursprünglich von Walz et al. entwickelt und erstmalig auf eiseingebettete Proteinkomplexe angewendet [127, 42, 128]. Sie wurde dann von Förster et al. durch Berücksichtigung des *Missing wedge* in der Metrik des Algorithmus weiterentwickelt [43, 44, 45] und im Rahmen der TOM Toolbox transparent in MATLAB implementiert (`tom_av3`). Später wurde die Methode von T. Haller in eine C++ Programmbibliothek (`tom_corr3d`) übersetzt und im Hinblick auf Rechengeschwindigkeit durch Parallelisierung optimiert [121]. Darüber hinaus wurde in dieser Implementierung die Methode um die Klassifikation von Subtomogrammen erweitert. Im Rahmen dieser Arbeit kam ausschließlich diese Fassung zum Einsatz und wurde auf dem in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried installierten Computercluster mit einer Leistung von bis zu 128 Prozessoren parallel betrieben.

Andere Ansätze zur Alignierung und Klassifikation von Subtomogrammen wurden beispielsweise von Barthesaghi et al. [47] und Scheres et al. [49] entwickelt.

## Mittelung

Das Ziel der Subtomogrammalignment besteht darin, eine Anzahl von  $N_I$  Subtomogrammen<sup>1</sup>  $P_i$  ( $i = 1, \dots, N_I$ ), die jeweils Kopien des gleichen Proteinkomplex<sup>2</sup> enthalten, unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Translationen  $\mathbf{t}_i$  und Rotationen  $r_i$  kohärent zu einer Mittelung  $\Omega$  des Proteinkomplex zu addieren.

Dann gilt für die Mittelung  $\Omega$  des Proteinkomplex folgender Zusammenhang [45]:

$$\Omega = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F} \left\{ \sum_{i=1}^{N_I} \mathcal{R}_{-r_i} \mathcal{T}_{-\mathbf{t}_i} P_i \right\} \cdot \bar{W}^{-1} \right\}, \quad \text{Mittelung} \quad (3.1)$$

wobei  $\mathcal{T}$  den Translationsoperator,  $\mathcal{R}$  den Rotationsoperator und  $\bar{W}$  den Strukturfaktorwichtungsfiler bezeichnet. Dabei werden die Partikeltransformationen  $\mathbf{t}_i$  und  $r_i$  invers auf die Partikel  $P_i$  angewendet und die alignierten Partikel kohärent aufsummiert. Aus dem daraus resultierende Volumen wird schließlich die Mittelung  $\Omega$  durch Dekonvolution mit  $\bar{W}$  erhalten.

Der Strukturfaktorwichtungsfiler  $\bar{W}$  beinhaltet die Information darüber, wie oft einzelne Strukturfaktoren durch die Partikel abgetastet wurden und verhindert die Verstärkung einzelner Strukturfaktoren relativ zu anderen, die im Experiment seltener realisiert wurden. Dieser Filter kann wie folgt erhalten werden [45]:

$$\bar{W} = \frac{1}{N_I} \sum_{i=1}^{N_I} \mathcal{R}_{-r_i} W_i, \quad (3.2)$$

wobei  $W_i$  eine doppelkeilförmige Maskenfunktion ist, die im Folgenden als Doppelkeil bezeichnet wird. Sie spiegelt gerade den experimentell realisierten *Missing wedge* des Partikels  $P_i$  wieder. Sei  $N_V$  die Anzahl an Voxeln der betrachteten Subtomogramme beziehungsweise der Mittelung und  $v = 1, \dots, N_V$  der Index eines Voxels. Dann ist  $W_i^v = 0$ , falls der Voxel  $v$  im *Missing wedge* des Subtomogramms liegt, und  $W_i^v = 1$ , falls er in den Bereich des Raumfrequenzspektrums fällt, der durch die Projektionen aufgefüllt wurde. Generell sind die Doppelkeile  $W_i$  für Partikel, die aus dem selben Tomogramm stammen, identisch. Sie unterscheiden sich jedoch für Partikel aus Tomogrammen mit unterschiedlichem Kippwinkelbereich. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird im Folgenden angenommen, dass alle  $W_i$  identisch sind, also  $W_i \equiv W$  gilt.

<sup>1</sup>Die Subtomogramme können aus mehreren Tomogrammen mit gleicher Vergrößerung stammen.

<sup>2</sup>Proteinkomplex wird hier als Synonym für eine in den Subtomogrammen enthaltene, molekular identische, biologische Struktur verwendet.

Durch den Mittelungsansatz kann sowohl die  $SNR$  als auch die Auflösung der untersuchten Struktur im Vergleich zum Tomogramm beziehungsweise Subtomogramm erheblich verbessert werden. Es läßt sich zeigen, dass die  $SNR$  nur von der Anzahl der Partikel  $N$  abhängt, wobei die  $SNR$  von  $\Omega$  um den Faktor  $\sqrt{N}$  im Idealfall größer ist als die  $SNR$  der Subtomogramme [129, 130]. Aufgrund der hohen Anzahl von Projektionen, die effektiv in eine Mittelung eingehen, geht die Auflösung nach den Crowther-Kriterium gegen Null und ist nur durch die Genauigkeit der Alignment der Kippserien, der Subtomogrammalignment und der Korrektur der Transferfunktionen limitiert.

Dies gilt jedoch nur, falls die räumliche Orientierung der Partikel den gesamten 3D Winkelraum abdeckt, und die Mittelung dadurch keinen *Missing wedge* mehr besitzt, beziehungsweise der Strukturfaktorwichtungsfiler  $\bar{W}$  ohne Nullvoxel konstruiert werden kann. Das Problem eines nicht vollständig aufgefüllten Winkelraums kann auch bei der Einzelpartikelanalyse eine Rolle spielen, gerade dann, wenn die Dicke des Eisfilms und der Durchmesser der untersuchten Struktur in der gleichen Größenordnung liegen, und das Protein dadurch möglicherweise eine Vorzugsrichtung im Eisfilm einnimmt. Letztendlich läßt sich dieses Problem nur durch eine Optimierung der Probenpreparation beheben.

#### Startreferenz

Im Allgemeinen sind die Methoden zur Subtomogrammalignment iterativ aufgebaut. Dadurch erhält gerade die in der nullten Iteration  $j = 0$  ( $j = 0, \dots, N_j$ ) verwendete Startreferenz eine herausragende Bedeutung. Im nullten Alignmentsschritt werden die Partikeltransformationen relativ zur Startreferenz berechnet, wobei in den darauf folgenden Schritten die jeweilige Mittelung der Iteration  $j - 1$  als Referenz verwendet und während der Laufzeit iterativ verfeinert wird. Für den Algorithmus ergibt sich daraus ein natürliches Abbruchkriterium  $\varepsilon$ , wobei die Laufzeit solange fortgesetzt wird, bis  $\max\{\Omega_{j-1} \star \Omega_j\} \geq \varepsilon$  gilt.

Generell ist anzunehmen, dass die Struktur des untersuchten Proteinkomplex unbekannt ist und folglich auch die Startreferenz. Erschwerend kommt die Tatsache hinzu, dass der Algorithmus dazu neigt, die Subtomogramme gerade so zu alignieren, dass ihr Rauschen dazu verwendet wird, die Startstruktur zu kopieren. So läßt sich einfach zeigen, dass mittels einem Satz von Rauschvolumen und einer geeigneten Startreferenz jede beliebige Struktur erzeugt werden kann.

Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Schwierigkeit bei der Mustererkennung in Tomogrammen. Wenn darin nach einer bekannten Struktur gesucht wird, findet der Mustererkennungsalgorithmus immer auch Subtomogramme, in denen sich lediglich Rauschen befindet, das unter einer bestimmten Rotation und Translation eine gewisse Ähnlichkeit mit der gesuchten Struktur aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb im Hinblick auf Tomogramm  $T_0$  konsequent ein anderer Weg gegangen.

Die Idee war hier nicht, einen Mustererkennungsalgorithmus sensitiver zu gestalten, sondern zu versuchen, im Tomogramm vorhandene, molekular identische Strukturen zu extrahieren, zu klassifizieren und zu mitteln, und dann, auf der Ebene der Mittelung, die Strukturzuordnung durchzuführen. So wurde im Hinblick auf die Analyse von Tomogramm  $T_0$ , zur Mustererkennung und als Startreferenz lediglich eine Kugel mit weicher Kante verwendet. Als Startreferenzen für die Klassifikation wurde dieselbe Kugel, jedoch mit unterschiedlichen Repräsentationen additiven, gaußschen Rauschens eingesetzt. Eine Kugel als Startreferenz führt bestenfalls dazu, dass in der nullten Iteration die Schwerpunkte der Partikel auf einen gemeinsamen Schwerpunkt aligniert werden.

Es empfiehlt sich generell, als Startstruktur entweder eine geometrische Form einzusetzen oder sie aus den Daten selbst heraus zu generieren, wobei von der zweiten Möglichkeit im MspA-Projekt Gebrauch gemacht wurde. Meiner Ansicht nach ist es jedoch in den meisten Fällen kontraproduktiv, wie auch immer gefilterte Kristall- oder Einzelpartikelstrukturen zu verwenden. Einen Grenzfall stellt die Untersuchung makromolekularer Metastrukturen dar, wie beispielsweise Polysomen [52, 53]. In solchen Fällen ist es durchaus denkbar, als Startreferenz beispielsweise eine hochaufgelöste Kristallstruktur des Proteins zu verwenden, wenn sie offensichtlich keinerlei Informationen über die in einer Zelle realisierten Metastrukturen des Proteins enthält.

#### **Metrik**

Die iterative Ermittlung und schrittweise Verfeinerung der gesuchten Translationen  $t_i$  und Rotationen  $r_i$  beruht auf der Messung der jeweiligen Ähnlichkeit zwischen Referenz und Partikel, wobei alle möglichen Transformationen, mit einer bestimmten Genauigkeit, die neben der Partikelgröße die Laufzeit des Algorithmus bestimmt, systematisch abgesucht werden müssen.

### 3 Subtomogrammalignment

Basierend auf der Kreuzkorrelationsfunktion, kann die Metrik  $CCF_i(\mathbf{t}, r)$  wie folgt konstruiert werden [43]:

$$CCF_i(\mathbf{t}, r) = \frac{\tilde{\Omega}(r)_j \star P_i}{N}, \quad \text{Metrik} \quad (3.3)$$

wobei  $CCF_i(\mathbf{t}, r)$  ein Maß für die Ähnlichkeit zwischen dem Partikel  $P_i$  und der Referenz  $\tilde{\Omega}(r)_j$  unter den betrachteten Translationen  $\mathbf{t}$  und Rotationen  $r$  liefert. Der Normalisierungsfaktor  $N$  stellt sicher, dass alle Transformationen, unabhängig von den Intensitätswerten der Referenzen und Partikel, verglichen werden können [43]:

$$N = \sqrt{\sum_v (\tilde{\Omega}(r)_j^v)^2} \cdot \sqrt{\sum_v (P_i^v)^2}. \quad (3.4)$$

Die Referenzen  $\tilde{\Omega}(r)_k$  werden, abhängig von der Rotation  $r$ , wie folgt konstruiert [45]:

$$\tilde{\Omega}(r)_j = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{\mathcal{R}_r \Omega_{j-1}\} \cdot W\}. \quad (3.5)$$

Der entscheidende Punkt ist hierbei durch die Faltung der rotierten Mittelung mit dem Doppelkeil  $W$  gegeben [43, 44, 45]. Damit wird sichergestellt, dass die Ähnlichkeitsmessung zwischen Referenz und Partikel nur über die Strukturfaktoren erfolgt, die im Raumfrequenzspektrum des Partikels tatsächlich experimentell realisiert wurden.

In der praktischen Anwendung der Methode bringt es große Vorteile, im Hinblick auf Konvergenz und Auflösung der Mittelung, zusätzliche Filter- und Maskenoperationen in den Algorithmus zu integrieren. Hierzu wird in obigen Gleichungen  $\tilde{\Omega}(r)_j$  und  $P_i$  durch  $\tilde{\Omega}(r)_j^\dagger$  und  $P_i^\dagger$  auf diese Weise ersetzt:

$$\tilde{\Omega}(r)_j^\dagger = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{\mathcal{R}_r \Omega_{j-1}\} \cdot W \cdot F_\Omega\} \cdot M_\Omega, \quad (3.6)$$

$$P_i^\dagger = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{P_i\} \cdot F_P\} \cdot (\mathcal{T}_{\mathbf{t}_{i,j-1}} M_P). \quad (3.7)$$

### 3 Subtomogrammalignment

Dabei bezeichnen  $F_\Omega$  und  $F_P$  beliebige Filter des Raumfrequenzspektrums (Tiefpass, Bandpass etc.) der Referenzen beziehungsweise der Partikel. Desweiteren bezeichnen  $M_\Omega$  und  $M_P$  beliebige Realraummasken (Kugel, Zylinder etc.), die auf die Referenzen beziehungsweise Partikel angewendet werden. Im zweiten Fall müsste dabei eine Verschiebung der Maske  $M_P$ , um die in der Iteration  $j - 1$  gefundene Verschiebung  $\mathbf{t}_{i,j-1}$  des Partikels  $P_i$ , mit berücksichtigt werden. Diese zusätzliche Operation kann jedoch vermieden werden, wenn bereits voralignierte Partikel verwendet werden, mit dem Ziel die Alignierung weiter zu verfeinern.

Von beiden Operationen wurde im MspA-Projekt ausgiebig Gebrauch gemacht. Gerade bei der Alignierung von Membranproteinen macht es Sinn, weiter vom Protein entfernte Bereiche der Membran, da diese zunehmend flexibel wird und unterschiedliche Krümmungen aufweisen kann, mittels einer Realraummaske zu entfernen. Ein weiteres Beispiel für den sinnvollen Einsatz einer Realraummaske stellt die Alignierung cytoplasmatischer Ribosomen dar. Diese sind meist als Polysomen organisiert, wobei die Nachbarribosomen eine gewisse Flexibilität relativ zum zentralen Ribosom aufweisen. Mittels einer Realraummaske kann die Alignierung hier auf das zentrale Ribosom fokussiert werden.

Eine geeignete Filterung ist von ebenso großer Wichtigkeit für eine erfolgreiche Subtomogrammalignment. Durch die  $MTF$  werden hohe Raumfrequenzen in guter Näherung exponentiell gedämpft. Folglich liefert die Metrik hauptsächlich die Ähnlichkeit in den niedrigen Frequenzen und die Mittelung verbleibt im niedrigen Auflösungsbereich. Dieses Problem kann partiell mittels eines Hochpassfilters gelöst werden, weitaus effektiver aber durch  $MTF$ -Korrektur.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass Filterung und Maskierung lediglich während der Berechnung der Partikeltransformationen eine Rolle spielen. Die Mittelung wird jedoch aus den unveränderten Partikeln  $P_i$  erzeugt.

#### Optimierung

Die tatsächliche Berechnung der Translationen  $\mathbf{t}_i$  und Rotationen  $r_i$ , deren inverse Anwendung auf die Partikel  $P_i$  eine kohärente Mittelung des untersuchten Proteinkomplex generiert, erfolgt nun durch die iterative Maximierung des Funktionals

$$Q = \sum_{i=1}^{N_I} CCF_i(\mathbf{t}_i, r_i). \quad (3.8)$$

### 3 Subtomogrammalignierung

Aufgrund der Kreuzkorrelationsoperation in der Metrik, können hierbei die Verschiebungen in einem Schritt abgesucht werden. Die Rotationen jedoch müssen einzeln durchgetestet werden. Je feiner dabei die Rotationsabtastung, desto genauer die Alignierung, aber desto höher die Rechenzeit. Desweiteren sollte darauf geachtet werden, dass die Winkelliste eine möglichst gleichmäßige Abtastung des Winkelraums ermöglicht.

Zur Erzeugung einer gleichverteilten Winkelliste mit beliebigem Winkelinkrement kann ein von T. Haller entwickelter Algorithmus eingesetzt werden [121]. Eine andere Strategie wird von F. Förster vorgeschlagen [43]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich eine Winkelliste mit 3040 Eulerwinkeln und einem Winkelinkrement von etwa  $18^\circ$  verwendet, die mit der ersten Methode erzeugt wurde.

Zur Verfeinerung der Alignierung kann abschließend, eingeschränkt auf einen kleinen Winkelbereich, der dem Winkelinkrement der Winkelliste entspricht, um die gefundenen Rotationen herum, eine Feinsuche durchgeführt werden. Dabei wird der Winkelbereich für jeden Eulerwinkel in Winkel mit gleichen Abständen zerlegt. Auf diese Weise wird schließlich ein Winkelinkrement von typischerweise  $0.1^\circ$  erreicht. Auf eine Gleichverteilung der Winkel bei der Verfeinerung wird verzichtet.

Zusammengefasst werden bei der Subtomogrammalignierung in Iteration  $j$  folgende Schritte durchgeführt:

1. Erstelle  $\Omega(r)_j$  für alle Winkel.
2. Berechne  $CCF_i(\mathbf{t}, r)$  für alle Winkel und für alle Partikel.
3. Ermittle  $\max\{\max\{CCF_i(\mathbf{t}, r)\}\}$  für jedes Partikel.
4. Ordne diesem Wert die jeweilige Translation  $\mathbf{t}_i$  und Rotation  $r_i$  zu.
5. Konstruiere Strukturfaktorwichtungsfiler  $\bar{W}$ .
6. Berechne Mittelung  $\Omega_j$ .
7. Überprüfe Abbruchkriterium  $\max\{\Omega_{j-1} \star \Omega_j\} \geq \varepsilon$ .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $\varepsilon = 0.998$  gesetzt, wobei der Algorithmus typischerweise nach etwa 12 – 24 Iterationen das Abbruchkriterium erreicht.

Die Rechenzeit einer Iteration läßt sich wie folgt abschätzen. Seien dazu 1000 Subtomogramme der Größe  $64 \times 64 \times 64$  Pixel und eine Winkelliste mit 3000 Rotationen angenommen. Den Hauptanteil der Rechenzeit machen die  $1000 \times 3000$  Berechnungen der

$CCF_i(\mathbf{t}, r)$  aus. Eine dieser Operationen dauert etwa 0.04 s. Das macht in der Summe, zusammen mit den anderen Operationen, etwa 35 h für eine Iteration.

Der große Vorteil ist nun, dass sich der Algorithmus einfach parallelisieren lässt. Angenommen, es stünden 64 Prozessoren zur Verfügung, dann reduzierte sich die Rechenzeit für eine Iteration auf etwa 30 min. Parallelisierung wird von dem verwendeten Programm `tom_corr3d` auf unterschiedlichsten Rechnerarchitekturen hervorragend unterstützt. Die Subtomogrammalignierung von 1000 Partikeln mit einer Größe von  $64 \times 64 \times 64$  Pixel dauert mit 64 Prozessoren also etwa 6 h.

## 3.2 Klassifikation

Die hier beschriebene Klassifikationsmethode (Multireferenzklassifikation) ist eine Verallgemeinerung des oben beschriebenen Algorithmus. Anstatt nur einer Referenz werden  $N_K$  Referenzen verwendet, wobei  $N_K$  die Anzahl der Klassen und  $k = 1, \dots, N_K$  den Index einer Klasse bezeichnet. Die Alignierungsschleife wird dann in einer Iteration  $N_K \times$  durchlaufen, wobei die Rechenzeit ebenfalls  $N_K \times$  so groß ist.

Zusammengefasst werden bei der Subtomogrammklassifizierung in Iteration  $j$  folgende Schritte durchlaufen:

1. Erstelle  $\Omega(r)_j^k$  für alle Winkel und alle Klassen.
2. Berechne  $CCF_i^k(\mathbf{t}, r)$  für alle Winkel, alle Partikel und alle Klassen.
3. Ermittle  $\max\{\max\{\max\{CCF_i^k(\mathbf{t}, r)\}\}\}$  für jedes Partikel.
4. Ordne diesem Wert die jeweilige Translation  $\mathbf{t}_i$ , Rotation  $r_i$  und Klasse  $k$  zu.
5. Konstruiere Strukturfaktorwichtungsfiler  $\bar{W}^k$  für jede Klasse.
6. Berechne Mittelung  $\Omega_j^k$  für jede Klasse.
7. Überprüfe Abbruchkriterium  $(\frac{1}{N_K} \sum_{k=1}^{N_K} \max\{\Omega_{j-1}^k \star \Omega_j^k\}) \geq \varepsilon$ .

### 3.3 Auflösungs-messung

Die Standardtechnik zur Messung der Auflösung einer Mittelung wird als *Fourier shell correlation* (*FSC*) bezeichnet [131, 132]. Dabei wird der Partikelsatz in zwei Partikelsätze aufgeteilt und daraus zwei Mittelungen  $\Omega_g$  und  $\Omega_u$  berechnet, wobei die Zuordnung des Partikels zu der jeweiligen Mittelung von der Parität des Partikelindex abhängt. Mittels der *FSC* wird die Konsistenz der beiden Mittelungen, die hauptsächlich von der Alignierungsgenauigkeit und der *SNR* der Partikel abhängt, durch Vergleich ihrer Raumfrequenzspektren bewertet. Diese werden in konzentrische Schalen  $Q_s$  aufgeteilt und die *FSC* als Funktion des Schalenradius  $q_s$  berechnet. Die Kurve dieser Werte wird als *FSC*-Kurve bezeichnet; die *FSC* selbst ist im Intervall  $[-1, +1]$  durch folgende Gleichung definiert [133]:

$$FSC(q_s) = \frac{\sum_{v \in Q_s} \mathcal{F}\{\Omega_g\}^v \cdot \mathcal{F}^*\{\Omega_u\}^v}{\sqrt{\sum_{v \in Q_s} (\mathcal{F}\{\Omega_g\}^v)^2} \cdot \sqrt{\sum_{v \in Q_s} (\mathcal{F}\{\Omega_u\}^v)^2}}. \quad (3.9)$$

Im Hinblick auf die Messung der Auflösung liegt der *FSC* nun folgende Überlegung zugrunde. Angenommen, die Auflösung einer Mittelung wäre hoch, so lieferte  $FSC(q_s)$  für hohe Raumfrequenzen hohe Korrelationswerte, da dann die Feinstruktur der Raumfrequenzspektren der beiden Mittelungen weder durch Rauschen noch durch Alignierungsfehler gestört und sie sich deshalb sehr ähnlich wären. Bei niedriger Auflösung hingegen wäre die Feinstruktur durch Rauschen und Alignierungsfehler dominiert und  $FSC(q_s)$  ginge für hohe Raumfrequenzen gegen Null. Aus einer *FSC*-Kurve kann nun die Auflösung einer Mittelung durch verschiedene Kriterien und Schwellwertkurven abgeschätzt werden.

Das standardmäßig verwendete und am meisten akzeptierte Auflösungskriterium ist das 0.5 Kriterium. Dabei ist die Auflösung durch die Raumfrequenz  $q_s^{-1}$  gegeben, bei der  $FSC(q_s) = 0.5$  gilt. Andere Kriterien wären beispielsweise das 0.33 oder das 0.143 Kriterium [134]. Eine ausführliche Diskussion der verschiedenen *FSC* Kriterien kann in [133] gefunden werden.

Wenn Schwellwertkurven zur Auflösungsbestimmung verwendet werden, wird die Auflösung durch den Schnittpunkt der beiden Kurven bestimmt. Hierbei wird hauptsächlich die  $3\sigma$ -Kurve betrachtet, die aussagt, dass am Auflösungsschnittpunkt die statistische Signifikanz der Feinstruktur im Raumfrequenzspektrum drei Standardabweichungen über den erwarteten, zufälligen Fluktuationen liegt.

### 3 Subtomogrammalignment

Die  $3\sigma$ -Kurve ist eine Funktionen der Anzahl an Voxeln  $n(q_s)$  der betrachteten Schalen und ist wie folgt definiert [133]:

$$3\sigma(q_s) = \frac{2}{3} \cdot \frac{L}{D} \cdot \frac{3}{\sqrt{n(q_s)/2}} \cdot \sqrt{n_{\text{asym}}}, \quad (3.10)$$

wobei  $L$  die Länge der Mittelung,  $D$  der Durchmesser des Proteinkomplex und  $n_{\text{asym}}$  die Anzahl asymmetrischer Einheiten des Proteinkomplex bezeichnet.

Eine weitere Schwellwertkurve ist die 1bit-Kurve. An ihrem Schnittpunkt mit der  $FSC$ -Kurve ist die  $SNR$  der Mittelung gleich Eins. Sie ist wie folgt definiert [133]:

$$\text{1bit}(q_s) = \frac{0.5 + 2.4142 \cdot 1/\sqrt{n(q_s)}}{1.5 + 1.4142 \cdot 1/\sqrt{n(q_s)}}. \quad (3.11)$$

Der Hauptkritikpunkt an der  $FSC$  ist freilich, dass diese kein absolutes Maß für die Auflösung einer Mittelung darstellt. Jedoch verliert die  $FSC$  dadurch ihren Wert zur Abschätzung der Alignierungsgenauigkeit und des Signalgehalts der Mittlung nicht. Das zweite Problem ist, dass die Raumfrequenzschalen auch dann positiv korrelieren, wenn sie Raumfrequenzen enthalten, deren Phasen durch die  $CTF$  umgekehrt wurden. Zur Validierung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur Korrektur der  $CTF$  auf der Basis einer Mittelung mußte deshalb ein anderer Weg gegangen werden [135].

Eine Möglichkeit hierfür ist, die Auflösung einer Mittelung durch Vergleich mit der Kristallstruktur des untersuchten Proteinkomplex zu bestimmen. Diese Technik wird als *Cross resolution* bezeichnet. Dazu wird die Kristallstruktur zuerst in ein elektronenmikroskopisches Dichtevolumen übersetzt. Dieses wird im Folgenden mit  $A$  bezeichnet. Ein einfache Herangehensweise  $A$  zu konstruieren, besteht darin, in den Voxeln die Masenzahl der Atome des Proteins aufzusummieren, die unter einer bestimmten Voxelgröße in die jeweiligen Voxel fallen. Auf dieselbe Weise können aus Kristallstrukturen Muster für die Mustererkennung in Tomogrammen erzeugt werden [43]. Im nächsten Schritt müssen  $A$  und die Mittelung  $\Omega$  in dieselbe räumliche Orientierung gebracht werden. Hierfür steht die Funktion `tom_av3_dock` zur Verfügung, die im Wesentlichen auf dem Prinzip der Subtomogrammalignment beruht [43].

Wenn sich  $A$  und  $\Omega$  in der selben räumliche Orientierung befinden, kann die  $FSC$  zwischen beiden Volumen berechnet werden. Da aber in  $A$  kein Rauschen enthalten ist, müssen die Werte der  $FSC$  wie folgt korrigiert werden [134]:

$$C_{ref}(q_s) = \sqrt{\frac{2FSC(q_s)}{1 + FSC(q_s)}} \quad (3.12)$$

wobei die Kurve  $C_{ref}(q_s)$  als *Cross resolution* Kurve bezeichnet wird.

Die Auflösung der Mittelung  $\Omega$  ist nun durch die Raumfrequenz  $q_s^{-1}$  gegeben, bei der  $C_{ref}(q_s) = 0.5$  gilt. Es läßt sich zeigen, dass bei diesem Auflösungskriterium der Phasenfehler von  $\Omega$  relativ zu  $A$  gerade  $60^\circ$  beträgt. Dieses Maß für die Auflösung ist äquivalent zu dem in der Röntgenkristallographie verwendeten. Gemeinhin wird dort eine Struktur mit diesem Phasenfehler, im Hinblick auf die Erstellung einer Molekülstruktur, als interpretierbar angesehen [134].

## 3.4 Mustererkennung

Als Beispiel für Multireferenzklassifikation und Subtomogrammalignment soll nun die Anwendung dieser Methoden auf Tomogramm  $T_0$  beschrieben werden. Die grundlegende Idee war hier, einen Mustererkennungsalgorithmus für die Analyse von Tomogrammen zu entwickeln, der ohne Suchmuster auskommt. Es wird keinerlei Vorwissen über die untersuchten Strukturen vorausgesetzt.

Das analysierte Tomogramm (Abb. 1.2) zeigt einen Ausschnitt ( $\sim 0.25 \mu\text{m}^3$ ) des Cytoplasmas einer vitrifizierten *Dictyostelium discoideum* Zelle, die mittels der Kryo-FIB Technik auf eine Dicke von etwa 180 nm geschnitten wurde. Die zugrundeliegende Kippserie wurde mittels Merkmalverfolgung aligniert und mittels gewichteter Rückprojektion in ein Volumen der Größe  $512 \times 512 \times 80$  Pixel rekonstruiert. Die Voxelgröße der Rekonstruktion beträgt 2.3 nm.

Zur Mustererkennung wurde lediglich eine Kugel eingesetzt (Abb. 3.1). Ihr Durchmesser ist ein freier Parameter und wurde hier auf 25 nm (mit einer weichen Kante von etwa 4.6 nm) gesetzt, was dem Durchmesser eines 80S Ribosoms entspricht [136].

Zuerst wurde die Kreuzkorrelationsfunktion (`tom_corr`) zwischen Tomogramm und Kugel berechnet. Mit den Koordinaten der ersten 2000 lokalen Maxima (`tom_peak`) als Mittelpunkt, wurden die im Folgenden verwendeten Subtomogramme mit einer Größe von  $24 \times 24 \times 24$  Pixel ausgeschnitten. Die Kreuzkorrelationsoperation wirkt hier als

### 3 Subtomogrammalignment

Mustererkennungsfiler, der kontrastreiche, vom Hintergrund separierte Strukturen mit einer bestimmten Vorzugsgröße (Kugeldurchmesser) markiert. Die Anzahl der Subtomogramme stellt den zweiten freien Parameter der Methode dar.

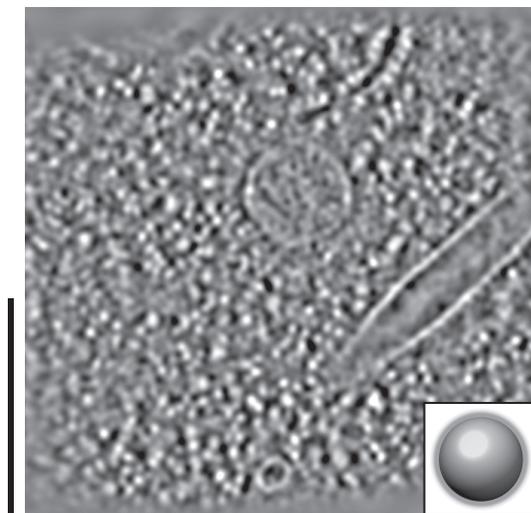


Abbildung 3.1: Kreuzkorrelation ( $xy$ -Schnitt) zwischen Kugel (vergrößert dargestellt) und Tomogramm  $T_0$ . An den Koordinaten der ersten 2000 lokalen Maxima (helle Bereiche) wurden die im Folgenden verwendeten Subtomogramme ausgeschnitten. Maßstab, 500 nm.

Die auf diese Weise ausgewählten Subtomogramme wurden dann einer Multi-referenzklassifikation (`tom_corr3d`) mit 12 Klassen unterzogen (Abb. 3.2). Als Startreferenz für die Klassifikation wurde dieselbe Kugel wie zur Mustererkennung verwendet. Um in der ersten Iteration Unterschiede zwischen den Klassen zu forcieren, wurden die 12 Startkugeln mit additivem, gaußischem Rauschen versehen ( $SNR \sim 0.3$ ).

Die Anzahl der Klassen bildet den dritten freien Parameter der Methode. Der Klassifikationsalgorithmus weist eine starke Tendenz auf, die Partikel gleichmäßig, auf die zur Verfügung stehenden Klassen, zu verteilen. Dementsprechend sollte die Anzahl der Klassen eher größer gewählt werden, um auch seltenen Strukturen eine eigene Klasse anbieten zu können.

Die Klassifikation wurde nach 16 Iterationen abgebrochen und die Klassenmittel wurden inspiziert (`tom_embrowse`). Während der Klassifikation haben sich vier ähnliche Klassen herausgebildet, die als membrangebundene Ribosomen (Klasse A), cytoplasmatische Ribosomen (Klasse B), Lysosom integrierte V-Typ-ATPasen (Klasse C) und cytoplasmatische Speichervesikel (Klasse D) identifiziert wurden. Die Partikel dieser Klassen wurden dann zu vier Partikelsätzen zusammengefasst und die Subtomogramme

### 3 Subtomogrammalignment

mit einer Größe von  $48 \times 48 \times 48$  Pixel erneut rekonstruiert (`tom_recparticles`). Die Pixelgröße der Subtomogramme beträgt jetzt 1.15 nm.

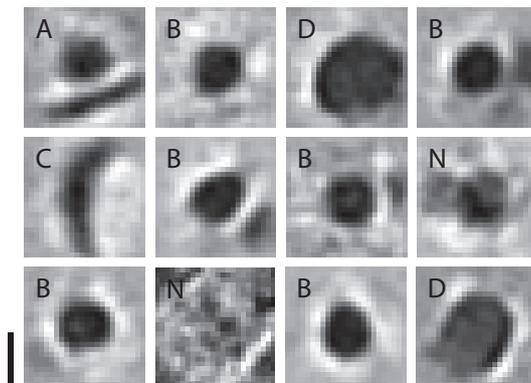


Abbildung 3.2: Ergebnis der Multireferenzklassifikation ( $xz$ -Schnitte durch die Klassenmittel) nach 16 Iterationen. Interessanterweise liefert die Klassifikation ohne Umschweife die bei der Betrachtung des Tomogramms ins Auge fallenden Strukturen: Membrangebundene Ribosomen (Klasse A), cytoplasmatische Ribosomen mit und ohne Nachbarribosomen (Klassen B), Lysosom integrierte V-Typ-ATPasen (Klasse C) und cytoplasmatische Speichervesikel (Klassen D). Die mit N gekennzeichneten Klassen wurden verworfen (78 Partikel). Die Berechnung wurde parallel auf 24 Prozessoren ausgeführt, wobei eine Iteration  $\sim 1$  h dauerte. Maßstab, 25 nm.

Die vier Klassen, beziehungsweise Partikelsätze, wurden nun getrennt voneinander aligniert, wobei als Startreferenz wiederum eine Kugel mit einem Durchmesser von 25 nm und einer weichen Kante von etwa 4.6 nm verwendet wurde. Zur Subtomogrammalignment der cytoplasmatische Ribosomen wurde eine kugelförmige Realraummaske  $M_\Omega$  gleicher Größe eingesetzt, um den Einfluß der Nachbarribosomen während der Alignierung zu minimieren.

Darüber hinaus wurden die Klassen weiter bereinigt. Dabei wurde nach Konvergenz der Mittelungen, die Höhe der Kreuzkorrelationsmaxima der Partikel relativ zur Referenz betrachtet und Partikel mit geringer Korrelation ( $\lesssim 0.3$ ) aus dem Partikelsatz entfernt. Daraufhin wurden die reduzierten Partikelsätze erneut klassenweise aligniert. Das Ergebnis ist in Abb. 1.3 dargestellt. Letztlich wurden in den Mittelungen folgende Anzahl an Partikeln integriert (von Klasse A bis D): 131, 903, 136, 170. Demnach wurden von den ursprünglich ausgewählten 2000 Subtomogrammen 660 verworfen. Die Auflösung der Klassenmittel wurde durch *Fourier shell correlation* (0.5 Kriterium) bestimmt (von Klasse A bis D):  $\sim 61 \text{ \AA}$ ,  $\sim 50 \text{ \AA}$ ,  $\sim 78 \text{ \AA}$ ,  $\sim 78 \text{ \AA}$ .

### 3 Subtomogrammalignment

Das Ergebnis der Mustererkennung kann nun dadurch visualisiert werden, indem an den Koordinaten der Partikel die jeweiligen Mittelungen, unter Beachtung ihrer jeweiligen Translationen und Rotationen, zu einem synthetischen Tomogramm kombiniert werden. In Abb. 3.3 ist das zu Tomogramm  $T_0$  gehörige, synthetische Tomogramm  $T_0^*$  abgebildet. Diese Tomogramme sind, abhängig von der  $SNR$  der Mittelungen, weitestgehend rauschfrei und besitzen keinen *Missing wedge*. Sie bilden die Basis für weitere Analysen im Hinblick auf Proteinkonzentrationen, -wechselwirkungen und -metastrukturen im Inneren einer Zelle (*Visual proteomics*) [39, 137].

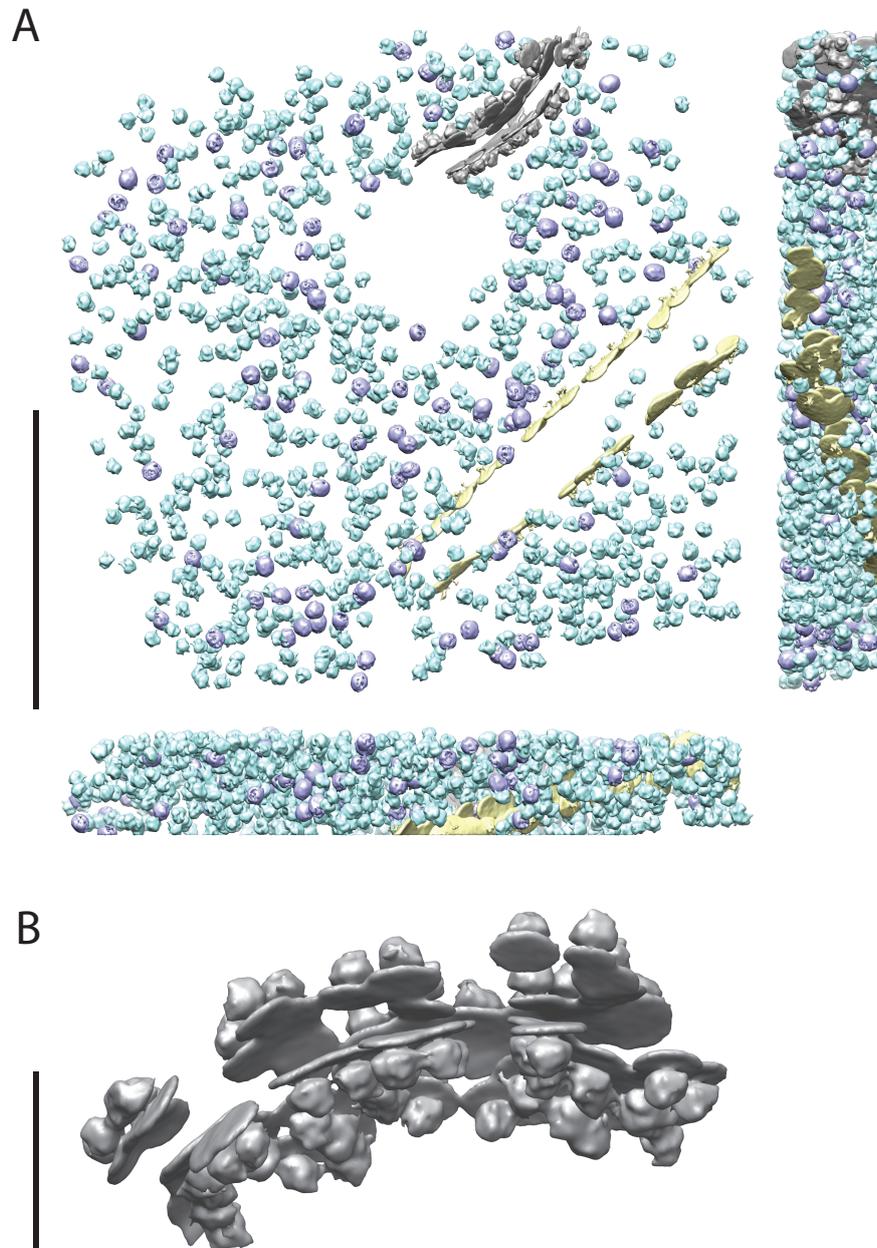


Abbildung 3.3: **A** Tomogramm  $T_0^*$  ( $xy$ -Schnitt; unten,  $xz$ -Schnitt; rechts,  $yz$ -Schnitt, Schnitt-  
dicke 2.3 nm). An den Koordinaten der anfangs ausgewählten Partikel, wurden  
unter Beachtung ihrer jeweiligen Translationen und Rotationen, die jeweiligen  
Klassenmittel eingefügt. Maßstab, 500 nm. **B** Vergrößerte Darstellung des En-  
doplasmatischen Retikulums. Maßstab, 100 nm.



## 4 Korrektur der Transferfunktionen

In diesem Kapitel wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Korrektur der *CTF* und *MTF* in der KET erläutert und dargestellt. Zum Abschluß des Kapitels wird auf die Implementierung der Methode im Rahmen der TOM Toolbox eingegangen. Ihre Anwendung in einem konkreten Projekt und schließlich ihre Validierung ist Gegenstand von Kap. 5. Zum gegenwärtigen Entwicklungsstand basiert die Methode auf einer Reihe von Näherungen, auf die im Folgenden eingegangen wird. In Kap. 6 werden Verbesserungsmöglichkeiten und Erweiterungsperspektiven vorgeschlagen.

Die erste, grundlegende Näherung der Methode besteht in der Annahme, dass untersuchte Objekt sei in den Projektionen ausschließlich im Phasenkontrast abgebildet. Die Phasenmodulation im Raumfrequenzspektrum der Projektionen soll also nur vom Defokus  $\Delta z$  und dem Defokusgradienten abhängen. Folglich wird in der *CTF* das Verhältnis von Amplitudenkontrast zu Phasenkontrast vernachlässigt und  $A = 0$  gesetzt.

Die zweite, grundlegende Näherung der Methode besteht in der Annahme, dass die Amplitudendämpfung des Raumfrequenzspektrums der Projektionen ausschließlich durch die modellierte *MTF* beschrieben werden kann, und damit einzig vom Abklingfaktor  $\sigma$  der verwendeten Kamera abhängt.

Beide Transferfunktionen können zu einer gemeinsamen Objekttransferfunktion *OTF* kombiniert werden (Abb. 4.1), deren Korrektur das Ziel der hier vorgestellten Methode ist. Die *OTF* ist wie folgt definiert:

$$OTF(q, \Delta z, \sigma) = 2 \sin W(q, \Delta z) e^{-\frac{q}{\sigma}}. \quad \text{Objekttransferfunktion} \quad (4.1)$$

Die inverse Fouriertransformation der *OTF* beschreibt den kombinierten Punktverbreiterungseffekt, der einerseits durch die von der Defokussierung des Objekts abhängigen *CTF* und andererseits durch die vom Abklingfaktor der Kamera abhängigen *MTF*, in jedem Punkt der Projektion mit Defokus  $\Delta z$  entsteht.

#### 4 Korrektur der Transferfunktionen

Die zugrundeliegende Hypothese besagt, dass eine auf diese Weise definierte Objekttransferfunktion im hier betrachteten Auflösungsbereich von etwa  $20\text{--}10\text{ \AA}$  auf der Ebene einer Mittelung eine ausreichende Beschreibung der optischen Transfercharakteristik eines KET-Experiments darstellt.

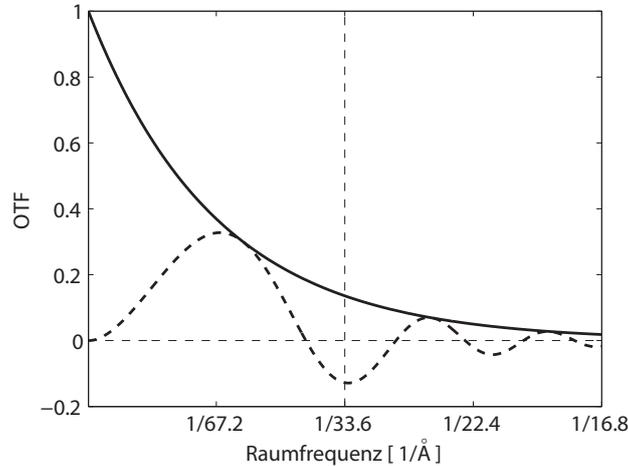


Abbildung 4.1: Die Objekttransferfunktion  $OTF$  (gestrichelte Linie) wird durch Multiplikation von  $CTF$  und  $MTF$  (durchgezogene Linie) gebildet. Für die Abbildung wurde eine  $CTF$  mit einem Defokus von  $-8\text{ }\mu\text{m}$  verwendet. Das Verhältnis von Amplitudenkontrast zu Phasenkontrast wurde auf Null gesetzt ( $A = 0$ , reiner Phasenkontrast). In diesem Fall ist die kontinuierliche Übertragung von Information durch die erste Nullstelle der  $CTF$  auf  $\sim 40\text{ \AA}$  beschränkt. Der Abblenfaktor  $\sigma$  der abgebildeten  $MTF$  beträgt  $(1/4)\nu$ , wobei  $\nu$  die Nyquist-Frequenz bezeichnet. Bei der halben Nyquist-Frequenz (vertikale, gestrichelte Linie) ist die Signalübertragung auf etwa 13 % des Ausgangswertes abgefallen.

Allgemein ist die Methode so aufgebaut, dass die  $CTF$ -Korrektur auf 2D Projektionsebene durchgeführt wird. Die Korrekturprozedur benötigt die Alignierungsparameter der Kippserie, so dass die  $CTF$ -Korrektur nach der Berechnung der Alignierungsparameter aber vor der Alignierung der Projektionen in den Arbeitsablauf integriert wird. Dahingegen erfolgt die Korrektur der  $MTF$  auf 3D Subtomogrammebene und ist in die Subtomogrammalignment einbezogen. Prinzipiell könnte die  $MTF$  ebenfalls auf 2D Ebene korrigiert werden. Um jedoch während der hintereinander ausgeführten Subtomogrammalignmentsschritte die Konvergenz der jeweiligen Mittelung zu sichern, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die  $MTF$ -Korrektur innerhalb eines iterativ mehr und mehr wachsenden Raumfrequenzbandes auszuführen. Es empfiehlt sich deshalb, die  $MTF$  auf 3D Ebene zu behandeln, weil dann die Subtomogramme nur einmal rekonstruiert werden müssen. Darüber hinaus sind Subtomogramme und Mittelung im Hinblick auf die  $MTF$  unterschiedlich zu behandeln.

Es sei noch darauf eingegangen, welche allgemeinen Bedingungen an die zu korrigierende Kippserie gestellt werden. Insbesondere wird vorausgesetzt, dass die  $N_p$  Projektionen  $p_i$  ( $i = 1, \dots, N_p$ ) unter den in Abschn. 2.2 definierten Bedingungen aufgenommen wurden, die Kippserie alignierbar ist und damit jeder Projektion sowohl Kippwinkel  $\vartheta_i$  als auch Kippachse  $\varphi_i$  zugeordnet werden kann. Desweiteren sollten die Projektionen aufsteigend nach Kippwinkel sortiert vorliegen (`tom_sortseries`) und einzeln auftretende, durch ein Röntgenquant überbelichtete Pixel durch den Mittelwert der benachbarten Pixel ersetzt worden sein (`tom_xraycorrect`).

## 4.1 Korrektur der Kontrasttransferfunktion

Bei der *CTF*-Korrektur einer Kippserie müssen vor allem zwei Schwierigkeiten überwunden werden. Die erste Schwierigkeit besteht darin, dass die Defokussierung des Objekts nicht mit hoher Genauigkeit direkt aus dem Raumfrequenzspektrum der Projektionen extrahiert werden kann. Der Grund hierfür liegt in der typischerweise sehr geringen *SNR* der Projektionen ( $\lesssim 0.1$  [17]), die durch eine Kombination aus niedriger Elektronendosis ( $20 - 60 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  [16]), die für die Aufnahme einer Kippserie zur Verfügung steht und der hohen Dicke des Objekts ( $\gtrsim 100 \text{ nm}$ ) zustande kommt.

### Defokusgradient

Die zweite Schwierigkeit bei der *CTF*-Korrektur einer Kippserie besteht darin, dass aufgrund der Kippung und der Dicke des Objekts jeder Objektpunkt mit unterschiedlichem Defokus abgebildet wird (Abb. 4.2). Im Vergleich zur Einzelpartikelanalyse kann in der KET gerade nicht von einer räumlich invarianten Punktverbreiterungsfunktion ausgegangen werden [138].

Wegen der vergleichsweise großen, lateralen Ausdehnung des Objektträgers<sup>1</sup> kann das Objekt in der KET im beobachteten Bereich, der durch die Reichweite des Strahlverschiebungssystem des TEM gegeben ist (etwa  $36 \mu\text{m}^2$  um die optische Achse bei Vergrößerungen  $> 27500 \times$  [97]), in guter Näherung als eine Ebene mit einer bestimmten Dicke  $T$  betrachtet werden.

---

<sup>1</sup>Typischerweise wird in der KET als Objektträger ein feines Kupfernetz verwendet, das einen Durchmesser von 3 mm besitzt und mit einer gelochten Kohlefolie überzogen ist. Die Probensuspension wird auf den Objektträger aufgebracht und durch Absaugen mit Filterpapier ein dünner Film erzeugt. Anschließend wird die Probe vitrifiziert.

Die effektive Dicke des Objekts ist eine Funktion des Kippwinkels  $\vartheta_i$  und nimmt durch die Kippung um den Faktor  $1/\cos \vartheta_i$  zu [20]. Das bedeutet, jeder Bildpunkt der Projektion  $p_i$  ist eine Überlagerung aus Objektpunkten, deren Defokus sich um maximal  $T/\cos \vartheta_i$  unterscheidet. Dieser Effekt wird als vertikaler Defokusgradient bezeichnet.

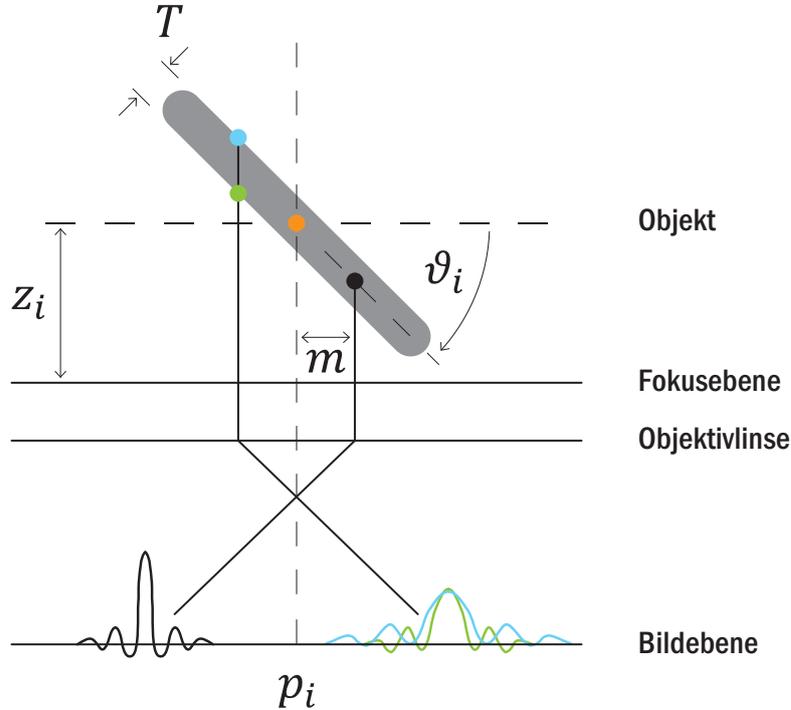


Abbildung 4.2: In der KET werden Projektionen  $p_i$  eines Objekts, das näherungsweise als Ebene mit einer Dicke  $T$  angesehen werden kann, unter dem Kippwinkel  $\vartheta_i$  betrachtet. Die Kippachse steht senkrecht auf der Zeichenebene und verläuft durch den zentralen Objektpunkt (oranger Punkt) mit Defokus  $z_i$ . Abhängig von der effektiven Dicke  $T/\cos \vartheta_i$  des Objekts überlagern sich in einem Bildpunkt unterschiedlich defokussierte Objektpunkte (blauer und grüner Punkt) mit unterschiedlichen Punktverbreiterungsfunktionen. Dieser Effekt wird als vertikaler Defokusgradient bezeichnet. Zusätzlich hängt der Defokus eines Objektpunkts (schwarzer Punkt) von seinem Lotabstand  $m$  zur Kippachse ab. Dadurch unterscheidet sich dieser vom zentralen Defokus  $z_i$  des Objekts um  $m \tan \vartheta_i$ . Dieser Effekt wird als horizontaler Defokusgradient bezeichnet.

Durch die Kippung des Objekts ändert sich der Defokus zusätzlich in der Richtung orthogonal zur Kippachse. Die Defokusabweichung eines Bildpunkts relativ zum zentralen Bildpunkt der Projektion ist dabei eine Funktion des Kippwinkels  $\vartheta_i$  und des Lotabstands  $m$  des Bildpunkts zur Kippachse und verhält sich wie  $m \tan \vartheta_i$ . Dieser Effekt wird als horizontaler Defokusgradient bezeichnet.

Als Beispiel sei nun eine Projektion mit einer Kantenlänge von  $1\ \mu\text{m}$  betrachtet. Das Objekt sei um einen Kippwinkel von  $60^\circ$  gekippt. Aufgrund des horizontalen Defokusgradienten würden sich dann die maximalen und minimalen Defokuswerte innerhalb der Projektion um etwa  $1.7\ \mu\text{m}$  unterscheiden. Hätte die Projektion eine Kantenlänge von  $500\ \text{nm}$ , reduzierte sich der Defokusunterschied um die Hälfte auf etwa  $850\ \text{nm}$ . Angenommen, das Objekt hätte eine Dicke von  $100\ \text{nm}$ , dann wären aufgrund des vertikalen Defokusgradienten in jedem Bildpunkt der Projektion Objektpunkte mit einem maximalen Defokusunterschied von  $200\ \text{nm}$  überlagert.

Die magnetische Elektronenoptik des TEM induziert eine Bildrotation. Der Rotationswinkel wird als Kippachse  $\varphi_i$  bezeichnet, seine Berechnung ist Bestandteil der Alignierung einer Kippserie. Dabei beschreibt  $\varphi_i$  die Orientierung der Kippachse in der Projektion  $p_i$ . Da die Orientierung des horizontalen Defokusgradienten parallel zur Kippachse verläuft, beschreibt  $\varphi_i$  gleichzeitig die Orientierung des horizontalen Defokusgradienten in der Projektion.

Die dritte, grundlegende Näherung der Methode besteht in der Annahme, dass eine (technisch wie auch immer gartete) Defokusmessung einer Projektion gerade den mittleren Defokus  $z_i$  des Objekts liefert. Das bedeutet, es wird angenommen, dass der Defokusgradient die Thon-Ringe lediglich verbreitert, aber nicht deren Position verschiebt, so dass diese den Nullstellen einer *CTF* mit dem Defokus  $z_i$  des zentralen Bildpunkts der Projektion entspricht.

Implizit wird dabei wiederum angenommen, dass der gelochte Kohlefilm des Objektträgers zusammen mit dem Eisfilm, in den das untersuchte Objekt eingebettet ist, im beobachteten Bereich eine Ebene mit einer bestimmten Dicke  $T$  bildet. Aus den Orientierungsparametern dieser Ebene, die in guter Näherung durch Kippwinkel  $\vartheta_i$  und Kippachse  $\varphi_i$  gegeben sind, kann dann der horizontale Defokusgradient aus dem Defokus  $z_i$  berechnet und anschließend korrigiert werden.

Es werden dabei sowohl eine mögliche Neigung des horizontalen Defokusgradienten in Richtung der Kippachse als auch eine mögliche Vorkippung des Objekts vernachlässigt. Ebenfalls wird der vertikale Defokusgradient, der gerade durch die Dicke  $T$  des Objekts generiert wird, vernachlässigt und das Objekt wird als dünn angesehen ( $T \approx 0$ ). Diese drei stellen die vierte, fünfte und sechste grundlegende Näherung der Methode dar.

Der Defokusgradient  $Z_i$  der Projektion  $p_i$  läßt sich dann mittels Kippwinkel  $\vartheta_i$  und Kippachse  $\varphi_i$  wie folgt berechnen:

$$Z_i^{mn} = z_i + \hat{m}\eta \tan \vartheta_i \quad \text{mit} \quad \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \varphi_i & -\sin \varphi_i \\ \sin \varphi_i & \cos \varphi_i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{m} \\ \hat{n} \end{pmatrix}, \quad \text{Defokusgradient} \quad (4.2)$$

wobei  $\hat{m}$  und  $\hat{n}$  die Koordinaten des Defokusgradienten in  $x$ -Richtung beziehungsweise  $y$ -Richtung und  $m$  und  $n$  die transformierten Koordinaten des invers um die Kippachse rotierten Defokusgradienten bezeichnen;  $\eta$  ist die Pixelgröße.

Tatsächlich enthalten die Defokusgradienten  $Z_i$  die Defokusinformation über jeden Pixel der zu korrigierenden Kippserie. Damit reduziert sich das Problem der *CTF*-Korrektur auf die Bestimmung des Defokus  $z_i$  des zentralen Bildpunkts der Projektion  $p_i$ .

### Erweitertes Aufnahmeschema

Die grundlegende Idee zur Bestimmung des Defokus  $z_i$  und der Kern der Methode basiert auf einer Erweiterung des klassischen Aufnahmeschemas einer Kippserie und wird als erweitertes Aufnahmeschema bezeichnet (Abb. 4.3).

Dabei werden entlang der Kippachse an zwei zusätzlichen Aufnahmestellen, die in einem Abstand  $d^j$  ( $j = 1, 2$ ) diametral entgegengesetzt von der Aufnahmestelle des Objekts platziert sind, zusätzliche Projektionen  $f_i^j$  aufgenommen. Diese werden als Fokusbilder und ihre Aufnahmestellen als Fokusstellen bezeichnet.

Im einfachsten Fall sind Zentrierungsstelle, Autofokussierungsstelle und eine der beiden Fokusstellen deckungsgleich. Aufgrund der räumlichen Entfernung zwischen Objekt und Fokusstellen können die Fokusbilder mit höherer Dosis aufgenommen und im Hinblick auf die Defokusmessung optimiert werden, ohne das Objekt einer zusätzlichen Strahlenbelastung auszusetzen.

Schließlich wird aus dem Defokus  $z_i^j$  des zentralen Bildpunkts der Fokusbilder  $f_i^j$  der gesuchte Defokus  $z_i$  des zentralen Bildpunkts der Projektion  $p_i$  unter Berücksichtigung der Abstände  $d^j$  durch Interpolation bestimmt.

Es bietet sich an, die Fokusstellen auf dem Kohlefilm des Objektträgers zu platzieren. Vor Aufnahme der Kippserie wird der Eisfilm durch lange Belichtung bei heruntergeklapptem Fluoreszenzschirm entfernt und der Kohlefilm freigelegt. Während der Aufnahme der Kippserie werden die Fokusbilder  $f_i^j$  mit hoher Elektronendosis aufgenommen, die einfach durch Belichtungszeitverlängerung erzeugt werden kann.

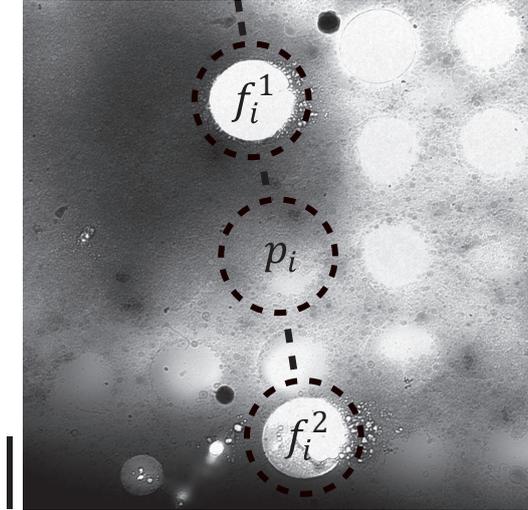


Abbildung 4.3: Das Übersichtsbild zeigt den Aufnahmebereich einer Kippserie nach der Datenakquise mit dem erweiterten Aufnahmeschema. Der Verlauf der Kippachse ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die Fokusstellen  $f_i^1$  und  $f_i^2$  werden auf dem Kohlefilm des Objektträgers platziert, der vor Aufnahme der Kippserie vollständig vom Eisfilm befreit wird. Die Fokusbilder werden im Hinblick auf die Defokussmessung optimiert und mit hoher Dosis aufgenommen. Sie sind mit gestrichelten Kreisen umrandet eingezeichnet, genauso wie die Aufnahme Stelle der Projektionen  $p_i$  des Objekts, die zwischen den beiden Fokusstellen in einem Abstand von etwa  $4 - 5 \mu\text{m}$  liegt, um Strahlenschaden zu vermeiden. Für die Defokusinterpolation wird angenommen, dass der gelochte Kohlefilm des Objektträgers in dem abgebildeten Bereich näherungsweise eine Ebene bildet. Maßstab,  $2 \mu\text{m}$ .

Durch die Vorbelichtung ist die Fokusstelle extrem dünn und besteht im wesentlichen aus Kohlefilm, der wiederum im Powerspektrum  $|\mathcal{F}\{f_i^j\}|^2$  der Fokusbilder  $f_i^j$  unter der hohen Elektronendosis deutlich sichtbare Thon-Ringe generiert, die eine Defokussmessung einfach und genau gestalten.

Durch das erweiterte Aufnahmeschema wird das Problem der Defokussmessung von der Niedrigdosisbedingung für Objektprojektionen vollständig entkoppelt. Das komplexe Problem der Defokussmessung auf den Niedrigdosisprojektionen wird durch das weitaus einfachere Prinzip der Defokusinterpolation ersetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das erweiterte Aufnahmeschema semiautomatisch umgesetzt. Die Aufgaben Kippung, Zentrierung, Autofokussierung und Aufnahme der Objektprojektionen wurden automatisch mittels `Xplore3D` (FEI) abgearbeitet, die Aufnahme der Fokusbilder jedoch manuell mit dem `Tecnai user interface` (FEI). Dazu wurde `Xplore3D` jeweils nach erfolgter Aufnahme der Objektprojektionen gestoppt. Der zusätzliche Zeitaufwand pro Kippserie betrug in etwa 1 h.

Allerdings eignet sich das erweiterte Aufnahmeschema hervorragend für die Automatisierung, da es das übliche Aufnahmeschema lediglich um zusätzliche Mikroskopoperationen erweitert, die aber für sich genommen im klassischen Aufnahmeschema bereits enthalten sind. Kürzlich wurden zwei neue Fassungen erprobter Aufnahmesoftwares für die KET herausgebracht, namentlich **SerialEM** [102] und **TOM<sup>2</sup>** [101], die beide eine automatisierte Durchführung des erweiterten Aufnahmeschemas ermöglichen.

Die experimentielle Umsetzung des erweiterten Aufnahmeschemas wird erleichtert, wenn folgende Punkte beachtet werden. Das Objekt sollte mit der Mikroskopbühne zentriert werden und nicht mit einer Strahlverschiebung, so dass die optische Achse des Mikroskops, der Mittelpunkt des Strahls und der Mittelpunkt des Objekts möglichst deckungsgleich sind. Desweiteren sollte die  $z$ -Höhe des Objekts so eingestellt werden, dass die Kippachse durch den Schwerpunkt des Objekts verläuft. Sie sollte also möglichst euzentrisch sein. Darüber hinaus ist darauf zu achten, dass die Orientierung der Kippachse in der Aufnahmesoftware beziehungsweise innerhalb des Strahlverschiebungssystems so kalibriert ist, dass sie möglichst genau mit der tatsächlichen Orientierung der Kippachse übereinstimmt.

### **Defokusinterpolation**

Die Genauigkeit der Defokusinterpolation hängt nun von zwei Faktoren ab. Erstens ist es notwendig, dass die Fokusstellen und die Aufnahmeestelle des Objekts auf einer Geraden liegen. Diese Bedingung wird durch das Strahlverschiebungssystem mit hoher Präzision erfüllt. Zweitens müssen die drei Aufnahmestellen auf einer gemeinsamen Ebene liegen. Diese Bedingung wird für die Fokusstellen durch den Kohlefilm des Objektträgers erfüllt. Im Hinblick auf die Aufnahmeestelle des Objekts, gilt diese Bedingung dann, wenn der Schwerpunkt des Objekts, welches in den Löchern des Kohlefilms im Eisfilm eingebettet ist, ebenfalls in der Ebene des Kohlefilms liegt. Dies kann überprüft werden, wenn in der Rekonstruktion des Objekts ein Randbereich des Kohlefilms als Referenz enthalten ist.

Folglich besteht die siebte, grundlegende Näherung der Methode in der Annahme, dass der Kohlefilm des Objektträgers ein hinreichend ebenes Referenzsystem für die Defokusmessung und Defokusinterpolation darstellt und im beobachteten Bereich nicht gekrümmt ist.

Die Interpolationsgleichung für die Bestimmung des gesuchten Defokus  $z_i$  aus den Defokuswerten  $z_i^j$  der Fokusbilder  $f_i^j$  mit Abstand  $d^j$  von der Aufnahmestelle des Objekts lautet nun wie folgt:

$$z_i = \frac{z_i^1 \cdot d^2 + d^1 \cdot z_i^2}{d^1 + d^2} + \Delta_z, \quad \text{Defokusinterpolation} \quad (4.3)$$

wobei durch die Konstante  $\Delta_z$  einer systematischen Abweichung zwischen Objektschwerpunkt und Kohlefilmebene Rechnung getragen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit trat eine Abweichung dieser Art nicht auf und es wurde ausschließlich  $\Delta_z = 0$  gesetzt.

Der entscheidende Punkt bei der Defokusinterpolation ist, dass diese unabhängig von der tatsächlichen Platzierung der Fokusstellen bleibt, solange diese mit der Aufnahmestelle des Objekts auf einer Geraden liegen. Das bedeutet, es wird nicht vorausgesetzt, dass die Fokusstellen exakt auf der Kippachse liegen, sie könnten beispielsweise auch auf einer Geraden orthogonal zur Kippachse liegen. Dann müsste jedoch das Strahlverschiebungssystem nach jeder Kippung nachgeführt werden, was die experimentelle Umsetzung des erweiterten Aufnahmeschemas deutlich verkomplizieren würde. Darüber hinaus ist die Defokusinterpolation ebenfalls unabhängig von der Orientierung der Kohlefilmebene. Das bedeutet, die Fokusstellen können auf unterschiedlichen  $z$ -Höhen liegen, ohne die Genauigkeit der Defokusinterpolation zu beeinflussen. Bei der reinen Anwendung der Autofokussierung würde dies jedoch zu einem systematischen Fehler führen. Zusammengenommen repräsentieren die interpolierten Defokuswerte  $z_i$  den Defokus des Objekts nach jeder Kippung  $\vartheta_i$  und werden gerade nicht durch Ungenauigkeiten bei der Zentrierung und Autofokussierung im Rahmen der Aufnahme einer Kippserie beeinflusst.

Die Messung der Defokuswerte  $z_i^j$  wurde wie folgt in vier Schritten realisiert. Im ersten Schritt wurde das entsprechende Fokusbild  $f_i^j$  in ein Raster kleinerer Subbilder gleicher Größe zerlegt, wobei sich die Subbilder um den Faktor 1/2 oder 1/4 überlappen. Das Powerspektrum der einzelnen Subbilder wurde berechnet und die Powerspektren aller Subbilder gemittelt. Diese Technik wird als Periodogrammmittelung [139] und das gemittelte Powerspektrum als Periodogramm bezeichnet.

Die Größe der Subbilder beträgt typischerweise  $128 \times 128$  Pixel,  $256 \times 256$  Pixel oder  $512 \times 512$  Pixel und definiert die Größe des Periodogramms, das für die Defokusmessung verwendet wird. Durch die inkohärente Mittelung der Powerspektren der Subbilder, deren Anzahl von ihrer Größe und dem Überlappungsfaktor abhängt, wird das Signal im Periodogramm verstärkt und die Thon-Ringe können deutlicher herausgearbeitet

werden. Freilich sinkt dadurch auch die Auflösung des Periodogramms, so dass die optimale Kombination aus Größe und Überlappung für jeden Datensatz neu herausgefunden werden muss. Aufgrund des hohen Signalgehalts eines Fokusbildes ist hier typischerweise eine Größe von  $512 \times 512$  Pixel mit einer Überlappung von  $1/2$  ausreichend.

Im zweiten Schritt wurde der Hintergrund des Periodogramms durch Hochpassfilterung entfernt [18]. Der optimale Filter muss ebenfalls für jeden Datensatz neu bestimmt werden. Das Periodogramm wurde schließlich logarithmiert und im Intervall zwischen  $[0, 1]$  normalisiert.

Im dritten Schritt erfolgt die eigentliche Defokussmessung. Dabei wurden theoretische Powerspektren mit einem Defokusabstand  $\Lambda$  in einem bestimmten Intervall (typischerweise  $\pm 3 \mu\text{m}$ ) um den durch Autofokussierung eingestellten Defokus herum erzeugt. Zwischen diesen theoretischen Powerspektren und dem Periodogramm wurde dann der Kreuzkorrelationskoeffizient berechnet [18, 77]. Das theoretische Powerspektrum mit dem höchsten Kreuzkorrelationskoeffizienten liefert den Defokus des Periodogramms und damit den gesuchten Defokus  $z_i^j$  des Fokusbildes  $f_i^j$ . Die untere Genauigkeitsgrenze der Defokussmessung ist dabei durch den Abtastabstand gegeben und beträgt  $\pm\Lambda$ . In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich  $\Lambda = 50 \text{ nm}$  gesetzt.

Im vierten Schritt wurde das Ergebnis der jeweiligen Defokussmessung visuell überprüft. Hierfür wurden die Nullstellen einer  $CTF$  mit Defokus  $z_i^j$  über das entsprechende Periodogramm des Fokusbildes  $f_i^j$  geplottet. Die obere Genauigkeitsgrenze der Defokussmessung kann dabei durch die Breite des Thon-Rings höchster Ordnung, der im Periodogramm noch zu erkennen ist und durch die Defokussmessung zentral getroffen wurde, abgeschätzt werden.

Der komplette Prozess der Defokussmessung wurde in einem interaktiven Programm mit graphischer Benutzeroberfläche zusammengefasst (`tom_InspectDZgui`), auf das in Abschn. 4.3 kurz eingegangen wird.

### Defokusglättung

Zur Glättung der interpolierten Defokuswerte wurden zwei Herangehensweisen verfolgt. Die erste Strategie basiert auf einer vollständigen Glättung der interpolierten Defokuswerte durch Mittelwertbildung:

$$\bar{z} = \frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} z_i, \quad \text{mittlerer Defokus} \quad (4.4)$$

wobei  $\bar{z}$  als mittlerer Defokus bezeichnet wird. Hierbei wird vor allem vorausgesetzt, dass die Meßfehler der interpolierten Defokuswerte zufällig verteilt sind und um eine bestimmte Defokussierung, die für die jeweilige Kippserie charakteristisch ist, fluktuieren. Darüber hinaus wird angenommen, dass jeglicher Defokustrend, der in den interpolierten Defokuswerten enthalten sein mag, vernachlässigt werden kann.

Die zweite Strategie hingegen basiert auf einer Miteinbeziehung einer möglichen Abweichung des Objekts von der Euzentrizität, die gerade einen systematischen Defokustrend generieren würde. Angenommen, der Objektschwerpunkt liegt um einen Abstand  $h_x$  in  $x$ -Richtung und um einen Abstand  $h_z$  in  $z$ -Richtung versetzt vom tatsächlichen euzentrischen Drehpunkt mit Defokus  $z_e$ . Die Abweichungen<sup>2</sup>  $h_x$  und  $h_z$  würden dann zu einer Modulation der gemessenen Defokuswerte führen, da sich die  $z$ -Koordinate des Objektschwerpunkts auf einer halbkreisförmigen Trajektorie bewegte, deren Öffnungswinkel gerade die Summe aus dem Betrag des minimalen und maximalen Kippwinkels wäre. Für die theoretisch erwarteten Defokuswerte  $\hat{z}_i$  gilt dann folgendes Modell:

$$\hat{z}_i = z_e + h_x \sin \vartheta_i + h_z \cos \vartheta_i. \quad \text{Defokusmodell} \quad (4.5)$$

Basierend auf diesem Modell wurde eine geglättete Fassung der interpolierten Defokuswerte durch Minimierung des Funktionals

$$Q(z_e, h_x, h_z) = \sum_i (z_i - \hat{z}_i)^2 \quad (4.6)$$

bezüglich der Parameter  $\{z_e, h_x, h_z\}$  erhalten. Die auf diese Weise erzeugten Defokuswerte werden im Folgenden mit dem Symbol  $\tilde{z}_i$  bezeichnet.

---

<sup>2</sup>Da der Defokus in Richtung der Kippachse als näherungsweise konstant angesehen wird, bleibt hier eine mögliche Abweichung in  $y$ -Richtung unberücksichtigt.

Die Gültigkeit des Defokusmodells selbst und damit der modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$  hängt jedoch von der Genauigkeit der Zentrierungs- und der Autofokussierungsoperation ab. Implizit gründet das Defokusmodell darauf, dass die Position der Kippachse während des gesamten Kippexperiments konstant bleibt. Dies ist aber nur dann der Fall, wenn die zufälligen Verschiebungen, die durch die mechanische Ungenauigkeit des Kipphalters induziert werden, nach jeder Kippung vollständig ausgeglichen werden. Ist dies jedoch durch Zentrierungs- und Autofokussierungsfehler nur bedingt der Fall, beschreibt der Objektschwerpunkt während der Aufnahme der Kippserie eine 3D Zufallsbewegung (*Random walk*), was die Anwendbarkeit des Defokusmodells, abhängig von der Größe der Fehler, einschränkt.

Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurde die Aufnahme einer Kippserie mit dem erweiterten Aufnahmeschema in einer Modellrechnung simuliert. Die Fokusstellen wurden dabei in einer Entfernung von  $d^j = 5 \mu\text{m}$  diametral entlang der Kippachse bezüglich der Aufnahmestelle des Objekts platziert. In der Realität kann es sowohl zu einer Abweichung der Kalibration des Strahlverschiebungssystems von der tatsächlichen Kippachse als auch zu einer Neigung des Kohlefilms in Richtung der Kippachse kommen. Beide Effekte wurden mit  $3^\circ$  berücksichtigt<sup>3</sup>. Die Abweichung des Objektschwerpunkts von der Euzentrität hingegen wurde in  $x$ -Richtung mit  $h_x = 50 \text{ nm}$  und in  $z$ -Richtung mit  $h_z = -100 \text{ nm}$  modelliert. Der euzentrische Defokus  $z_e$  wurde auf  $-5 \mu\text{m}$  gesetzt. Die zufälligen Verschiebungen der Probe wurden nach jeder simulierten Kippung für jede Raumrichtung zufällig aus einem Intervall von  $\pm 300 \text{ nm}$  ausgewählt. Dies entspricht in etwa der Genauigkeit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kippbühne<sup>4</sup>.

Die Simulation wurde dann für drei verschiedene Situationen durchgeführt. Im ersten Fall wurde von fehlerfreier Zentrierung und Autofokussierung ausgegangen, im zweiten

---

<sup>3</sup>Die Wahl dieser Werte beruht auf den Ergebnissen des MspA-Projekts (Kap. 5). Dort wurde eine systematische Abweichung zwischen der Kalibration des Strahlverschiebungssystems und der Kippachse von etwa  $3^\circ$  beobachtet. Die Neigung  $\psi$  des Kohlefilms in Richtung der Kippachse wiederum kann aus den Defokuswerten  $z_i^j$  der Fokusstellen  $f_i^j$  durch folgende Gleichung abgeschätzt werden:

$$\tan \psi = \frac{\bar{z}^2 - \bar{z}^1}{d^1 + d^2} \quad (4.7)$$

wobei  $\bar{z}^1$  und  $\bar{z}^2$  die Mittelwerte der Defokuswerte  $z_i^1$  beziehungsweise  $z_i^2$  über die jeweilige Kippserie bezeichnen. Experimentell wurden für  $\psi$  Werte zwischen  $-0.3$  bis  $3.4^\circ$  gefunden.

<sup>4</sup>Diese Abschätzung basiert ebenfalls auf den Ergebnissen des MspA-Projekts (Kap. 5). Hier wurde eine Projektionsgröße von etwa  $400 \times 400 \text{ nm}$  realisiert. Ab einer Ungenauigkeit der Kippbühne von  $\gtrsim 3/4$  der Bildgröße nimmt die Möglichkeit zur automatischen Zentrierung drastisch ab. In den meisten Fällen war diese jedoch möglich, was zu obiger Abschätzung führt. In Einzelfällen, ausschließlich bei Kippwinkeln mit Betrag  $\geq 54^\circ$ , musste manuell nachzentriert werden. Hier kann eher von einer Ungenauigkeit von  $\pm 500 \text{ nm}$  ausgegangen werden.

Fall wurde der Zentrierungsfehler aus dem Intervall  $\pm 50$  nm und der Autofokussierungsfehler aus dem Intervall  $\pm 150$  nm zufällig ausgewählt. Im dritten Fall wurden die Fehlerintervalle jeweils verdoppelt. Für den zweiten und dritten Fall wurde die Simulation  $20\times$  wiederholt. In Abb. 4.4 sind typische Ergebnisse der Modellrechnung dargestellt.

Kurz zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild. Die interpolierten Defokuswerte  $z_i$  liefern den tatsächlichen Defokus des Objekts und sind nicht von Fehlern bei Zentrierung und Autofokussierung beeinflusst, genauso wie die mittleren Defokuswerte  $\bar{z}$ . Die modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$  stimmen im ersten Fall vollständig mit den interpolierten Defokuswerten  $z_i$  überein. Bei geringen Zentrierungs- und Autofokussierungsfehlern, spiegeln die modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$  den Defokustrend wider, der in diesem Fall hauptsächlich durch die Diseuzentrität des Objekts erzeugt wird. Im dritten Fall jedoch, bei hohen Zentrierungs- und Autofokussierungsfehlern, verliert das Defokusmodell seine Anwendbarkeit. Der Defokustrend wird nun hauptsächlich durch die Zufallsbewegung des Objekts bestimmt.

### Defokuskorrektur

Die eigentliche Defokuskorrektur der Projektionen erfolgte nach dem Ansatz von Zanetti et al. [140]. Hierbei werden die Projektionen  $p_i$  jeweils in ein Raster kleinerer Subbilder  $\xi$  gleicher Größe zerlegt. Der Defokus des zentralen Pixels der jeweiligen Subbilder  $\xi$  mit Koordinaten  $(m, n)$  wird über Gln. 4.2 berechnet. In dieser Gleichung würde der interpolierte Defokus  $z_i$  beispielsweise durch  $\bar{z}$  oder  $\tilde{z}_i$  ersetzt, wenn die Projektionen mit anderen Defokuswerten korrigiert werden sollen. Dann wird um den zentralen Pixel herum ein größeres Subbild  $\zeta$  ausgeschnitten, welches  $\xi$  mittig enthält. Anschließend wird die Fourier-Transformation von  $\zeta$  berechnet und diese mit  $\text{sign}(CTF(q, Z_i^{mn}))$  multipliziert und dadurch korrigiert, wobei  $\text{sign}$  die Signumsfunktion bezeichnet und das Vorzeichen von  $CTF(q, Z_i^{mn})$  für jede Raumfrequenz  $q$  liefert.

Diese Operation führt dazu, dass Bereiche des Raumfrequenzspektrums mit negativer Phase umgekehrt werden, während positive Phasenbereiche unangetastet bleiben (Abb. 4.5). Diese Technik zur  $CTF$ -Korrektur wird als Phasenumkehrung [19] bezeichnet und ist neben der Wiener-Filterung [19] eine Standardtechnik in der Einzelpartikelanalyse. In der KET jedoch muss diese diskretisiert auf Teilbereiche  $\xi \in \zeta$  der Projektionen angewendet werden, um eine Korrektur des Defokusgradienten zu erreichen. Der große Vorteil der Phasenumkehrung gegenüber der Wiener-Filterung besteht darin, dass hier das Raumfrequenzspektrum bis auf die Phasenumkehrung unverändert bleibt, insbesondere also die Nullstellen der  $CTF$  unbeachtet bleiben können.

#### 4 Korrektur der Transferfunktionen

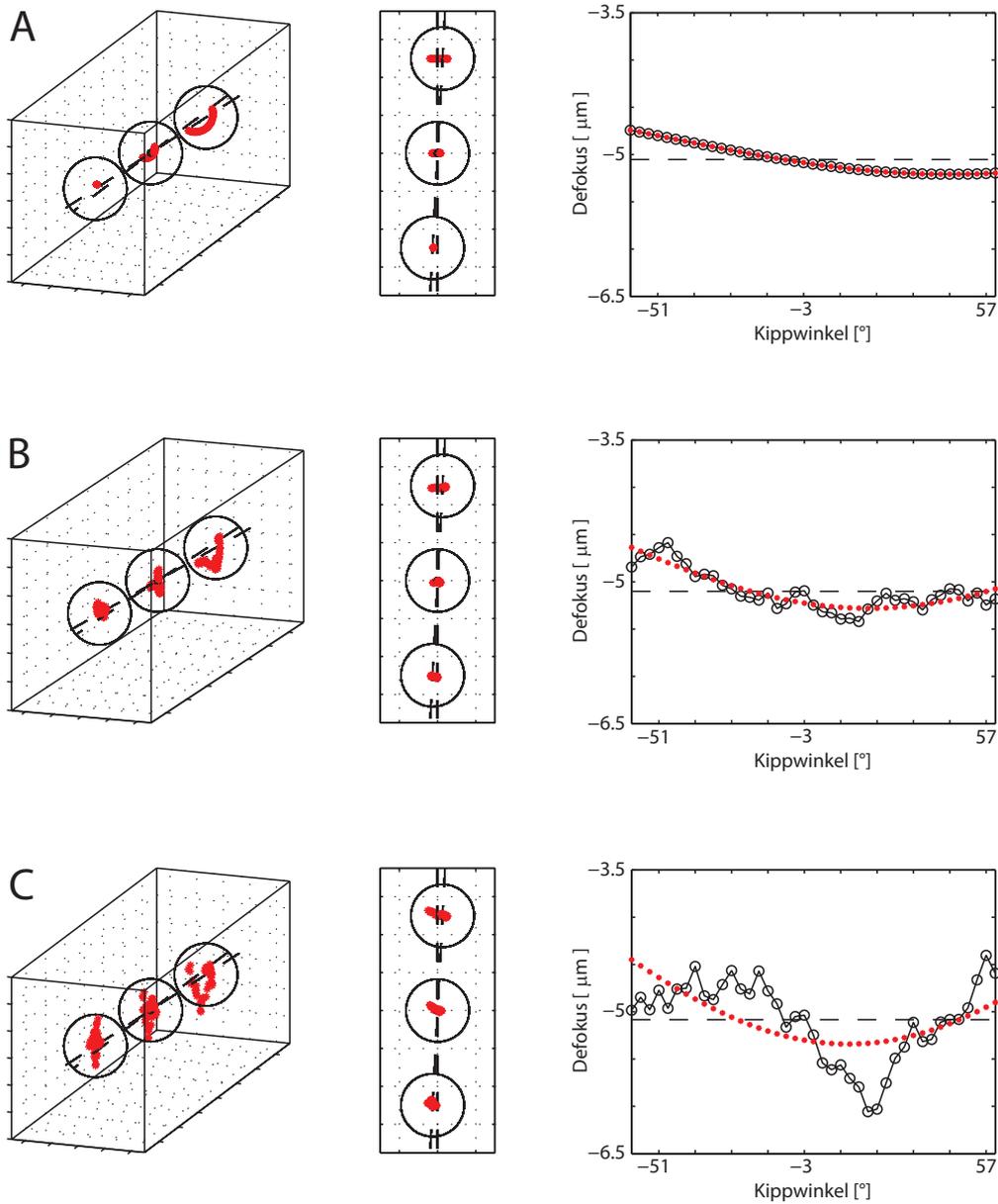


Abbildung 4.4: Typische Ergebnisse der Modelrechnungen zur Untersuchung der Anwendbarkeit des Defokusmodells in Abhängigkeit von Fehlern bei Zentrierung und Autofokussierung. Bildzeilen **A**, **B**, **C**: Erster, zweiter, dritter Fall. Linke Spalte: Objektschwerpunkte (rot). Die Fokusstellen und die Aufnahme­stelle des Objekts sind als Kreise dargestellt. Zentrierung und Autofokussierung wurden auf der perspektivisch vorne liegenden Fokus­stelle simuliert. Mittlere Spalte: Draufsicht. Die Kippachse (gestrichelt) verläuft vertikal ( $y$ -Achse). Die Achse des Strahlverschiebungssystems (ebenfalls gestrichelt) ist um  $3^\circ$  relativ zur Kippachse gedreht. Rechte Spalte: Die simulierten Defokuswerte sind als durchgezogene Linie eingefügt. Interpolierte Defokuswerte (Kreise). Mittlere Defokuswerte (gestrichelt). Modellierte Defokuswerte (rot).

#### 4 Korrektur der Transferfunktionen

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Nullstellen im Hinblick auf die Subtomogrammalignment im Allgemeinen keine Einschränkung der Auflösung einer Mittelung bedeuten. Typischerweise werden Subtomogramme kombiniert, die aus mehreren Tomogrammen stammen, deren Defokus wiederum so gewählt werden kann, dass die Nullstellen mit Signal aufgefüllt werden. Weiterhin ist zu beachten, dass in einem einzigen Tomogramm aufgrund des Defokusgradienten und der zufälligen Verschiebungen des Objekts in  $z$ -Richtung, die Defokuswerte um die Nullstellen des durch Autofokussierung eingestellten Defokus herum breit gestreut werden.

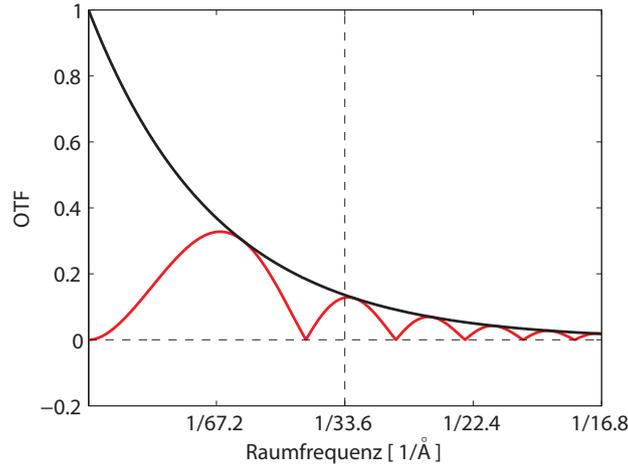


Abbildung 4.5: In der Abbildung ist eine Objekttransferfunktion  $OTF$  (rote Linie) nach  $CTF$ -Korrektur durch Phasenumkehrung dargestellt. Dabei werden Bereiche mit negativer Phase mit negativem Vorzeichen multipliziert. Auf diese Weise wird das Vorzeichen der Phasen über das gesamte Raumfrequenzspektrum vereinheitlicht. Die Auflösung ist jetzt nicht mehr auf die erste Nullstelle der  $CTF$  beschränkt, da das gesamte Raumfrequenzspektrum im Hinblick auf die Phaseninformation interpretierbar ist. Die Nullstellen der  $CTF$ , sowie die Dämpfung der Raumfrequenzen durch die Modulation der  $CTF$  und durch die  $MTF$  (schwarze Linie), bleiben durch die Phasenumkehrung jedoch unkorrigiert. Das bedeutet vor allem, dass Raumfrequenzen mit hoher Auflösung nur schwach ausgeprägt abgebildet werden. Dieser Effekt kann jedoch durch  $MTF$ -Korrektur behoben werden. Für die Abbildung wurden dieselben  $CTF$  und  $MTF$  Parameter wie in Abb. 4.1 verwendet.

Nach inverser Fourier-Transformation der korrigierten Bildausschnitte  $\zeta$  werden aus diesen wiederum die mittleren Bildbereiche  $\xi$  ausgeschnitten. **Diese werden schließlich zu den  $CTF$  korrigierten Projektionen zusammengesetzt.**

Dabei hat die Wahl unterschiedlicher Größen für  $\zeta$  und  $\xi$  mehrere Gründe. Einerseits sollten beide so klein wie möglich gehalten werden, um eine möglichst genaue Abtastung und Korrektur des Defokusgradienten zu gewährleisten. Mit zunehmender Verkleinerung von  $\xi$  vergrößert sich jedoch die Rechenzeit, die zur Korrektur einer Kippserie benötigt wird. Mit zunehmender Verkleinerung von  $\zeta$  hingegen reduziert sich die Auflösung der theoretischen  $CTF$ , die zur Berechnung von  $\text{sign}(CTF(q, Z_i^{mn}))$  verwendet wird, und die unterschiedlichen Phasenbereiche können nur noch ungenau voneinander getrennt und korrigiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für  $\xi$  eine Größe von  $16 \times 16$  Pixel und für  $\zeta$  eine Größe von  $256 \times 256$  Pixel gesetzt. Bei den verwendeten Pixelgrößen und erzielten Defokuswerten erlaubt diese Wahl eine Trennung der Phasenbereiche bis zur zwanzigsten Nullstelle, bei gleichzeitig akzeptabler Rechenzeit ( $\sim 1$  h) für die Korrektur einer Kippserie.

## 4.2 Korrektur der Modulationstransferfunktion

Die Amplitudendämpfung des Raumfrequenzspektrums durch die  $MTF$  führt dazu, dass Strukturinformationen hoher Auflösung während der Subtomogrammalignment wenig Einfluß besitzen und in einer Mittelung stark unterdrückt werden. Diese verbleibt dadurch trotz  $CTF$ -Korrektur im niedrigen Auflösungsbereich.

Eine partielle Lösung dieses Problems wurde von Xiong et al. vorgeschlagen [135]. Dabei wird eine korrigierte Mittelung durch Dekonvolution mit der  $MTF$  erhalten<sup>5</sup>. Dieser Ansatz ist vergleichbar mit der von Rosenthal und Henderson entwickelten B-Faktor Filterung [134] und führt zu einer deutlich verbesserten Darstellung mit feineren Strukturdetails aufgrund der Amplitudenverstärkung von Raumfrequenzen mit hoher Auflösung.

Dabei sollte beachtet werden, dass die  $MTF$ -Korrektur nicht über die tatsächliche Auflösung der Mittelung hinaus ausgedehnt wird, um einer Verstärkung des Rauschanteils zu entgehen. Es kann auch darüber nachgedacht werden, einen Teil der niedrigsten Raumfrequenzen zur weiteren Verbesserung der Darstellung aus der Mittelung zu entfernen. Beide Anforderungen können durch die Integration eines Bandpassfilters  $BP(\delta_l, \delta_h)$  in die inverse  $MTF$  Filterung realisiert werden. Dabei bezeichnen  $\delta_l$  und  $\delta_h$  die unteren beziehungsweise oberen Grenzen des Passbandes, wobei  $\delta_l$  heuristisch und  $\delta_h$  durch Auflösungsmessung bestimmt werden kann. Zusammengefasst ergibt sich dadurch zur  $MTF$ -Korrektur einer Mittelung der Filter  $BP(\delta_l, \delta_h)/MTF$ , der auf das Raumfrequenzspektrum einer Mittelung als Schärfungsfilter angewendet wird<sup>6</sup>.

<sup>5</sup>Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur  $MTF$ -Korrektur ausschließlich die modellierte  $MTF$  verwendet.

<sup>6</sup>Im Vergleich zum Phasenumkehrungsfilter  $\text{sign}(CTF(q, Z_i^{mn}))$  sind die Schärfungsfilter

Dadurch kann jedoch nur die Darstellung einer Mittelung verbessert werden, aber nicht ihre Auflösung, da der Filter  $BP(\delta_l, \delta_h)/MTF$  erst nach Abschluß der Subtomogrammalignierung angewendet wird. Die  $MTF$  Dekonvolution könnte auch bereits auf Subtomogrammebene geschehen, indem man sie in den Formalismus der Subtomogrammalignierung integriert. Hierzu würden sowohl in Gln. 3.6 als auch in Gln. 3.7 die Filter  $F_\Omega$  beziehungsweise  $F_P$  durch  $BP(\delta_l, \delta_h)/MTF$  ersetzt. Die Berechnung der Ähnlichkeit zwischen Referenzen und Partikeln würde dann auch über Strukturdetails mit höheren Raumfrequenzen erfolgen und sich folglich auf die Auflösung der Mittelung auswirken.

Dieser Ansatz wurde ausführlich getestet. Jedoch führt diese Herangehensweise zu einer überproportionalen Verstärkung des Rauschanteils in den Subtomogrammen, wodurch die Konvergenz der Subtomogrammalignierung verloren geht. Diese konnte nur durch eine starke Reduktion von  $\delta_h$  wieder hergestellt werden, wodurch aber gerade der Effekt der Auflösungssteigerung verloren geht. Heuristisch wurde eine andere Methode gefunden, bei der die Konvergenz erhalten bleibt und gleichzeitig eine Auflösungssteigerung erzielt werden kann. Hierbei werden zunächst die Filter  $F_\Omega$  beziehungsweise  $F_P$  durch  $BP(\delta_l, \delta_h)/\sqrt{MTF}$  ersetzt (Abb. 4.6).

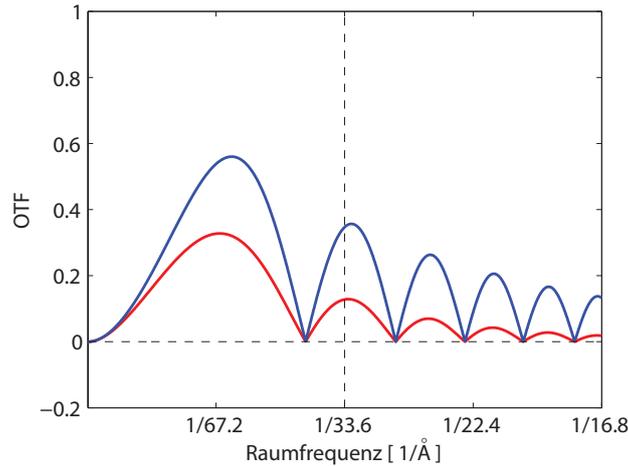


Abbildung 4.6: In der Abbildung ist eine Objekttransferfunktion  $OTF$  (rote Linie) nach  $CTF$ -Korrektur durch Phasenumkehrung dargestellt. Als blaue Linie ist dieselbe  $OTF$  nach  $MTF$ -Korrektur mit  $BP(\delta_l, \delta_h)/\sqrt{MTF}$  eingezeichnet. Hier wurde  $\delta_l = 0$  und  $\delta_h = 1/16.8 \text{ \AA}^{-1}$  gesetzt (uneingeschränktes Passband). Die Amplitudenverstärkung bei höheren Raumfrequenzen ist deutlich zu erkennen. Für die Abbildung wurden wiederum dieselben  $CTF$  und  $MTF$  Parameter wie in Abb. 4.1 verwendet.

---

$BP(\delta_l, \delta_h)/MTF$  3D Filterfunktionen.

Anschließend werden mehrere Subtomogrammalignierungsstufen hintereinander ausgeführt, wobei innerhalb jeder Stufe die Mittelung zur Konvergenz gebracht und von Stufe zu Stufe die obere Grenze des Passbandes  $\delta_h$  in Richtung höherer Raumfrequenzen verschoben wird. Damit wirkt sich die *MTF*-Korrektur in einem mehr und mehr wachsenden Raumfrequenzband aus. Durch  $\sqrt{MTF}$  hingegen wird einer nicht mehr beherrschbaren Verstärkung des Rauschanteils in den Subtomogrammen entgegengewirkt. Eine typische Herangehensweise an die Subtomogrammalignierung mit dieser Methode könnte wie folgt aussehen.

In der ersten Stufe  $k = 1$  werden die Partikel ohne *MTF*-Korrektur aligniert. In der zweiten Stufe  $k = 2$  werden die Referenzen und Partikel mit  $BP(\delta_l^2, \delta_h^2)/\sqrt{MTF}$  korrigiert. Hier bezeichnet der hochgestellte Index die Bandpassparameter der jeweiligen Subtomogrammalignierungsstufe. Dabei wird  $\delta_h^2$  an die in  $k = 1$  erreichte Auflösung angepasst und ein bestimmter Spielraum addiert. Dann wird solange iteriert bis die Mittelung konvergiert. Die ermittelten Subtomogrammalignierungsparameter werden auf die ungefilterten Partikel angewendet und eine neue Mittelung erzeugt. In der nächsten Stufe  $k = 3$  wird  $\delta_h^3$  weiter vergrößert und so fort.

Dabei ist jedoch unbedingt zu beachten, dass  $\delta_h^k$  nicht über  $2/3$  der Nyquist-Frequenz  $\nu$  wächst. Ab dieser Auflösung kann davon ausgegangen werden, dass im Raumfrequenzspektrum Rundungsfehler und Interpolationsartefakte enthalten sind [133], die dann durch die *MTF*-Korrektur verstärkt und die Alignierung fehlleiten würden.

Schließlich werden die auf diese Weise gefundenen Translationen  $\mathbf{t}_i$  und Rotationen  $r_i$  auf die ungefilterten Partikel angewendet und die Mittelung wird mittels des Schärfungsfilters  $BP(\delta_l, \delta_h)/MTF$  für eine spätere Darstellung bearbeitet. Wenn darüber hinaus zur Rekonstruktion der Partikel *CTF* korrigierte Projektionen verwendet wurden, ist die finale Mittelung im Sinne der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Näherungen vollständig korrigiert.

### 4.3 Implementierung

Die hier vorgestellten Methoden zur *CTF*- und *MTF*-Korrektur in der KET wurden als Erweiterung der TOM Toolbox konzipiert und implementiert. Die entsprechenden Programme sind unter der Bezeichnung `tom_ctf_mtf` zusammengefasst. Alle Funktionen wurden ausführlich getestet. Soweit sinnvoll und möglich wurden Modellrechnungen durchgeführt und die Ergebnisse einzelner Funktionen mit anderen Anwendungen verglichen. Alle zentralen Funktionen wurden ausführlich beschrieben, wobei die Doku-

mentation innerhalb der MATLAB Umgebung durch den Befehl `help tom_funktionsname` eingesehen werden kann. Im Sinne der TOM Philosophie können die Funktionen einfach an individuelle Problemstellungen angepasst werden. Hierfür ist in `tom_ctf_mtf` eine Reihe von Beispielen enthalten.

Es erfolgt nun eine Auflistung der zentralen Funktionen:

- `tom_ModelCTF` - Zur Herstellung beliebiger *CTF* Funktionen.
- `tom_ModelMTF` - Zur Ermittlung des Abklingfaktors  $\sigma$  und zur Herstellung beliebiger *MTF* Funktionen.
- `tom_ModelBP` - Diese Funktion erzeugt beliebige Bandpassfilter als Funktion der unteren und oberen Grenzen  $\delta_l$  und  $\delta_h$ .
- `tom_CreatePSStack` - Diese Funktion zerlegt beliebige Bereiche eines beliebigen Bildes in Subbilder bestimmter Größe und mit bestimmter Überlappung.
- `tom_CalculatePS` - Zur Mittelung eines Periodogramms aus Subbildern.
- `tom_EnhancePSgui` - Dieses Programm öffnet eine interaktive Benutzeroberfläche, die sowohl zur Filterung als auch zur Normalisierung eines Periodogramms verwendet werden kann.
- `tom_EstimatePS` - Zur Ermittlung des Defokus eines Periodogramms.
- `tom_InspectDZgui` - Dieses Programm öffnet eine interaktive Benutzeroberfläche (Abb. 4.7), die zur Berechnung, Filterung und Normalisierung eines Periodogramms sowie zur Ermittlung der Defokuswerte  $z_i^j$  der Fokusbilder  $f_i^j$  eingesetzt werden kann. Darüber hinaus können die gefundenen Defokuswerte visuell überprüft werden.
- `tom_InterpolateDZ` - Zur Berechnung der interpolierten Defokuswerte  $z_i$  als Funktion von  $z_i^j$  und  $d^j$ .
- `tom_MeanDZ` - Zur Berechnung des mittleren Defokus  $\bar{z}$ .
- `tom_ModelDZ` - Zur Berechnung der modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$ .
- `tom_CalculateDZGradient` - Dieses Programm kann zur Herstellung der Defokusgradienten  $Z_i^{mn}$  als Funktion der interpolierten Defokuswerte  $z_i$  (oder  $\bar{z}$  sowie  $\tilde{z}_i$ ) und der Orientierungsparameter  $\vartheta_i$  und  $\varphi_i$  verwendet werden.

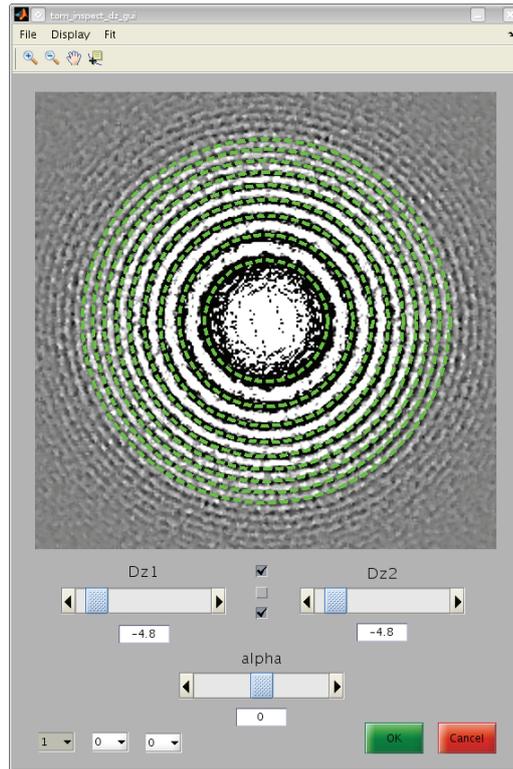


Abbildung 4.7: Interaktive, graphische Benutzeroberfläche zur Defokusmessung. Das Programm `tom_InspectDZgui` ist Bestandteil der TOM Toolbox und wurde im Rahmen dieser Arbeit implementiert. Seine Funktionalität erstreckt sich über die Berechnung, Filterung und Darstellung eines Periodogramms bis hin zur eigentlichen Defokusmessung und schließlich zur Visualisierung und Überprüfung der Meßergebnisse.

- `tom_CorrectCTF` - Mittels dieser Funktion kann die *CTF*-Korrektur einer Kippserie durchgeführt werden.
- `tom_CorrectMTF` - Mittels dieser Funktion können beliebige *MTF* Korrekturfilter auf Subtomogramme beziehungsweise Mittelungen angewendet werden.
- `tom_CalculateAVG` - Dieses Programm ergänzt die Funktionalität von `tom_corr3d` und ermöglicht die Berechnung einer Mittelung aus ungefilterten Subtomogrammen als Funktion der Translationen  $\mathbf{t}_i$  und Rotationen  $r_i$ .

Eine Feinheit gilt es noch zu beachten: Die Kippachse  $\varphi_i$  ist invariant gegenüber einer Bildrotation um  $180^\circ$ , dies gilt jedoch nicht für den Defokusgradienten. Diese Frage reduziert sich letztendlich auf die richtige Wahl des Vorzeichens des Kippwinkels  $\vartheta_i$  bei der Berechnung der Defokusgradienten  $Z_i^{mn}$ . Es muss also noch überprüft

werden, ob die in dieser Implementierung verwendete Winkelkonvention zur Beschreibung der Defokusgradienten mit der tatsächlich von dem Abbildungssystem realisierten Orientierung übereinstimmt (Händigkeit [134]).

Hierzu empfiehlt es sich, eine Eichkippsreihe (Goldmarker auf Kohlefilm) aufzunehmen. Diese sollte dieselben Abbildungsparameter wie die zu korrigierenden Kippserien besitzen. Mittels des Programms `tom_FitDZGradient` kann dann direkt aus den Projektionen der Eichkippsreihe die jeweiligen Defokusgradienten extrahiert werden. Dabei wird eine Projektion in ein Raster von Subbildern zerlegt, wobei die Periodogramm-mittelung und Defokusmessung innerhalb der Subbilder durchgeführt wird [18, 77]. An die gefundenen Defokuswerte wird schließlich eine Ebene angepasst, die den experimentell realisierten Defokusgradienten widerspiegelt.

Durch Vergleich mit den berechneten Defokusgradienten kann dann die Winkelkonvention überprüft werden. Zur Umstellung der Winkelkonvention müsste man die Kippwinkel  $\vartheta_i$  vor Berechnung der  $Z_i^{mn}$  lediglich mit  $-1$  multiplizieren.



## 5 MspA

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen beziehungsweise entwickelten Methoden in einem konkreten Projekt dargestellt. Vor allem wurde dabei auf die Validierung der Methoden zur Korrektur der Transferfunktionen Wert gelegt und die Ergebnisse mit einer externen Referenz verglichen. Zu diesem Zweck wurde hier die Struktur des Porins MspA des Bakteriums *Mycobacterium smegmatis* verwendet, die Faller et al. [54] durch Kristallstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2.5 Å gelöst hatten. Die Kristallstruktur wurde in eine elektronenmikroskopische Dichte übersetzt und wird im Folgenden als Referenz *A* bezeichnet.

Den Ausgangspunkt des hier dargestellten Experiments bildeten Liposomen, in deren Lipiddoppelschicht MspA eingebaut wurde. Die Reinigung [141, 142] und Rekonstitution [55, 56, 57] des Porins, sowie die Herstellung der vitrifizierten Proben erfolgte durch C. Hoffmann [143]. Der Durchmesser der Liposomen konnte durch wiederholte Extrusion durch eine Filtermembran mit bestimmter Porengröße auf 100 nm eingestellt werden. Als Markierungspunkte für die Alignierung der Projektionen wurden der Liposomenpräparation Goldnanopartikel (Durchmesser  $\sim 10$  nm) hinzugefügt.

Der untersuchte Proteinkomplex besitzt eine molekulare Masse von 160 kDa und ist aus acht identischen Untereinheiten, achtfach zylindersymmetrisch, aufgebaut. Das Oktamer hat die Form eines Kelchs mit einer Höhe von 96 Å, der sich in seiner Breite von 88 auf 49 Å verjüngt und dabei in seinem Inneren einen Kanal durch die äußere Membran von *Mycobacterium smegmatis* bildet [6], der an seiner engsten Stelle einen Durchmesser von 10 Å besitzt.

Strukturell können drei Bereiche deutlich unterschieden werden, die im Folgenden als Kranz, Schaft und Basis bezeichnet sind (Abb. 5.1). Die äußere Oberfläche der Kranzregion ist hauptsächlich aus hydrophilen Aminosäuren aufgebaut, während Schaft und Basis eine hauptsächlich hydrophobe äußere Oberfläche besitzen, mit der das Porin in der Membran sitzt. Die Höhe des hydrophoben Bereichs beträgt 37 Å. Die innere Oberfläche des Kelchs hingegen ist weitestgehend polar aufgebaut. Der Schaft besteht aus einem *Beta barrel*, welches aus 16 Strängen (Scherungszahl 32) zusammengesetzt ist [54].

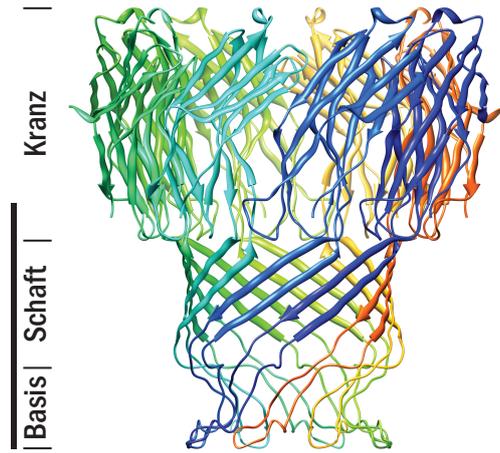


Abbildung 5.1: Struktur des Porins MspA des Bakteriums *Mycobacterium smegmatis*. Das kelchförmige Protein kann in drei Bereiche untergliedert werden, die als Basis, Schaft und Kranz bezeichnet werden. Anmerkung: Das Protein wirkt kleiner, da die Aminosäureseitenketten ausgeblendet wurden. Maßstab, 50 Å.

### Kryoelektronentomographie

Insgesamt wurden vier Kippserien von MspA Liposomen mit dem erweiterten Aufnahmeschema im Mikroskop Tecnai Polara TEM (FEI) aufgezeichnet. Das TEM ist mit einer Feldemissionsquelle und einem GIF2002 Energiefilter (Gatan) ausgestattet, in den als Detektor eine  $2\text{ k} \times 2\text{ k}$  Multiscan CCD-Kamera integriert ist. Die Breite der Blende  $\Xi$  des Energiefilters wurde auf 20 eV eingestellt. Der Ablingfaktor  $\sigma$  der CCD-Kamera wurde mit  $(1/4)\nu$  bestimmt (Abschn. 2.3), wobei  $\nu$  die Nyquist-Frequenz bezeichnet.

Die Kippserien wurden automatisch mit **Xplore3D** (FEI) aufgenommen, wobei der Autofokus  $z_0$  auf  $-5\ \mu\text{m}$  gesetzt wurde. Das erweiterte Aufnahmeschema wurde hingegen manuell mittels dem **Tecnai user interface** (FEI) umgesetzt, indem **Xplore3D** bei jedem Kippwinkel nach erfolgter Aufnahme einer Objektprojektion  $p_i$  gestoppt wurde. Der zusätzliche Zeitaufwand kann mit etwa 1 h beziffert werden. Die Abstände  $d^j$  zwischen den Fokusstellen und der Aufnahme Stelle des Objekts lagen zwischen  $4 - 6\ \mu\text{m}$ , abhängig von der Position eines geeigneten Kohlefilmbereichs entlang der Kippachse.

Vor Aufnahme der Kippserien wurde auf den Fokusstellen durch Vorbelichtung der Eisfilm entfernt und der Kohlefilm freigelegt. Die Dosisdifferenz zwischen  $p_i$  und den Fokusbildern  $f_i^j$  wurde durch eine Verzehnfachung der Belichtungszeiten ( $\gtrsim 1\text{ s}$ ) auf den Fokusstellen erreicht.

Im Vergleich zu anderen KET Experimenten wurde eine hohe Vergrößerung von  $61000 \times$  gewählt. Auf diese Weise können auch höhere Raumfrequenzen abgetastet werden, ohne dass diese zu stark durch die *MTF* gedämpft werden. Dabei entspricht die Pixelgröße der Projektionen  $2.1 \text{ \AA}$  (Nyquist-Frequenz  $1/4.2 \text{ \AA}^{-1}$ ) und die Größe der Projektionen selbst etwa  $430 \times 430 \text{ nm}$ .

Der Kippwinkelbereich der Kippserien erstreckt sich von  $-60$  bis  $+60^\circ$  mit einem Winkelinkrement von  $3^\circ$ . Von den 164 möglichen Projektionen fehlen insgesamt 8, ausschließlich bei Kippwinkeln mit Betrag  $\geq 54^\circ$ . Bei diesen war die mechanische Ungenauigkeit der Kippbühne in Einzelfällen zu groß, um die Aufnahme fortsetzen zu können. Die Objektprojektionen  $p_i$  wurden unter Niedrigdosisbedingung aufgenommen, wobei die Gesamtelektronendosis der Kippserien zwischen  $27 - 64 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$  liegt.

Zur Alignierung der Projektionen wurden die Koordinaten von jeweils  $\sim 8$ , auf den Fokusbildern von jeweils  $\sim 4$  Goldpartikeln gemessen. Die Alignierung selbst wurde durch Minimierung des Lawrence-Modells durchgeführt. Das Residuum der Optimierung lag zwischen  $3.0 - 4.7 \text{ \AA}$  bei den Objektprojektionen und bei  $\sim 3.0 \text{ \AA}$  in den Fokusbildern.

Aus den vier Kippserien wurden sowohl vier Übersichtstomogramme (zweifach gebinnt, Pixelgröße  $8.4 \text{ \AA}$ ) der Objektstellen, als auch acht Übersichtstomogramme der Fokusstellen mit gewichteter Rückprojektion rekonstruiert. Aus den Tomogrammen ließ sich die lokale Objektstärke abschätzen. Diese beträgt im Mittel  $125 \text{ nm}$  für Bereiche mit MspA Liposomen, sowie  $14 \text{ nm}$  für die Fokusstellen. Der erste Wert befindet sich in guter Übereinstimmung mit dem erwünschten Durchmesser bei der Liposomenherstellung. Der zweite Wert zeigt, dass der Kohlefilm auf den Fokusstellen weitestgehend vom Eisfilm befreit wurde.

Die MspA Proteinkomplexe sind in der Membran der Liposomen ohne Zweifel zu identifizieren (Abb. 5.2). Dabei kann zwischen Seitenansichten von MspA in den äquatorialen Regionen und Draufsichten in den Polbereichen der Liposomen unterschieden werden. Aufgrund des *Missing wedge* ist die Lipidmembran in den Polregionen nur schemenhaft manifestiert, während MspA in der Draufsicht deutlich elongiert erscheint, aber klar erkennbar ist. In der Seitenansicht hingegen kann die Rekonstitution von MspA deutlich nachvollzogen werden. Tatsächlich scheint die Kranzregion aus den Liposomen herauszustehen, während erwartungsgemäß die hydrophoben Bereiche des Porins, Schaft und Basis, in die Lipidmembran inseriert wurden.

Darüber hinaus können in der Seitenansicht zwei unterschiedliche Orientierungen von MspA relativ zur Lipidmembran entdeckt werden, wobei die Kelchöffnung entweder ins Innere der Liposomen oder nach außen weist. An dieser Stelle ist nicht zu unterscheiden,

ob *MspA* entweder in beiden Orientierungen rekonstituiert wurde oder ob sie durch Umformungen und Verschmelzungen der Liposomen während der Extrusion zustande kommen. Für *Mycobacterium smegmatis* konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kelchöffnung nach außen zeigt [54].

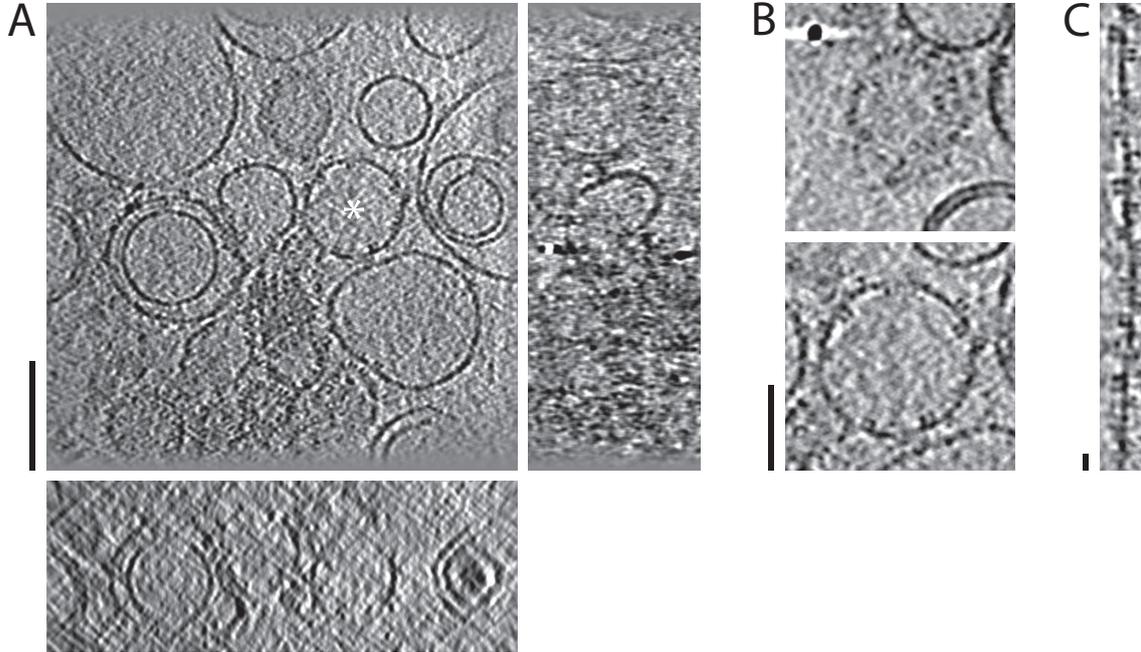


Abbildung 5.2: **A** Übersichtstomogramm ( $xy$ -Schnitt; unten,  $xz$ -Schnitt; rechts,  $yz$ -Schnitt, Schnittdicke 8.4 Å) einer Objektstelle. Die *MspA* Proteinkomplexe können in der Lipidmembran der Liposomen klar erkannt werden. Zur weiteren Verdeutlichung (Entrauschung) wurde das Tomogramm auf eine Auflösung von  $\sim 140$  nm gefiltert (Tiefpass). Maßstab, 100 nm. **B** Detailansichten des mit Stern in **A** markierten Liposoms ( $xy$ -Schnitte). Das obere Bild zeigt die Polregion des Liposoms mit typischen *MspA* Draufsichten, das untere Bild die Äquatorregion mit typischen *MspA* Seitenansichten. Das Bild der Polregion ist eine Mittelung über zwanzig Schnitte. Maßstab, 50 nm. **C** Das selbe Liposom wie in **B**, transformiert in Kugelkoordinaten. Die *MspA* Porine sind in zwei Orientierungen in die Lipidmembran eingebaut. Maßstab, 10 nm.

Für die spätere Subtomogrammalignment wurden aus den vier Übersichtstomogrammen die ungefähren Schwerpunktskoordinaten von insgesamt 804, klar definierten *MspA* Partikeln interaktiv (`tom_particles`) lokalisiert und zur weiteren Verwendung abgespeichert. Dabei wurden lediglich Seitenansichten, bei denen die Kelchöffnung nach außen zeigt, ausgewählt. Dadurch wird ein Verschmieren der Membran in der Mittelung aufgrund der beiden *MspA* Orientierungen ausgeschlossen. Die abweichenden Krümmungen der Membran als Konsequenz der unterschiedlichen Vesikeldurchmesser

und -formen wurde jedoch nicht beachtet. Bei den Draufsichten konnte visuell nicht zwischen den zwei MspA Orientierungen unterschieden werden. Um eine gleichmäßige Winkelabtastung bei der Subtomogrammalignment zu erreichen, wurde versucht, ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Seitenansichten und Draufsichten in die Partikelliste zu integrieren. Von den 804 Subtomogrammen stammen 47% aus Polarregionen.

### Korrektur der Kontrasttransferfunktion

Mittels Periodogrammmittelung wurde aus jedem der Fokusbilder  $f_i^j$  ein dazugehöriges Periodogramm (Größe  $512 \times 512$  Pixel, Überlappung  $1/2$ ) berechnet. Dann wurde mithilfe des Programms `tom_InspectDZgui` der optimale Hochpassfilter zur Hintergrundentfernung anhand einer geringen Anzahl, zufällig ausgewählter Periodogramme interaktiv ermittelt. Basierend auf den Filtereinstellungen und dem Autofokus  $z_0$  als Startwert für die Defokussuche wurde der Defokus jedes Periodogramms mit der Funktion `tom_EstimatePS` automatisch ermittelt.

In Anschluß daran wurden die Periodogramme und gefundenen Defokuswerte  $z_i^j$ , durch Vergleich der Position der Thon-Ringe mit den Nullstellen der jeweils ermittelten  $CTF$ , überprüft. Bei einer geringen Anzahl ( $\sim 5\%$ ) waren die Thon-Ringe nicht erkennbar. Die dazugehörigen Defokuswerte wurden verworfen und durch Anpassung des Defokusmodells (`tom_ModelDZ`) an die restlichen Defokuswerte  $z_i^j$  ersetzt.

In den Periodogrammen waren Thon-Ringe bis zur vierten Ordnung deutlich zu erkennen (Abb. 5.3), wobei die vierte Nullstelle der ermittelten  $CTF$  den vierten Thon-Ring in den meisten Fällen mittig traf. Aufgrund der mittleren Breite dieses Thon-Rings kann die obere Grenze der Messungenauigkeit der Defokuswerte  $z_i^j$  mit  $\pm 200$  nm geschätzt werden. Thon-Ringe höherer Ordnung waren mitunter schwach, in den meisten Fällen jedoch nicht sichtbar.

Aufgrund der langen Belichtungszeit, die für die Fokusbilder verwendet wurde, übertrugen sich Vibrationen über die Kippachse des TEM auf das Objekt mit deutlichem Effekt. In den Periodogrammen äußerten sie sich durch Verschmierung gegenüberliegender Kreissektoren der Thon-Ringe, wobei hier die betroffenen Kreissektoren der Ordnung  $\geq 2$  in der Richtung senkrecht zur Kippachse liegen.

Es ist nicht davon auszugehen, dass dieser Effekt in den Objektprojektionen  $p_i$ , aufgrund ihrer kurzen Belichtungszeit von  $\sim 0.1$  s, eine Rolle spielt. Eine Vergrößerung der Messungenauigkeit der Defokuswerte  $z_i^j$  ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die verwendete Defokusmessmethode nicht voraussetzt, dass die Thon-Ringe vollständig durchgezogen sind. Jedoch eine Erweiterung der Methode auch zur Messung des Astigmatismus würde

vollständige Thon-Ringe voraussetzen. Desweiteren wäre denkbar, dass die Vibrationen ebenfalls einen Anteil in Richtung der Kippachse besitzen, wodurch Thon-Ringe höherer Ordnung vollständig verschwinden würden. In zukünftigen Anwendungen des erweiterten Aufnahmeschemas könnte der Vibrationseffekt dadurch minimiert werden, indem die hohe Elektronendosis für Fokusbilder durch eine Reduktion des Strahldurchmessers, anstatt durch eine Verlängerung der Belichtungszeit generiert würde.

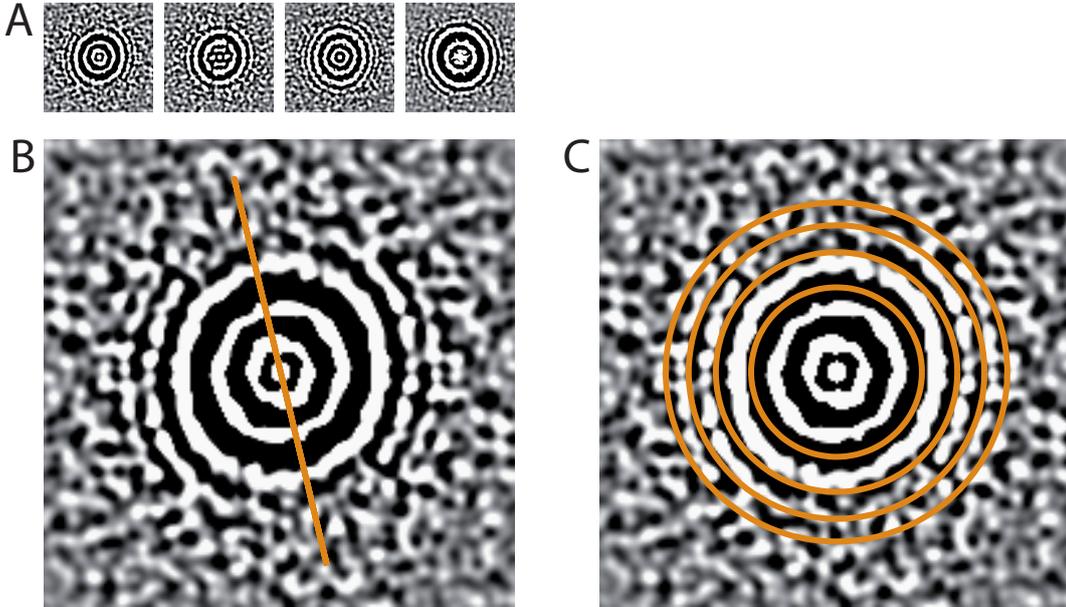


Abbildung 5.3: **A** Typische Peridogramme im MspA-Projekt, die aus den Fokusbildern  $f_i^j$  berechnet wurden. Die Bilder zeigen den zentralen Ausschnitt mit einer Größe von  $180 \times 180$  Pixel. **B** Verschmierung von Thon-Ring-Kreis-sektoren der Ordnung  $\geq 2$  in der Richtung orthogonal zur Kippachse (orange Linie). **C** Typische Defokussmessung im MspA-Projekt. Die orangen Kreise zeigen die Nullstellen der ermittelten  $CTF$ . In den meisten Fällen traf die vierte Nullstelle den vierten Thon-Ring mittig. Aus der Breite dieser Thon-Ringe kann die Messungenauigkeit der Defokuswerte  $z_i^j$  mit etwa  $\pm 200$  nm abgeschätzt werden.

Im nächsten Schritt wurden aus den Defokuswerten  $z_i^j$  der Fokusbilder  $f_i^j$  die interpolierten Defokuswerte  $z_i$  der Projektionen  $p_i$  mittels der Funktion `tom_InterpolateDZ` (Gln. 4.3) berechnet. Die interpolierten Defokuswerte lieferten dann die mittleren Defokuswerte  $\bar{z}$  (`tom_MeanDZ`) (Gln. 4.4) sowie die modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$  (`tom_ModelDZ`) (Gln. 4.5). In Abb. 5.4 sind die verschiedenen Messwerte für die vier Kippserien dargestellt.

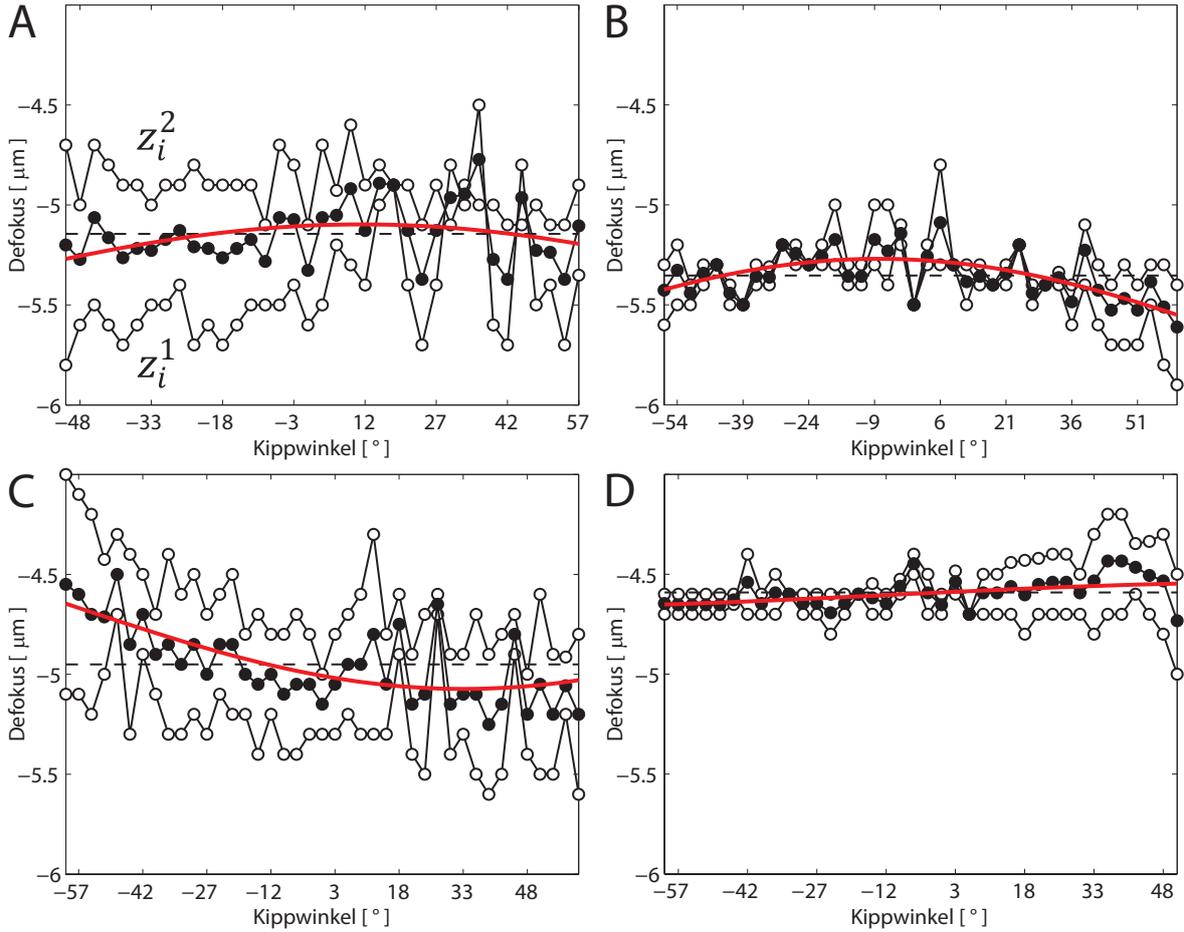


Abbildung 5.4: Defokusmesswerte im MspA-Projekt für vier Kippserien (A-D). Die leeren Kreise zeigen die Defokusmesswerte  $z_i^1$  und  $z_i^2$  der Fokusbilder  $f_i^1$  und  $f_i^2$ . Die gefüllten Kreise stellen die interpolierten Defokuswerte  $z_i$  dar. Aus den roten Linien können die modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$  abgelesen werden. Die mittleren Defokuswerte  $\bar{z}$  sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Die mittleren Defokuswerte  $\bar{z}$  liegen in einem Intervall zwischen  $-5.35$  und  $-4.59 \mu\text{m}$ , während die Standardfehler der Mittelwerte zwischen 10 und 30 nm betragen. Der Mittelwert von  $\bar{z}$  über die vier Kippserien beträgt  $-5.01 \pm 0.16 \mu\text{m}$ , was den verwendeten Autofokus  $z_0$  von  $-5 \mu\text{m}$  widerspiegelt. Zur Einschätzung der Unterschiede zwischen den Defokuswerten und den unterschiedlichen Glättungsstrategien wurden die mittleren, absoluten Abweichungen gegenüber  $\bar{z}$  berechnet. Diese betragen über die vier Kippserien 239 nm für  $z_0$ , 108 nm für  $z_i$  und 62 nm für  $\tilde{z}_i$ .

Schließlich wurde die *CTF*-Korrektur der Projektionen  $p_i$ , unter Berücksichtigung des horizontalen Defokusgradienten (`tom_CalculateDZGradient`), mittels der Funktion `tom_CorrectCTF` durchgeführt. Die Orientierung der Defokusgradienten wurde durch

eine Eichkippsreihe überprüft (`tom_FitDZGradient`), wobei sich herausgestellt hat, dass die hier verwendete Winkelkonvention mit der tatsächlichen Orientierung übereinstimmt.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Defokuswerte, die für die *CTF*-Korrektur der Kippserien verwendet wurden, durch das Symbol  $\dagger = \{z_n, z_0, z_i, \tilde{z}_i, \bar{z}\}$  symbolisiert. Hierbei bezeichnet  $z_n$  schlicht den Fall ohne *CTF*-Korrektur. Folglich existierten bei diesem Verarbeitungsschritt für jede Kippserie  $p_i^\dagger$  Projektionen, aus denen dann 5 Subtomogrammsätze mit jeweils 804 Partikeln, basierend auf der oben beschriebenen Partikelliste, mittels gewichteter Rückprojektion rekonstruiert wurden (`tom_recparticles`). Die Größe der Subtomogramme beträgt  $128 \times 128 \times 128$  Pixel mit einer Voxelgröße von  $2.1 \text{ \AA}$ .

### Subtomogrammalignierung und *MTF*-Korrektur

Als Startreferenzen wurden innerhalb der 5 Subtomogrammsätze die ersten 50 Draufsichten addiert. Das bedeutet, die Startreferenzen unterscheiden sich nur im Hinblick auf die unterschiedlichen Defokuswerte  $\dagger$ , die zur *CTF*-Korrektur der Partikel verwendet wurden. Die Elongation  $r$  der Draufsichten wurde im Realraum partiell durch Stauchung der Strukturen in Richtung der  $z$ -Achse behoben. Dabei kann der Kompressionsfaktor  $1/r$  als Funktion des maximalen Kippwinkels  $\vartheta_{N_p}$  der zugrundeliegenden Kippserie durch folgende Gleichung ermittelt werden [21]:

$$r = \sqrt{\frac{\vartheta_{N_p} + \sin \vartheta_{N_p} \cos \vartheta_{N_p}}{\vartheta_{N_p} - \sin \vartheta_{N_p} \cos \vartheta_{N_p}}}. \quad (5.1)$$

Es sei angemerkt, dass die addierten Draufsichten alle aus dem ersten Tomogramm stammen. Mit  $\vartheta_{N_p} = 60^\circ$  ergibt sich hier für den Kompressionsfaktor etwa 0.6. Schließlich wurden die Startreferenzen vollständig entlang der  $z$ -Achse symmetrisiert (`tom_symref`).

Seien nun die Subtomogrammalignierungsstufen mit tiefgestelltem Index  $k$  und die dazugehörigen Mittelungen mit  $\Omega_k^\dagger$  bezeichnet. Insgesamt wurden  $k = 7$  dieser Stufen hintereinander ausgeführt, wobei  $k \leq 5$  mit einfach gebinnnten Subtomogrammen der Größe  $64 \times 64 \times 64$  Pixel (Voxelgröße  $4.2 \text{ \AA}$ ) und die restlichen Stufen mit den ungebinnten Subtomogrammen durchgeführt wurden.

Innerhalb der jeweiligen Stufen wurde solange iteriert, bis die Mittelungen das Abbruchkriterium  $\varepsilon = 0.998$  erreichten. Die verwendete Winkelliste besteht aus 3040 Eulerwinkeln mit einem Winkelinkrement von etwa  $18^\circ$ . Zum Abschluß der jeweiligen Stufen wurde das Winkelinkrement auf  $0.1^\circ$  verfeinert.

Die Subtomogrammalignierungsstufen  $k = 1, 2$  und  $k = 6, 7$  wurden nur auf die Subtomogramme angewendet, die mit den mittleren Defokuswerten  $\bar{z}$  korrigiert worden waren. Das Ziel der ersten Sequenz bestand darin, die Symmetrie des untersuchten Proteinkomplexes zu ermitteln und das Ziel der letzten Sequenz in der Verfeinerung und weiteren Auflösungserhöhung der Mittelung  $\Omega_5^{\bar{z}}$ .

In  $k = 1$  wurden die Filter  $F_\Omega$  und  $F_P$ , sowie die Masken  $M_\Omega$  und  $M_P$  identisch Eins gesetzt. In  $k = 2$  wurden Referenz  $\Omega_1^{\bar{z}}$  und Partikel unter  $MTF$ -Korrektur aligniert. Hierfür wurden die Filter  $F_\Omega$  und  $F_P$  mit  $BP(1/89.6, 1/14.9)/\sqrt{MTF}$  ersetzt<sup>1</sup>. Nach Konvergenz wurde die Mittelung  $\Omega_2^{\bar{z}}$  aus den ungefilterten Partikeln berechnet und mittels des Schärfungsfilters  $BP(0, 1/14.9)/MTF$  abschließend  $MTF$  korrigiert (`tom_CorrectMTF`). Dann wurde die Mittelung hinsichtlich ihrer Symmetrie entlang der  $z$ -Achse untersucht (`tom_check_symmetry`). Die erwartete achtfache Symmetrie ließ sich klar nachweisen (Abb. 5.5).

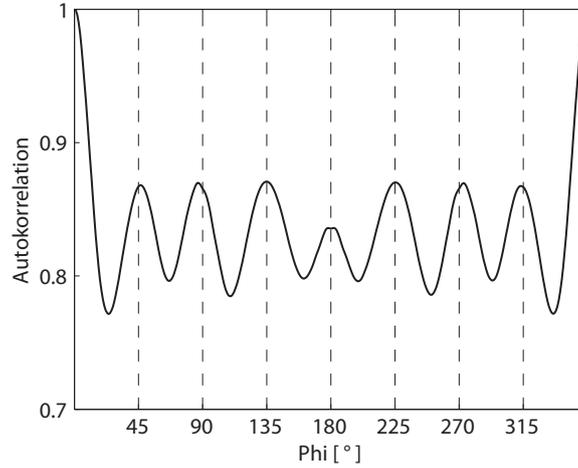


Abbildung 5.5: Ergebnis der Symmetrieanalyse der Mittelung  $\Omega_2^{\bar{z}}$ . Die achtfache Symmetrie des MspA Porins ist klar ersichtlich.

Von diesem Zeitpunkt an wurde die Symmetrie des untersuchten Proteins als bekannt vorausgesetzt und während der Subtomogrammalignierung verwendet. Die achtfache Symmetrisierung nach jeder Iteration stabilisierte die Subtomogrammalignierung deutlich. Vor allem aber wird die  $SNR$  der Mittelungen nahezu verdreifacht.

Die Subtomogrammalignierungsstufen  $k = 3, 4, 5$  hatten die Validierung der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Methoden zur Korrektur der Transferfunktionen zum Ziel. Weiterhin sollten die unterschiedlichen Strategien †, zur Korrektur der  $CTF$  im Hinblick auf Struktur und Auflösung der Mittelungen verglichen werden.

<sup>1</sup>Zur Vereinfachung der Notation werden die unteren und oberen Grenzen der Bandpassfilter  $BP$  ohne Einheit angegeben. Die Einheit der Bandpassparameter ist  $1/\text{Å}$ .

Für jeden der 5 Subtomogrammsätze wurden neue Startreferenzen erstellt (wie oben beschrieben), die nun achtfach symmetrisiert waren. In Stufe  $k = 3$  wurden die Mittelungen  $\Omega_3^\dagger$  analog zu Stufe  $k = 1$  und in Stufe  $k = 4$  wurden die Mittelungen  $\Omega_4^\dagger$  analog zu Stufe  $k = 2$  berechnet. Der Unterschied lag wiederum lediglich in der Symmetrisierung.

In  $k = 5$  wurde das Passband der *MTF*-Korrektur in Richtung höherer Raumfrequenzen vergrößert. Hierfür wurden die Filter  $F_\Omega$  und  $F_P$  mit  $BP(1/89.6, 1/12.8)/\sqrt{MTF}$  ersetzt, wobei die obere Bandpassgrenze gerade  $(2/3)\nu$  bei den einfach gebinneten Subtomogrammen entspricht. Die Referenzen wurden zusätzlich in jeder Iteration mittels einer kugelförmigen Realraummaske  $M_\Omega$  maskiert. Auf die Maskierung  $M_P$  der Partikel wurde in dieser Stufe jedoch verzichtet. Dabei wurde der Durchmesser der Maske  $M_\Omega$  so gewählt (14 nm mit einer weichen Kante von etwa 5 nm), dass der Einfluss der unterschiedlichen Membrankrümmungen auf die Subtomogrammalignierung weitestgehend entfiel.

Nach Konvergenz wurden die Mittelungen  $\Omega_5^\dagger$  aus den ungefilterten Partikeln berechnet und mittels des Schärfungsfilters  $BP(0, 1/12.8)/MTF$  abschließend *MTF* korrigiert. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Mittelungen  $\Omega_5^\dagger$  im Hinblick auf die Subtomogrammalignierung vollkommen identisch generiert wurden. Unterschiede in Struktur und Auflösung haben folglich ihre Ursache in den unterschiedlichen Defokuswerten  $\ddagger$ , die zur Korrektur der Projektionen  $p_i^\ddagger$  verwendet wurden.

In Stufe  $k = 6$  wurden die ungebinnten Subtomogramme, die mit den mittleren Defokuswerten  $\bar{z}$  korrigiert worden waren, zuerst mit den in  $k = 5$  gefundenen Alignierungsparametern ausgerichtet. Die Masken  $M_\Omega$  und  $M_P$  wurden hier basierend auf der molekularen Masse des untersuchten Proteinkomplex von 160 kDa konstruiert. Konkret ist dabei die Oberfläche des Proteins derart bestimmt worden, dass diese genau die erwartete Masse mit einer Dichte von  $0.8 \text{ Da}/\text{\AA}^3$  enthielt [144]. Schließlich wurden alle Voxel, die außerhalb der Proteinoberfläche lagen, sowohl in den Referenzen als auch in den voralignierten Partikeln zufällig permutiert. Auf diese Weise ließ sich der Einfluss der unterschiedlichen Membrankrümmungen auf die Subtomogrammalignierung komplett eliminieren. Die maskierten Partikel wurden dann innerhalb eines kleinen Winkel- und Translationsbereichs um die in  $k = 5$  gefundenen Alignierungsparameter feinaligniert. Als *MTF* Korrekturfilter diente hierbei  $BP(1/89.6, 1/7.9)/\sqrt{MTF}$ .

In Stufe  $k = 7$  wurde dieselbe Maskierungsoperation wie oben eingesetzt, jedoch wurde der  $MTF$  Korrekturfilter auf  $BP(1/89.6, 1/6.7)/\sqrt{MTF}$  weiter ausgedehnt<sup>2</sup>. Nach Konvergenz wurde die Mittelung  $\Omega_7^{\bar{z}}$  aus den ungefilterten und unmaskierten Partikeln berechnet und mittels des Schärfungsfilters  $BP(0, 1/6.7)/MTF$  abschließend  $MTF$  korrigiert. Diese Mittelung stellt das Endergebnis im MspA-Projekt dar. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Masse die einzige a priori bekannte Information über MspA war, die in der hier beschriebenen Strukturbestimmung eingesetzt wurde.

## Auflösungsmessung und Visualisierung

Die Qualität der Subtomogrammalignment wurde mittels *Fourier shell correlation* und die Genauigkeit der Korrektur der Transferfunktionen mittels *Cross resolution*, relativ zur externen Referenz  $A$  validiert. Die Mittelungen selbst wurden als Isoflächen in *Chimera* [145] dargestellt, wobei sie jeweils die molekulare Masse von MspA, bei einer Proteinmassendichte von  $0.8 \text{ Da}/\text{Å}^3$ , umschließen.

Im ersten Schritt wurden die  $FSC$ - und  $C_{ref}$ -Kurven der Mittelungen  $\Omega_5^\dagger$  berechnet. Diese erlauben den Vergleich der Defokuswerte  $\dagger$  bei festgehaltener Subtomogrammalignment und  $MTF$ -Korrektur. Im zweiten Schritt wurden die  $C_{ref}$ -Kurven der Mittelungen  $\Omega_k^{\bar{z}}$  für  $k = \{3, 4, 5\}$  ausgewertet. Bei festgehaltener  $CTF$ -Korrektur ermöglichen diese, die Wirkung der  $MTF$ -Korrektur zu überprüfen.

Die Ergebnisse der Auflösungsmessung sind in Abb. 5.6 dargestellt. Wie erwartet, reagieren die  $FSC$ -Kurven nur schwach auf Unterschiede bei der  $CTF$ -Korrektur. Vielmehr besitzt die unkorrigierte Mittelung  $\Omega_5^{\bar{z}^n}$  in etwa dieselbe Alignmentqualität wie die restlichen Mittelungen. Diese liegt bei  $\sim 14.1 \text{ Å}$ , wenn die  $3\sigma$ -Kurve zugrundegelegt wird. Die  $C_{ref}$ -Kurven reagieren hingegen deutlich auf unterschiedliche  $CTF$ -Korrekturen. Die Auflösungen im Vergleich zur externen Referenz (bei einem Phasenfehler von  $60^\circ$ ) liegen hier bei folgenden Werten:  $\Omega_5^{\bar{z}^n} \sim 26.2 \text{ Å}$ ,  $\Omega_5^{\bar{z}^0} \sim 21.7 \text{ Å}$ ,  $\Omega_5^{\bar{z}^i} \sim 21.2 \text{ Å}$ ,  $\Omega_5^{\bar{z}^e} \sim 19.1 \text{ Å}$ ,  $\Omega_5^{\bar{z}} \sim 16.8 \text{ Å}$ . Darüber hinaus zeigen die  $C_{ref}$ -Kurven eine deutliche Zunahme der Auflösung durch die  $MTF$ -Korrektur:  $\Omega_3^{\bar{z}} \sim 24.9 \text{ Å}$ ,  $\Omega_4^{\bar{z}} \sim 17.9 \text{ Å}$ ,  $\Omega_5^{\bar{z}} \sim 16.8 \text{ Å}$ .

In Abb. 5.7 sind die externe Referenz  $A$  und die Mittelungen  $\Omega_5^\dagger$  als Isoflächen dargestellt. Es ist überraschend zu sehen, dass minimale Unterschiede in den Defokuswerten  $\dagger$  deutliche Unterschiede in der Struktur der Mittelungen nach sich ziehen. Es sei daran erinnert, dass beispielsweise  $\tilde{z}_i$  und  $\bar{z}$  im Mittel lediglich um  $62 \text{ nm}$  voneinander abweichen. Ebenfalls klar ersichtlich ist, dass nur die Mittelung  $\Omega_5^{\bar{z}}$  die charakteristische Oberflächenstruktur von MspA in der Kranzregion wiedergibt.

<sup>2</sup>Die obere Passbandgrenze von  $(2/3)\nu$  liegt bei den ungebinnten Partikeln bei  $\sim 1/6.3 \text{ Å}^{-1}$ .

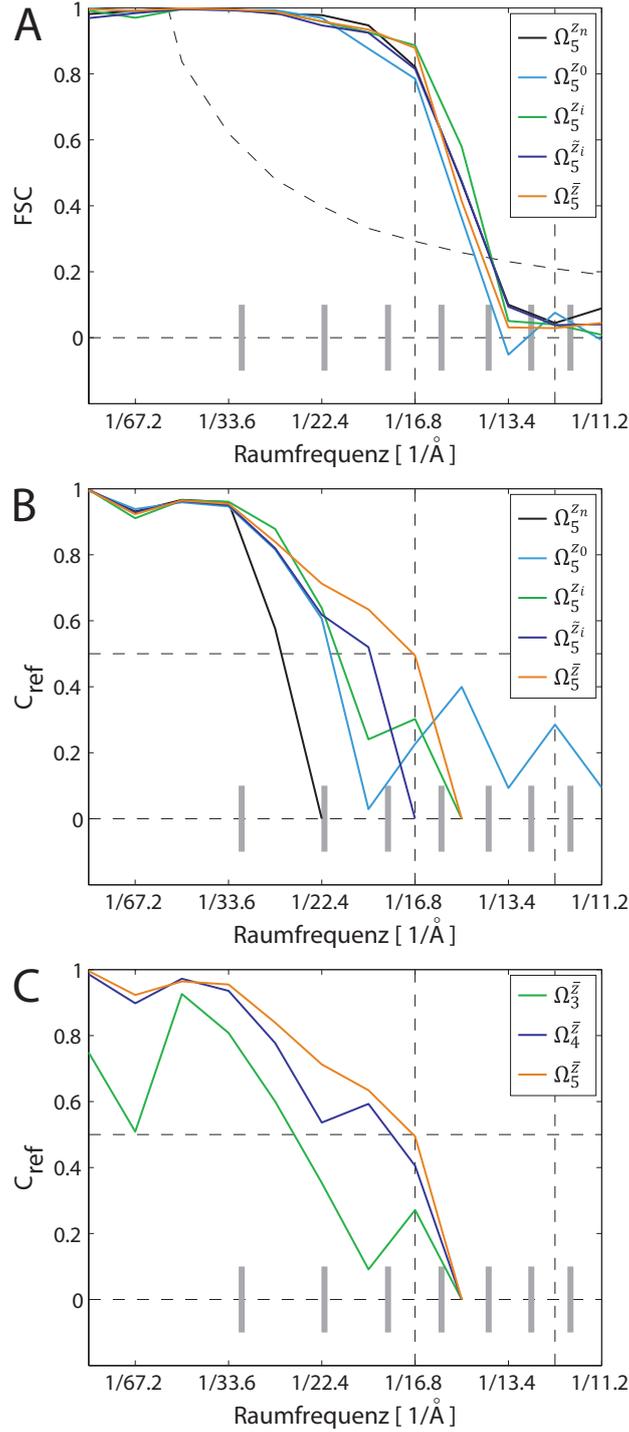


Abbildung 5.6: **A**  $FSC$ -Kurven und **B**  $C_{ref}$ -Kurven der Mittelungen  $\Omega_5^\dagger$ . **C**  $C_{ref}$ -Kurven der Mittelungen  $\Omega_3^{\bar{z}}$ ,  $\Omega_4^{\bar{z}}$ ,  $\Omega_5^{\bar{z}}$ . Die grauen Linien markieren die Nullstellen der  $CTF$  mit Autofokus  $z_0 = -5 \mu\text{m}$ . Die Schwellwertkurven (**A**:  $3\sigma$ -Kurve, **B** und **C**:  $C_{ref} = 0.5$ ) sind gestrichelt eingezeichnet. Bei den Mittelungen liegt  $(1/2)\nu$  bei  $1/16.8 \text{ \AA}^{-1}$  und  $(2/3)\nu$  bei  $1/12.8 \text{ \AA}^{-1}$  (vertikale, gestrichelte Linien).

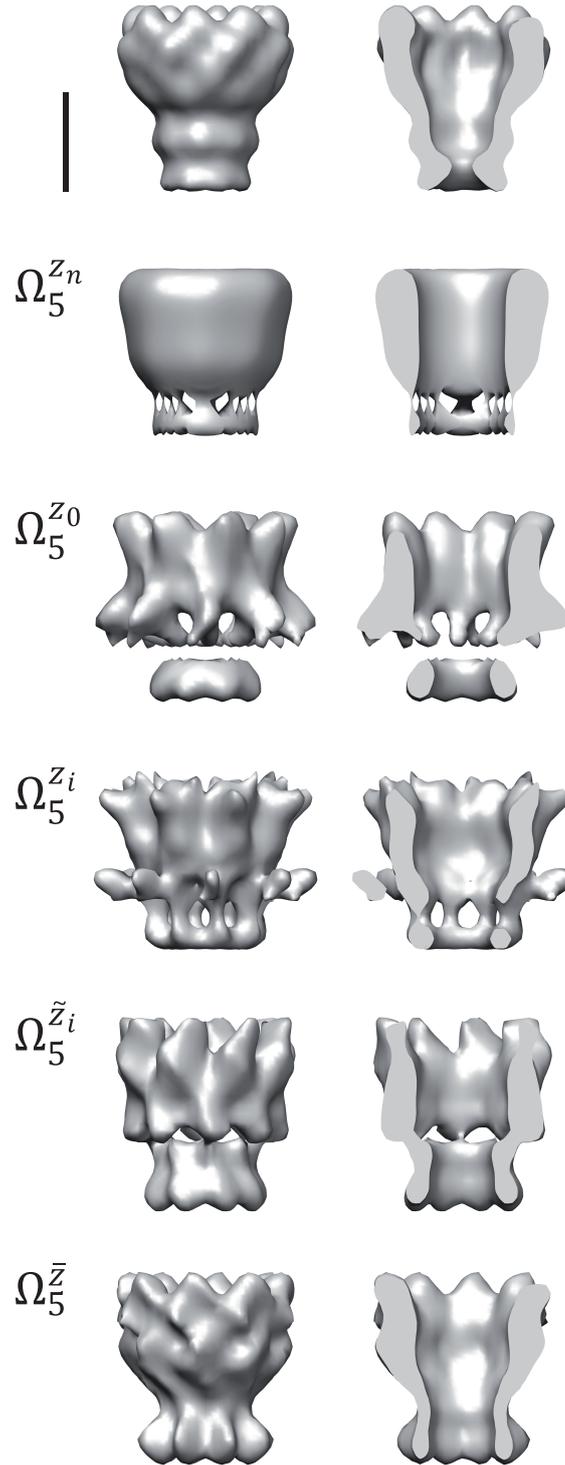


Abbildung 5.7: Isoflächen (Gesamtstruktur, erste Spalte; zentraler Schnitt, zweite Spalte) der externen Referenz (oben) und der Mittelungen  $\Omega_5^{\dagger}$ . Die Isoflächen umschließen eine Masse von 160 kDa und wurden, entsprechend der Alignierungsqualität, auf eine Auflösung von 14.1 Å gefiltert. Die unkorrigierte Mittelung  $\Omega_5^{z_n}$  ist jedoch mit 31.4 Å abgebildet (erste Nullstelle der *CTF*). Maßstab, 50 Å.

Bei der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse darf nicht vergessen werden, dass die externe Referenz  $A$  eine isolierte Struktur ohne Lipidmembran ist. Dies gilt jedoch nicht für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Mittelungen. Diese bestehen aus MspA Porinen, die in Liposomen eingebaut wurden. Es ist anzunehmen, dass durch die Lipidmembran vor allem Unterschiede in den hydrophoben Schaft- und Basisregionen des MspA Proteinkomplexes hervorgerufen werden.

Im letzten Schritt der Auflösungsmaßung wurden die  $FSC$ - und  $C_{ref}$ -Kurven des Endergebnisses  $\Omega_7^z$  berechnet (Abb. 5.8 **A**). Die Alignierungsqualität konnte hier mit  $\sim 12 \text{ \AA}$  ermittelt werden (0.5 Kriterium), während die Auflösung im Vergleich zur externen Referenz (bei einem Phasenfehler von  $60^\circ$ ) bei  $\sim 16.8 \text{ \AA}$  liegt. Zur Überprüfung der These, dass sich  $A$  und  $\Omega_7^z$  hauptsächlich in den hydrophoben Bereichen des Porins unterscheiden, wurde der Kreuzkorrelationskoeffizient zwischen beiden Schicht für Schicht als Funktion der Proteinhöhe berechnet (Abb. 5.8 **B**).

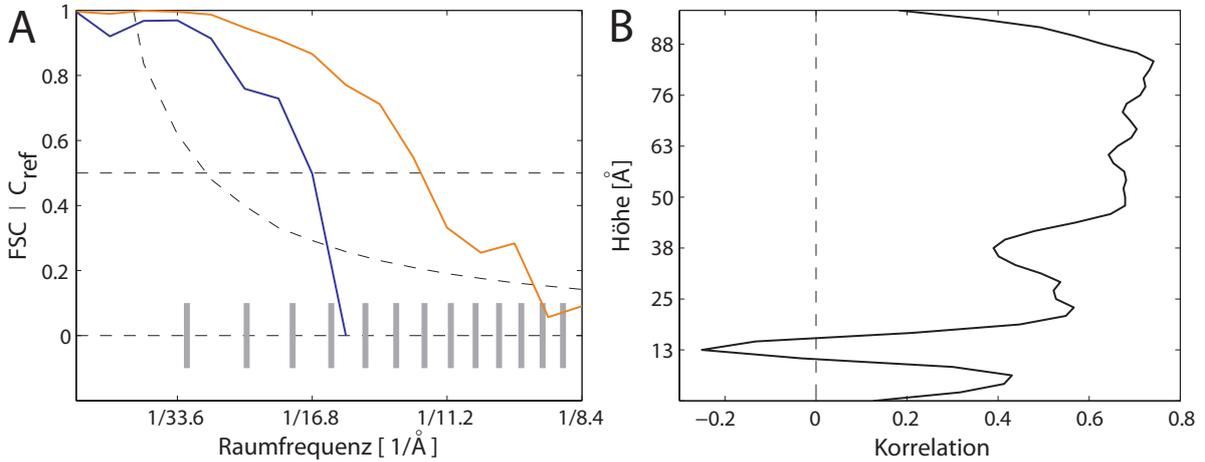


Abbildung 5.8: **A**  $FSC$ -Kurve (orange) und  $C_{ref}$ -Kurve (blau) der Mittelung  $\Omega_7^z$ . Aus der  $FSC$ -Kurve kann eine Alignierungsqualität von  $\sim 12 \text{ \AA}$  (0.5 Kriterium, gestrichelte Linie) abgelesen werden. Legt man die  $3\sigma$ -Kurve zugrunde, erstreckt sich diese in den Subnanometerbereich ( $\sim 9.2 \text{ \AA}$ ). Die Auflösung der Mittelung im Vergleich zur externen Referenz (bei einem Phasenfehler von  $60^\circ$ ) konnte aus der  $C_{ref}$ -Kurve mit  $\sim 16.8 \text{ \AA}$  bestimmt werden ( $C_{ref} = 0.5$ , gestrichelte Linie). Die grauen Linien markieren die Nullstellen der  $CTF$  mit  $z_0 = -5 \mu\text{m}$ . **B** Die Kurve zeigt die Schicht für Schicht als Funktion der Proteinhöhe berechneten Kreuzkorrelationswerte zwischen externer Referenz  $A$  und  $\Omega_7^z$ . In der Kranzregion treten deutlich höhere Korrelationswerte auf, als in den hauptsächlich hydrophoben, in der Lipidmembran eingebauten Bereichen des Porins (Höhe  $\leq 37 \text{ \AA}$ ). Der deutlichste Unterschied jedoch liegt im Bereich der engsten Stelle des Porinkanals (Höhe  $\sim 13 \text{ \AA}$ ).

Schließlich wurde das Endergebnis  $\Omega_7^z$  als Isofläche dargestellt (Abb. 5.9). Zum Vergleich wurde die Kristallstruktur von MspA in die Mittelung eingepasst (`tom_av3_dock`).

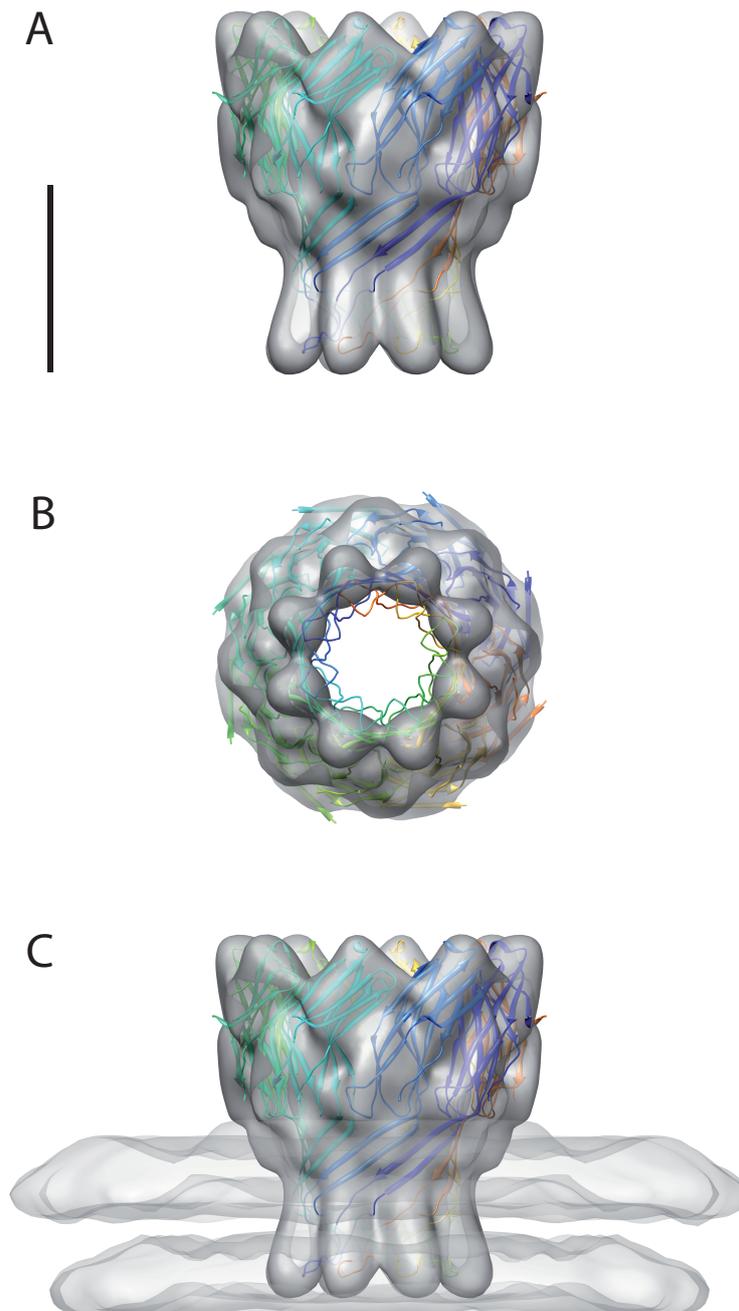


Abbildung 5.9: **A** Isofläche der Mittelung  $\Omega_7^z$ . **B** Rotiert um die  $x$ -Achse mit  $-90^\circ$ . **C** Montage der Isoflächen der Mittelung  $\Omega_7^z$  und der Lipidmembran der Liposomen. Diese wurde manuell aus der Mittelung  $\Omega_2^z$  segmentiert. Hier spielten die Membrankrümmungen der Partikel noch keine Rolle (Alignierungsqualität  $\sim 17.9 \text{ \AA}$ , 0.5 Kriterium), so dass die Doppelmembran deutlich zu erkennen war. Die Isoflächen des MspA Porins umschließen eine Masse von 160 kDa und wurden, entsprechend der Alignierungsqualität, auf eine Auflösung von  $12 \text{ \AA}$  gefiltert. Die Isofläche der Lipiddoppelmembran wurde auf  $17.9 \text{ \AA}$  gefiltert. Zusätzlich wurde die Kristallstruktur von MspA (farbig dargestellt) in  $\Omega_7^z$  eingepasst. Maßstab,  $50 \text{ \AA}$ .

Darüber hinaus wurde die Lipidmembran der Liposomen in die Abbildung integriert, die aus Mittelung  $\Omega_2^z$  durch manuelle Segmentierung entnommen ist. In dieser Mittelung war die Lipiddoppelmembran der Liposomen deutlich zu erkennen. Die Alignierungsqualität wurde mit  $\sim 17.9 \text{ \AA}$  nach dem 0.5 Kriterium bemessen. In späteren Subtomogrammalignierungsstufen wurden die Membrananteile der *MspA* Partikel maskiert, um den Einfluss der unterschiedlichen Membrankrümmungen auf die Alignierung zu minimieren.

Abschließend sei angemerkt, dass es sich anbietet, die Mittelungen vor der Auflösungsmessung mit einer Kugelmaske zu maskieren. Dadurch kann man die Auflösungsmessung auf den untersuchten Proteinkomplex fokussieren und Hintergrundeffekte minimieren. Dabei sollte jedoch unbedingt darauf geachtet werden, dass die Maske selbst keine Auflösung generiert. Insbesondere sollte die Maske einen genügend großen Durchmesser und weiche Kanten besitzen.

Zur Auflösungsmessung wurde hier eine Kugelmaske mit einem Durchmesser von 14 nm, gefolgt von einer weichen Kante mit einer Ausdehnung von etwa 5 nm verwendet. Die Maske wurde getestet, indem diese auf zwei Rauschvolumen aufgeprägt und dann die *FSC* zwischen den beiden Volumen berechnet wurde. Es ergab sich kein Anhaltspunkt einer systematischen Verzerrung der gemessenen Auflösungen durch die verwendete Kugelmaske.

Ein weiteres Kriterium zur Bewertung der *FSC*-Kurven liegt in deren Verhalten bei Raumfrequenzen  $\geq (2/3)\nu$ . Ab diesem Punkt sollte die *FSC*-Kurve unter die  $3\sigma$ -Kurve abgefallen sein und gleichmäßig um Null fluktuieren. Andernfalls kann davon ausgegangen werden, dass der Datensatz entweder unterabgetastet ist, beziehungsweise Masken- oder Interpolationsartefakte die *FSC*-Kurve verfälschen [133]. Auch hier ergab sich kein Anhaltspunkt einer systematischen Verzerrung der gemessenen Auflösungen.





## 6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Ansatz zur Korrektur der Transferfunktionen in der KET entwickelt. Im Hinblick auf die Korrektur der *CTF* beruht er auf einer Entkopplung der Defokussmessung von den Objektprojektionen. Diese Technik wird als erweitertes Aufnahmeschema bezeichnet. Hierbei werden an zusätzlichen Aufnahmestellen signaloptimierte Fokusbilder für die Defokussmessung aufgezeichnet. Von diesen kann auf den Defokus der Objektprojektionen durch Interpolation geschlossen werden. Im Hinblick auf die Korrektur der *MTF* liegt der neue Ansatz in der Integration der inversen *MTF* Filterung in die Subtomogrammalignment.

Die Methode wurde zur Strukturbestimmung des Porins MspA des Bakteriums *Mycobacterium smegmatis* angewendet. Den Ausgangspunkt des Experiments bildeten Liposomen, in deren Lipiddoppelschicht MspA rekonstituiert wurde. Die hier vorgestellte Arbeit kann als eine allgemein anwendbare Herangehensweise zur Strukturbestimmung von Membranproteinen *in situ* begriffen werden.

Hierbei sind vor allem folgende Vorteile zu sehen. Erstens ist davon auszugehen, dass die Rekonstitution eines Membranproteins, insbesondere aber großer und heterogen zusammengesetzter Membranproteinkomplexe, einfacher zu bewerkstelligen ist als ihre Kristallisation. Zweitens kann die Probendicke durch Extrusion der Liposomen mittels einer Filtermembran mit bestimmter Porengröße gut gesteuert werden. Auf diese Weise lassen sich die Proben dünn halten und ein hoher Anteil an Phasenkontrast in den Projektionen sicherstellen. Drittens ist die Ausbeute an Partikeln für die Subtomogrammalignment bei dieser Präparationstechnik hoch, so dass nur wenige Tomogramme benötigt werden. Viertens wird das Membranprotein nicht losgelöst von einer Lipidmembran betrachtet, sondern kann in seiner natürlichen Umgebung untersucht werden. Auf diese Weise können die Bereiche des Proteins identifiziert werden, die in die Membran integriert sind. Ein Ergebnis, das sich auf biochemischem Wege nur indirekt und mit sehr hohem Aufwand erzielen lässt [146]. Fünftens erlaubt Klassifikation die Erforschung von möglichen Konformationszuständen des Membranproteinkomplexes.

Ein ähnlicher Ansatz zur Strukturbestimmung von Membranproteinen wurde von Wang und Sigworth entwickelt [147]. Hier wurde die Struktur des humanen BK-Kaliumkanals (molekulare Masse 500 kDa) mit einer Auflösung von  $20 - 17 \text{ \AA}$  bei vierfacher Symmetrisierung gelöst. Die Methode basiert ebenfalls auf einer Rekonstitution des Proteins in Liposomen, da sie jedoch auf der Einzelpartikelanalyse aufbaut, muss die Objektstärke und folglich der Durchmesser der Liposomen sehr klein gehalten werden. Je geringer aber der Durchmesser, desto größer fällt die Membrankrümmung aus und desto empfindlicher reagiert die Einzelpartikelalignierung auf Größenunterschiede der Liposomen. In dem von Wang und Sigworth beschriebenen Experiment wurden Liposomen mit einem Durchmesser von etwa 30 nm verwendet, die eine etwa um den Faktor 10 größere Membrankrümmung aufweisen als die in dieser Arbeit eingesetzten Liposomen. In der Tat musste die Membran durch Bildverarbeitung vor der Einzelpartikelalignierung entfernt werden, und die Lipiddoppelschicht ließ sich in der Rekonstruktion nicht auflösen.

Es ist klar, dass die KET basierte Strukturbestimmung von Membranproteinen nicht das Ziel atomarer Auflösung verfolgen kann. Hier sind Techniken wie Röntgen- oder Elektronenkristallographie [148] überlegen. Das Potential der hier vorgestellten Methode liegt vielmehr in der Strukturaufklärung von Membranproteinkomplexen in ihrer natürlichen Umgebung. Hoch komplexe, membrangebundene Systeme der Atmungskette oder der Photosynthese beruhen auf dem Zusammenspiel mehrerer Proteinkomplexe, die in einem Netzwerk kooperativer Wechselwirkungen aufeinander bezogen sind. Die strukturelle Anordnung solcher Systeme kann nur in ihrer zellulären Umgebung aufgeklärt werden.

Ab einer Auflösung von etwa  $20 \text{ \AA}$  gelingt es, Proteinkomplexe verlässlich voneinander zu unterscheiden [35] und aufgrund ihrer relativen räumlichen Orientierungen ihre Wechselwirkungen zu entschlüsseln. Ab einer molekularen Auflösung von  $20 - 10 \text{ \AA}$  können Kristallstrukturen einzelner Proteine in Mittelungen eingepasst und so im zellulären Kontext betrachtet werden. Auf diese Weise lässt sich eine Brücke von molekularer hin zu atomarer Auflösung bauen [137].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie in der KET durch die Korrektur der Transferfunktionen Auflösungen im Bereich von  $20 - 10 \text{ \AA}$  erreicht werden können. Die hier vorgestellte Technik des erweiterten Aufnahmeschemas kann direkt auf Kippserien intakter prokaryotischer und eukaryotischer Zellen angewendet werden, wenn diese gegebenenfalls mittels der Kryo-FIB Technik für die KET gedünnt wurden. Dabei sind Proben von

subzellulären Strukturen herstellbar, die eine Objektstärke vergleichbar mit der von Liposomen besitzen. Darüber hinaus besitzt das MspA Porin als Komplex mittlerer Größe eine molekulare Masse, die geringer ist als die meisten der Membranproteinkomplexe der Atmungskette oder der Photosynthese. Es bietet sich deshalb an, die mit dem MspA Modellsystem entwickelten Verfahren auf Kryo-FIB Kippserien zellulärer Membransysteme zu übertragen.

Im Hinblick auf die Strukturbestimmung membrangebundener Proteinkomplexe eukaryotischer Zellen *in vivo* wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Ergebnisse erhalten. Basierend auf einem Kryo-FIB Tomogramm einer *Dictyostelium discoideum* Zelle konnte die Struktur von 80S Ribosomen, die an ein endoplasmatisches Retikulum gebunden sind, mit einer Auflösung von etwa 61 Å rekonstruiert werden. Hier bestand das Ziel vor allem darin, eine Methode zu entwickeln, um Proteinkomplexe unabhängig von einem *a priori* bekannten Suchmuster zu identifizieren und zu mitteln. Die im Vergleich zum MspA-Projekt geringe Auflösung hat vor allem vier Gründe, von denen jedoch keiner eine fundamentale Limitation darstellt.

Erstens ist der Defokus von  $-9\ \mu\text{m}$  (beim MspA-Projekt  $-5\ \mu\text{m}$ ) und zweitens die Pixelgröße von 5.7 Å (beim MspA-Projekt 2.1 Å) zu nennen. Drittens wurde auf die Kippserie keine *CTF*-Korrektur und während der Subtomogrammalignment keine *MTF*-Korrektur angewendet. Viertens ist die Anzahl von 131 Partikeln gering. Aufgrund der achtfachen Symmetrie entsprechen die 804 gemittelten MspA Partikel einer Anzahl von 6432 nicht symmetrischen Einheiten. Ginge man willkürlich von 131 Partikeln aus, bedeutete dies eine Anzahl von etwa 50 Kryo-FIB Tomogrammen.

In dieser Abschätzung ist jedoch noch nicht betrachtet, dass es alles andere als trivial ist, standardmäßig Tomogramme aus eukaryotischen Zellen zu erhalten, die mit hoher Erfolgsrate dieselben untersuchten Strukturen, wie beispielsweise ein endoplasmatisches Retikulum oder ein Mitochondrium, enthalten. Diese Problematik wird durch die Wahl einer höheren Vergrößerung noch verschärft. Folglich liegt die große Herausforderung bei der Strukturaufklärung von Membranproteinkomplexen in ihrer natürlichen Umgebung darin, zukünftig Methoden zu entwickeln, die eine routinemäßige Auswahl von geeigneten Objektstellen mit hoher Erfolgsrate ermöglichen.

Eine Alternative zu der hier dargestellten *CTF*-Korrekturmethode wurde von Fernandez et al. entwickelt [149] und von zwei Forschungsgruppen aufgegriffen [140, 135]. Hier besteht der Ansatz im Wesentlichen darin, die Powerspektren einer hohen Anzahl kleiner Bereiche der Projektionen unter bestimmten Randbedingungen zu mitteln und

auf diese Weise ein kombiniertes Powerspektrum mit verstärktem Signal und sichtbaren Thon-Ringen zu erhalten. Diese Methode (streifenbasierte Periodogrammmittelung) wurde im Rahmen eines anderen Projekts ausführlich getestet [150]. Hierbei hat sich gezeigt, dass bei Objektdicken  $\lesssim 100$  nm eine verlässliche Defokussmessung bis typischerweise zur zweiten Nullstelle möglich ist.

Im Gegensatz dazu konnte im MspA-Projekt durch das optimierte Signal der Fokusbilder die Genauigkeit der Defokussmessung bis zur vierten Nullstelle ausgedehnt werden. Ein weiterer Nachteil der streifenbasierten Periodogrammmittelung ist, dass hier die zufälligen Verschiebungen des Objekts aufgrund der mechanischen Ungenauigkeit der Kippbühne und ihre Auswirkungen auf den Defokus nicht in Betracht gezogen werden können. Eine Einschränkung der hier vorgestellten Methode hingegen ist, dass sie nicht nachträglich auf bereits bestehende Kippserien angewendet werden kann.

Neben der höheren Messgenauigkeit besteht der entscheidende Vorteil des erweiterten Aufnahmeschemas gegenüber der streifenbasierten Periodogrammmittelung in der Entkopplung der Defokussmessung von den Objektprojektionen. Dadurch ist die Methode im Prinzip bei beliebigen Objektdicken bis zur Dickenlimitation einsetzbar.

Jedoch wird dadurch die Vernachlässigung des vertikalen Defokusgradienten immer schwerer haltbar. Die Erweiterung der Methode um die Korrektur dieses Defokusgradienten könnte durch eine von Jensen und Kornberg entwickelte Technik gelingen [151]. Hierbei würden die Subtomogramme schichtweise rekonstruiert, wobei die Projektionen in Abhängigkeit von der Höhe der Rekonstruktionsschicht korrigiert würden. Der Rechenaufwand vervielfacht sich dadurch jedoch proportional zur Anzahl der Schichten. Dieses Problem könnte jedoch durch Parallelisierung einfach gelöst werden.

Im MspA-Projekt wurden eine Reihe von Strategien  $\dagger = \{z_n, z_0, z_i, \tilde{z}_i, \bar{z}\}$  zur Defokuskorrektur verglichen. Hier hat sich vor allem gezeigt, wie überraschend sensitiv die Mittelungen selbst auf kleinste Unterschiede in den Defokuswerten reagieren. Durch visuellen Vergleich und objektive Validierung der Mittelungen mithilfe der bekannten Kristallstruktur von MspA konnte gezeigt werden, dass die *CTF*-Korrektur mit dem mittleren Defokus  $\bar{z}$  das beste Ergebnis geliefert hat. Dies ist auf den ersten Blick irritierend, da die Defokuswerte  $z_i$  und  $\tilde{z}_i$  eine individuelle Korrektur der Projektionen erlauben, während  $\bar{z}$  lediglich den mittleren Defokus der Kippserie korrigiert.

Der Widerspruch kann wie folgt aufgelöst werden. Nach den Regeln der Fehlerrechnung wird die Messgenauigkeit der Defokussmessung auf den Fokusbildern durch die Inter-

polarisation direkt auf die Defokuswerte  $z_i$  übertragen. Das bedeutet, diese besitzen eine Messgenauigkeit von etwa  $\pm 200$  nm. Durch die Mittelwertbildung kann dieser Messfehler jedoch deutlich verringert werden, so dass der mittlere Defokus  $\bar{z}$  eine genaue Abschätzung des mittleren Defokus der Kippserie darstellt. Tatsächlich wurden in  $\bar{z}$  bis zu 82 Meßwerte kombiniert, in jedem der interpolierten Defokuswerte  $z_i$  hingegen lediglich 2. Desweiteren wurde in einer Modellrechnung gezeigt, dass die modellierten Defokuswerte  $\tilde{z}_i$  bis zu einem bestimmten Grad von der Genauigkeit der Zentrierung und Autofokussierung abhängen. Dies gilt jedoch nicht für  $z_i$  und  $\bar{z}$ .

Konkret konnte die Auflösung der Mittelung  $\Omega_5^{\tilde{z}_i}$  zwar die Auflösung von  $\Omega_5^{z_i}$  durch eine bessere Glättung der Defokuswerte übertreffen, jedoch reichte sie nicht an die Auflösung von  $\Omega_5^{\bar{z}}$  heran, da das zugrundeliegende Defokusmodell durch die Kopplung an die Zentrierungs- und Autofokussierungsgenauigkeit nur eine begrenzte Gültigkeit besitzt. Eine pragmatische Lösung könnte sein, die Defokuskorrektur mit dem Defokusmodell vorzunehmen, wenn die Streuung der Werte moderat ist und sonst den mittleren Defokus einzusetzen.

Ohne Zweifel klar ist jedoch die Konsequenz, die sich daraus in Hinblick auf die Verbesserung des erweiterten Aufnahmeschemas ergibt. Die Genauigkeit der Defokuskorrektur ist direkt mit der Messgenauigkeit der Defokuswerte  $z_i^j$  der Fokusbilder  $f_i^j$  verknüpft. Eine Steigerung der Präzision wirkt sich direkt auf die interpolierten Defokuswerte  $z_i$  aus. Ab einer bestimmten Grenze sollte der Effekt der individuellen Projektionskorrektur den fehlerausgleichenden Effekt der Mittelwertbildung übertreffen.

Eine Erhöhung der Genauigkeit der Defokuswerte  $z_i^j$  kann vor allem durch eine höhere Anzahl von Thon-Ringen in den Periodogrammen der Fokusbilder erreicht werden. Hierfür stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung, die beliebig zu kombinieren sind. Erstens könnten von derselben Fokusstelle mehrere Fokusbilder aufgenommen und die Periodogramme gemittelt werden. Dies stellt sowohl in der manuellen als auch automatisierten Umsetzung des erweiterten Aufnahmeschemas keine besondere Herausforderung und nur geringen zusätzlichen Zeitaufwand dar. Zweitens könnte der Dosisunterschied zwischen Objektprojektionen und Fokusbildern durch eine Verringerung des Strahldurchmessers und nicht durch eine Verlängerung der Belichtungszeit generiert werden. Dadurch ergibt sich eine wesentlich höhere Energiedichte auf den Fokusstellen und das Signal der Fokusbilder wird verbessert. Ebenfalls dürfte dadurch die Auswirkung von Vibrationen auf die Periodogramme eliminiert werden. Die dritte Möglichkeit basiert auf der Verwendung einer DDD-Kamera. Durch die höhere Signalübertragung im Vergleich zu einer konventionellen CCD-Kamera könnte die Visualisierung von Thon-Ringen höherer Ordnung deutlich vereinfacht werden.

Die Mittelung  $\Omega_7^{\bar{z}}$  stellt das Endergebnis im MspA-Projekt dar. Die Struktur zeigt deutlich wie MspA in die Lipidmembran der Liposomen eingebaut ist. Die Doppelmembran konnte klar aufgelöst werden.

Durch Validierung der Mittelung  $\Omega_7^{\bar{z}}$  durch *Cross resolution* mit der Kristallstruktur von MspA lässt sich eine obere Auflösungsgrenze von 16.8 Å feststellen. Der Nachweis, dass dies tatsächlich eine obere Auflösungsgrenze sein muss, gelang durch den Vergleich der Mittelung mit der Kristallstruktur Schicht für Schicht durch Kreuzkorrelation. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ähnlichkeit in der Kranzregion hoch, jedoch gerade in den Bereichen, in denen MspA in die Lipidmembran eingebaut ist, deutlich reduziert ist. Da sich die Validierung jedoch über die gesamte Mittelung erstreckte (eine Maskierung von Teilbereichen ist nicht möglich, da die Maske das Ergebnis verfälschen würde), ist die gemessene Auflösung ein Mittelwert zwischen den beiden Ähnlichkeitsbereichen. Würde also die Auflösung der Kranzregion der Mittelung relativ zur Kranzregion der Kristallstruktur beurteilt werden, so sollte die Auflösung besser ausfallen. Implizit ist dadurch nachgewiesen, dass die im MspA-Projekt bei der Korrektur der Transferfunktionen verwendeten Näherungen bis zu einer Auflösung von mindestens 16.8 Å gültig sind.

Die reduzierte Ähnlichkeit in der Basis- und Schaftregion hat vor allem zwei Gründe. Erstens enthält die Kristallstruktur keine Membran, so dass sich diese von  $\Omega_7^{\bar{z}}$  in diesem Bereich definitiv unterscheiden muss. Zweitens liefert  $\Omega_7^{\bar{z}}$  im Bereich der engsten Stelle des Porins negative Korrelationswerte gegenüber der Kristallstruktur. Dies kann nun als Effekt mangelhafter *CTF*-Korrektur interpretiert werden, wobei im Zentrum dieses Bereichs durch die *CTF* artifiziell Masse erzeugt wurde. Tatsächlich lässt sich dieser Effekt durch eine Modellrechnung klar nachweisen. Da MspA an dieser Stelle einen Durchmesser von etwa 10 Å besitzt, ist dies ein klarer Hinweis darauf, dass bei dieser Auflösung die Genauigkeit der *CTF*-Korrektur nicht mehr greift.

Darüber hinaus wurde die Mittelung  $\Omega_7^{\bar{z}}$  durch *Fourier shell correlation* bewertet (im Text als Alignierungsqualität bezeichnet), die eine Auflösung von 12 Å lieferte (0.5 Kriterium). Es wurde klar nachgewiesen, dass dieser Wert nicht auf die *CTF*-Korrektur reagiert und folglich die untere Auflösungsgrenze darstellt. Wenn also die Defokuskorrektur genauer ist als die obere Auflösungsgrenze, was aufgrund der oben beschriebenen Zusammenhänge durchaus plausibel erscheint, dann kann das Endergebnis  $\Omega_7^{\bar{z}}$  eine Auflösung von maximal 12 Å besitzen.

Für die nahe Zukunft gibt es eine klare Perspektive in Richtung höherer Auflösung. Neben der oben beschriebenen Verbesserungsmöglichkeiten des erweiterten Aufnahmeschemas ist die Kombination einer DDD-Kamera mit *MTF*-Korrektur vielversprechend. Durch das erhöhte Signal könnte die *MTF*-Korrektur weiter verstärkt werden. Wenn die verwendete DDD-Kamera darüber hinaus die Aufnahme von  $4\text{ k} \times 4\text{ k}$ -Projektionen zulässt, könnte die Pixelgröße der Projektionen nochmals deutlich verringert werden. Dadurch könnten Raumfrequenzen in den Fokus der *MTF*-Korrektur gerückt werden, die es gar nicht so unwahrscheinlich erscheinen lassen, in einem Projekt mit ähnlich kontrollierten Randbedingungen wie im MspA-Projekt, eine Auflösung im Subnanometerbereich durch die Kombination KET, Subtomogrammalignierung und Korrektur der Transferfunktionen zu erreichen.



# Literaturverzeichnis

- [1] Lucic, V., F. Förster und W. Baumeister: *Structural studies by electron tomography: From cells to molecules*. Annual Review of Biochemistry, 74:833–865, 2005.
- [2] Scheffel, A., M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, J. M. Plitzko und D. Schueler: *An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria*. Nature, 440:110–114, 2006.
- [3] Medalia, O., I. Weber, A. S. Frangakis, D. Nicastro, G. Gerisch und W. Baumeister: *Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography*. Science, 298:1209–1213, 2002.
- [4] Milne, J. L. und S. Subramaniam: *Cryo-electron tomography of bacteria: Progress, challenges and future prospects*. Nature Reviews Microbiology, 7:666–675, 2009.
- [5] Nicastro, D., A. S. Frangakis, D. Typke und W. Baumeister: *Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria*. Journal of Structural Biology, 129:48–56, 2000.
- [6] Hoffmann, C., A. Leis, M. Niederweis, J. M. Plitzko und H. Engelhardt: *Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure*. PNAS, 105:3963–3967, 2008.
- [7] Bartesaghi, A. und S. Subramaniam: *Membrane protein structure determination using cryo-electron tomography and 3D image averaging*. Current Opinion in Structural Biology, 19:402–407, 2009.
- [8] Grünewald, K., P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister und A. C. Steven: *Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography*. Science, 302:1396–1398, 2003.
- [9] Liu, J., A. Bartesaghi, M. J. Borgnia, G. Sapiro und S. Subramaniam: *Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers*. Nature, 455:109–113, 2008.

- [10] Subramaniam, S., A. Bartesaghi, J. Liu, A. E. Bennett und R. Sougrat: *Electron tomography of viruses*. Current Opinion in Structural Biology, 17:596–602, 2007.
- [11] De Rosier, D. J. und A. Klug: *Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs*. Nature, 217:130–134, 1968.
- [12] Glauert, A. M.: *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. North-Holland, 1991.
- [13] Al-Amoudi, A., L. P. Norlen und J. Dubochet: *Cryo-electron microscopy of vitreous section of native biological cells and tissues*. Journal of Structural Biology, 148:131–135, 2004.
- [14] Adrian, M., J. Dubochet, J. Lepault und A. W. McDowell: *Cryo-electron microscopy of viruses*. Nature, 308:32–36, 1984.
- [15] Dubochet, J., M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell und P. Schultz: *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. Quarterly Reviews of Biophysics, 21:129–228, 1988.
- [16] Grimm, R., H. Singh, R. Rachel, D. Typke, W. Zillig und W. Baumeister: *Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells*. Biophysical Journal, 74:1031–1042, 1998.
- [17] Fernandez, J. J. und S. Li: *Anisotropic nonlinear filtering of cellular structures in cryoelectron tomography*. Computing in Science and Engineering, 7:54–61, 2005.
- [18] Heel, M. van, B. Gowen, R. Matadeen, E. V. Orlowa, R. Finn, T. Pape, D. Cohen, H. Stark, R. Schmidt, M. Schatz und A. Patwardhan: *Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution*. Quarterly Reviews of Biophysics, 33:307–369, 2000.
- [19] Frank, J.: *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies*. Oxford University Press, 2006.
- [20] Carazo, J. M.: *The fidelity of 3D reconstructions from incomplete data and the use of restoration methods*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 6, Seiten 117–164. Plenum Press, 1992.

- [21] Radermacher, M.: *Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series*. Journal of Electron Microscopy Technique, 9:359–394, 1988.
- [22] Radermacher, M.: *Weighted back-projection methods*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 5, Seiten 91–115. Plenum Press, 1992.
- [23] Karp, G.: *Molekulare Zellbiologie*. Springer, 2005.
- [24] Al-Amoudi, A., J. J. Chang, A. Leforestier, A. McDowall, L. M. Salamin, L. P. Norlen, K. Richter, N. S. Blanc, D. Studer und J. Dubochet: *Cryo-electron microscopy of vitreous sections*. The EMBO Journal, 23:3583–3588, 2004.
- [25] Rigort, A., F. J. Bäuerlein, A. Leis, M. Gruska, C. Hoffmann, T. Laugks, U. Böhm, M. Eibauer, H. Gnaegi, W. Baumeister und J. M. Plitzko: *Micromachining tools and correlative approaches for cellular cryo-electron tomography*. Journal of Structural Biology, 172:169–179, 2010.
- [26] Kishimoto-Okada, A., S. Murakami, Y. Ito, N. Horii, H. Furukawa, J. Takagi und K. Iwasaki: *Comparison of the envelope architecture of E. coli using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography*. Journal of Electron Microscopy, 59:419–426, 2010.
- [27] Dubochet, J., B. Zuber, M. Eltsov, C. Bouchet-Marquis, A. Al-Amoudi und F. Livolant: *How to read a vitreous section*. In: McIntosh, J. Richard (Herausgeber): *Cellular Electron Microscopy*, Kapitel 15, Seiten 385–406. Elsevier, 2007.
- [28] Frangakis, A. S. und F. Förster: *Computational exploration of structural information from cryo-electron tomograms*. Current Opinion in Structural Biology, 14:325–331, 2004.
- [29] Volkman, N.: *A novel three-dimensional variant of the watershed transform for segmentation of electron density maps*. Journal of Structural Biology, 138:123–129, 2002.
- [30] Frangakis, A. S. und R. Hegerl: *Segmentation of two- and three-dimensional data from electron microscopy using eigenvector analysis*. Journal of Structural Biology, 138:105–113, 2002.

- [31] Moussavi, F., G. Heitz, F. Amat, L. R. Comolli, D. Koller und M. Horowitz: *3D segmentation of cell boundaries from whole cell cryogenic electron tomography volumes*. Journal of Structural Biology, 170:134–145, 2010.
- [32] Rigort, A., D. Günther und W. Baumeister: *Automated segmentation of electron tomograms for a quantitative description of actin filament networks*. Journal of Structural Biology, x:x–x, 2011.
- [33] Frangakis, A. S. und R. Hegerl: *Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion*. Journal of Structural Biology, 135:239–250, 2001.
- [34] Duda, R. O., P. E. Hart und D. G. Stork: *Pattern classification*. Wiley, 2001.
- [35] Frangakis, A. S., J. Böhm, F. Förster, S. Nickell, D. Nicastro, D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister: *Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells*. PNAS, 99:14153–14158, 2002.
- [36] Borchardt-Ott, W.: *Kristallographie*. Springer, 2002.
- [37] Ortiz, J. O., F. Förster, J. Kürner, A. A. Linaroudis und W. Baumeister: *Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition*. Journal of Structural Biology, 156:334–341, 2006.
- [38] Best, C., S. Nickell und W. Baumeister: *Localization of protein complexes by pattern recognition*. In: McIntosh, J. Richard (Herausgeber): *Cellular Electron Microscopy*, Kapitel 25, Seiten 615–638. Elsevier, 2007.
- [39] Nickell, S., C. Kofler, A. Leis und W. Baumeister: *A visual approach to proteomics*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7:225–230, 2006.
- [40] Beck, M., J. A. Malmström, V. Lange, A. Schmidt, E. W. Deutsch und R. Aebersold: *Visual proteomics of the human pathogen Leptospira interrogans*. Nature Methods, 6:817–823, 2009.
- [41] Walz, J.: *Elektronentomographische Abbildung und dreidimensionale Mittelung von biologischen Makromolekülen*. Dissertation, Technische Universität München, 1997.
- [42] Walz, J., D. Typke, M. Nitsch, A. J. Koster, R. Hegerl und W. Baumeister: *Electron tomography of single ice-embedded macromolecules: Three-dimensional alignment and classification*. Journal of Structural Biology, 120:387–395, 1997.

- [43] Förster, F.: *Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden*. Dissertation, Technische Universität München, 2005.
- [44] Förster, F., O. Medalia, N. Zaubermann, W. Baumeister und D. Fass: *Retrovirus envelope protein complex structure in situ determined by cryo-electron tomography*. PNAS, 102:4729–4734, 2005.
- [45] Förster, F. und R. Hegerl: *Structure determination in situ by averaging of tomograms*. In: McIntosh, J. Richard (Herausgeber): *Cellular Electron Microscopy*, Kapitel 29, Seiten 741–767. Elsevier, 2007.
- [46] Förster, F., S. Pruggnaller, A. Seybert und A. S. Frangakis: *Classification of cryo-electron sub-tomograms using constrained correlation*. Journal of Structural Biology, 161:276–286, 2008.
- [47] Bartesaghi, A., P. Sprechmann, J. Liu, G. Randall, G. Sapiro und S. Subramaniam: *Classification and 3D averaging with missing wedge correction in biological electron tomography*. Journal of Structural Biology, 162:436–450, 2008.
- [48] Winkler, H., P. Zhu, J. Liu, F. Ye, K. H. Roux und K. A. Taylor: *Tomographic subvolume alignment and subvolume classification applied to myosin V and SIV envelope spikes*. Journal of Structural Biology, 165:64–77, 2009.
- [49] Scheres, S. H., R. Melerio, M. Valle und J. M. Carazo: *Averaging of electron subtomograms and random conical tilt reconstructions through likelihood optimization*. Structure, 17:1563–1572, 2009.
- [50] Beck, M., F. Förster, M. Ecke, J. M. Plitzko, F. Melchior, G. Gerisch, W. Baumeister und O. Medalia: *Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography*. Science, 306:1387–1390, 2004.
- [51] Beck, M., V. Lucic, F. Förster, W. Baumeister und O. Medalia: *Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography*. Nature, 449:611–615, 2007.
- [52] Brandt, F., S. A. Etchells, J. O. Ortiz, A. H. Elcock, F. U. Hartl und W. Baumeister: *The native 3D organization of bacterial polysomes*. Cell, 136:261–271, 2009.

- [53] Brandt, F., L. A. Carlson, F. U. Hartl, W. Baumeister und K. Grünwald: *The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells*. *Molecular Cell*, 39:560–569, 2010.
- [54] Faller, M., M. Niederweis und G. E. Schulz: *The structure of a mycobacterial outer-membrane channel*. *Science*, 303:1189–1192, 2004.
- [55] Madden, T. D.: *Current concepts in membrane protein reconstitution*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40:207–222, 1986.
- [56] Paternostre, M. T., M. Roux und J. L. Rigaud: *Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate*. *Biochemistry*, 27:2668–2677, 1988.
- [57] Rigaud, J. L., M. T. Paternostre und A. Bluzat: *Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin*. *Biochemistry*, 27:2677–2688, 1988.
- [58] Reimer, L.: *Transmission electron microscopy: Physics of image formation and microanalysis*, Band 36 der Reihe *Springer Series in Optical Sciences*. Springer, 1984.
- [59] Hembree, G. G. und J. A. Venables: *Nanometer resolution scanning Auger electron microscopy*. *Ultramicroscopy*, 47:109–120, 1992.
- [60] Heide, H. G. und E. Zeitler: *The physical behavior of solid water at low temperatures and the embedding of electron microscopical specimens*. *Ultramicroscopy*, 16:151–160, 1985.
- [61] Luther, P. K.: *Sample shrinkage and radiation damage*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 3, Seiten 39–60. Plenum Press, 1992.
- [62] Jap, B. K. und R. M. Glaeser: *The scattering of high-energy electrons. II. Quantitative validity domains of the single-scattering approximations for organic crystals*. *Acta Crystallographica A*, 36:57–67, 1980.

- [63] Hawkes, P. W.: *The electron microscope as a structure projector*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 2, Seiten 17–38. Plenum Press, 1992.
- [64] Schwabl, F.: *Quantenmechanik*. Springer, 2002.
- [65] Reimer, L.: *Electron spectroscopic imaging*. In: Reimer, L. (Herausgeber): *Energy-filtering transmission electron microscopy*, Kapitel 7, Seiten 347–400. Springer, 1995.
- [66] Reimer, L.: *Introduction*. In: Reimer, L. (Herausgeber): *Energy-filtering transmission electron microscopy*, Kapitel 1, Seiten 1–42. Springer, 1995.
- [67] Rose, H. und D. Krahl: *Electron optics of imaging energy filters*. In: Reimer, Ludwig (Herausgeber): *Energy-filtering transmission electron microscopy*, Kapitel 2, Seiten 43–149. Springer, 1995.
- [68] Horne, R. W.: *Early developments in the negative staining technique for electron microscopy*. *Micron and Microscopica Acta*, 22:321–326, 1991.
- [69] Bremer, A., C. Henn, A. Engel, W. Baumeister und U. Aebi: *Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy?* *Ultramicroscopy*, 46:85–111, 1992.
- [70] Danev, R., S. Kanamaru, M. Marko und K. Nagayama: *Zernike phase contrast cryo-electron tomography*. *Journal of Structural Biology*, 171:174–181, 2010.
- [71] Murata, K., X. Liu, R. Danev, J. Jakana, M. F. Schmid, J. King, K. Nagayama und W. Chiu: *Zernike phase contrast cryo-electron microscopy and tomography for structure determination at nanometer and subnanometer resolutions*. *Structure*, 18:903–912, 2011.
- [72] Scherzer, O.: *The theoretical resolution limit of the electron microscope*. *Journal of Applied Physics*, 20:20, 1948.
- [73] Hecht, E.: *Optik*. Oldenbourg, 2005.
- [74] Hanszen, K. J.: *Generalisierte Angaben über die Phasenkontrast- und Amplitudenkontrast-Übertragungsfunktion für elektronenmikroskopische Objektive*. *Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik*, 20, 1966.

- [75] Hanszen, K. J.: *New knowledge on resolution and contrast in the electron microscope image*. *Naturwissenschaften*, 54:125–133, 1967.
- [76] Zhu, J., P. A. Penczek, R. Schröder und J. Frank: *Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: Procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome*. *Journal of Structural Biology*, 118:197–219, 1997.
- [77] Mindell, J. A. und N. Grigorieff: *Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy*. *Journal of Structural Biology*, 142:334–347, 2003.
- [78] Toyoshima, C. und N. Unwin: *Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images*. *Ultramicroscopy*, 25:279–291, 1988.
- [79] Toyoshima, C., K. Yonekura und H. Sasabe: *Contrast transfer for frozen-hydrated specimens. II. Amplitude contrast at very low-frequencies*. *Ultramicroscopy*, 48:165–176, 1993.
- [80] Smith, M. F. und J. P. Langmore: *Quantitation of molecular densities by cryo-electron microscopy. Determination of the radial density distribution of tobacco mosaic-virus*. *Journal of Molecular Biology*, 226:763–774, 1992.
- [81] Erickson, H. P. und A. Klug: *Measurement and compensation of defocusing and aberrations by Fourier processing of electron micrographs*. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 261:105–118, 1971.
- [82] Thon, F.: *Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 21a:476–478, 1966.
- [83] Ludtke, S. J., M. L. Baker, D. H. Chen, J. L. Song, D. T. Chuang und W. Chiu: *De novo backbone trace of GroEL from single particle electron cryomicroscopy*. *Structure*, 16:441–448, 2008.
- [84] Yu, X., L. Jin und Z. H. Zhou: *3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy*. *Nature*, 453:415–420, 2008.
- [85] Sander, B., M. M. Golas und H. Stark: *Automatic CTF correction for single particles based upon multivariate statistical analysis of individual power spectra*. *Journal of Structural Biology*, 142:392–401, 2003.

- [86] Fan, G. Y. und M. H. Ellisman: *Digital imaging in transmission electron microscopy*. Journal of Microscopy, 200:1–13, 2000.
- [87] Faruqi, A. R. und G. C. Tyrell: *Evaluation of gadolinium oxy-sulphide (P43) phosphor used in CCD detectors for electron microscopy*. Ultramicroscopy, 76:69–75, 1999.
- [88] Ruijter, W. J. de und J. K. Weiss: *Methods to measure properties of slow-scan CCD cameras for electron detection*. Review of Scientific Instruments, 63:4314–4321, 1992.
- [89] Ruijter, W. J. de: *Imaging properties and applications of slow-scan charge-coupled device cameras suitable for electron microscopy*. Micron, 26:247–275, 1995.
- [90] Nickell, S.: *Elektronentomographische Abbildung eiseingebetteter prokaryotischer Zellen*. Dissertation, Technische Universität München, 2001.
- [91] Faruqi, A.R und R. Henderson: *Electronic detectors for electron microscopy*. Current Opinion in Structural Biology, 17:549–555, 2007.
- [92] Xuong, N. H., L. Jin, S. Kleinfelder, S. Li, P. Leblanc, F. Duttweiler, J. C. Bouwer, S. T. Peltier, A. C. Milazzo und M. H. Ellisman: *Future Directions for Camera Systems in Electron Microscopy*. In: McIntosh, J. R. (Herausgeber): *Cellular Electron Microscopy*, Band 79 der Reihe *Methods in Cell Biology*, Seiten 721–739. Academic Press, 2007.
- [93] Milazzo, A. C., G. Moldovan, J. Lanman, L. Jin, J. C. Bouwer, S. Klienfelder, S. T. Peltier, M. H. Ellisman, A. I. Kirkland und N. H. Xuong: *Characterization of a direct detection device imaging camera for transmission electron microscopy*. Ultramicroscopy, 110:741–744, 2010.
- [94] <http://www.gatan.com/company/news/news06231001.php>.
- [95] Turner, J. N. und U. Valdre: *Tilting stages for biological applications*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 7, Seite 167. Plenum Press, New York, 1992.
- [96] Dierksen, K., D. Typke, R. Hegerl und A. J. Koster: *Towards automatic electron tomography*. Ultramicroscopy, 40:71–87, 1992.

- [97] Dierksen, K., D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister: *Towards automatic electron tomography II. Implementation of autofocus and low-dose procedures*. Ultramicroscopy, 49:109–120, 1993.
- [98] Guckenberger, R.: *Determination of a common origin in the micrographs of tilt series in three-dimensional electron microscopy*. Ultramicroscopy, 9:167–174, 1982.
- [99] Koster, A. J. und W. J. de Ruijter: *Practical autoalignment of transmission electron microscopes*. Ultramicroscopy, 40:89–107, 1992.
- [100] Koster, A. J., H. Chen, J. W. Sedat und D. A. Agard: *Automated microscopy for electron tomography*. Ultramicroscopy, 46:207–227, 1992.
- [101] Korinek, A., F. Beck, W. Baumeister, S. Nickell und J. M. Plitzko: *Computer controlled cryo-electron microscopy - TOM2 a software package for high-throughput applications*. Journal of Structural Biology, In Press, Corrected Proof:–, 2011.
- [102] Mastronarde, D. N.: *Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements*. Journal of Structural Biology, 152:36–51, 2005.
- [103] Frank, J. und B. F. McEwen: *Alignment by cross-correlation*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 9, Seiten 205–213. Plenum Press, New York, 1992.
- [104] Brandt, S., J. Heikkonen und P. Engelhardt: *Automatic alignment of transmission electron microscope tilt series without fiducial markers*. Journal of Structural Biology, 136:201–213, 2001.
- [105] Brandt, S.: *Markerless alignment in electron tomography*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*, Kapitel 6, Seiten 187–215. Springer, 2005.
- [106] Eibauer, M.: *Alignierung und Rekonstruktion von Zweiachsenkippsreihen mit Merkmalverfolgung und SIRT*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2007.
- [107] Sorzano, C. O., C. Messaoudi, M. Eibauer, J. R. Bilbao-Castro, R. Hegerl, S. Nickell, S. Marco und J. M. Carazo: *Marker-free image registration of electron tomography tilt-series*. BMC Bioinformatics, 10:124, 2009.

- [108] Lawrence, Michael C.: *Least-squares method of alignment using markers*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Three-dimensional imaging with the transmission electron microscope*, Kapitel 8, Seiten 197–204. Plenum Press, New York, 1992.
- [109] Brandt, S., J. Heikkonen und P. Engelhardt: *Multiphase method for automatic alignment of transmission electron microscope images using markers*. *Journal of Structural Biology*, 133:10–22, 2001.
- [110] Mastronarde, D. N.: *Fiducial marker and hybrid alignment methods for single- and double-axis tomography*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*, Seiten 163–185. Springer, 2005.
- [111] Nickell, S., F. Förster, A. Linaroudis, W. D. Net, F. Beck, R. Hegerl, W. Baumeister und J. M. Plitzko: *TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography*. *Journal of Structural Biology*, 149:227–234, 2005.
- [112] Crowther, R. A., D. J. De Rosier und A. Klug: *The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 317:319–340, 1970.
- [113] Gilbert, P.: *Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections*. *Journal of Theoretical Biology*, 36:105–117, 1972.
- [114] Carazo, J. M., G. T. Herman, C. O. Sorzano und R. Marabini: *Algorithms for three-dimensional reconstruction from the imperfect projection data provided by electron microscopy*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*, Kapitel 7, Seiten 217–243. Springer, 2005.
- [115] Penczek, P. A., R. Renka und H. Schomberg: *Gridding-based direct Fourier inversion of the three-dimensional ray transform*. *Journal of the Optical Society of America A*, 21:499–509, 2004.
- [116] Radermacher, M.: *Weighted back-projection methods*. In: Frank, J. (Herausgeber): *Electron tomography: Methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*, Kapitel 8, Seiten 245–273. Springer, 2005.

- [117] Hoppe, W. und R. Hegerl: *Three-dimensional structure determination by electron microscopy (nonperiodic specimens)*. In: Hawkes, P. W. (Herausgeber): *Computer processing of electron microscope images*, Band 13 der Reihe *Topics in current physics*, Kapitel 4, Seiten 127–185. Springer, 1980.
- [118] Nickell, S., R. Hegerl, W. Baumeister und R. Rachel: *Pyrodictium cannulae enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography*. *Journal of Structural Biology*, 141:34–42, 2003.
- [119] Hegerl, R.: *The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy*. *Journal of Structural Biology*, 116:30–34, 1996.
- [120] Kremer, J. R., D. N. Mastronarde und J. R. McIntosh: *Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD*. *Journal of Structural Biology*, 116:71–76, 1996.
- [121] Haller, T.: *Multireference alignment of 3D data from electron tomography*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2008.
- [122] Heymann, J. B., M. Chagoyen und D. M. Belnap: *Common conventions for interchange and archiving of three-dimensional electron microscopy information in structural biology*. *Journal of Structural Biology*, 151:196–207, 2005.
- [123] Bronstein, I. N., K. A. Semendjajew, G. Musiol und H. Muehlig: *Taschenbuch der Mathematik*. Harri Deutsch, 1997.
- [124] Frank, J.: *The role of correlation techniques in computer image processing*. In: Hawkes, P. W. (Herausgeber): *Computer processing of electron microscope images*, Band 13 der Reihe *Topics in current physics*, Kapitel 5, Seiten 187–222. Springer, 1980.
- [125] Roseman, A. M.: *Particle finding in electron micrographs using a fast local correlation algorithm*. *Ultramicroscopy*, 94:225–236, 2003.
- [126] Nickell, S., F. Beck, S. H. Scheres, A. Korinek, F. Förster, K. Lasker, O. Mihalache, N. Sun, I. Nagy, A. Sali, J. M. Plitzko, J. M. Carazo, M. Mann und W. Baumeister: *Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome*. *PNAS*, 106:11943–11947, 2009.

- [127] Walz, J., T. Tamura, N. Tamura, R. Grimm, W. Baumeister und A. J. Koster: *Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo*. *Molecular Cell*, 1:59–65, 1997.
- [128] Walz, J., A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A. J. Koster und W. Baumeister: *26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy*. *Journal of Structural Biology*, 121:19–29, 1998.
- [129] Saxberg, B. E. H. und W. O. Saxton: *Quantum noise in 2D projections and 3D reconstructions*. *Ultramicroscopy*, 6:85–90, 1981.
- [130] Traficante, D. D.: *Time averaging: Does the noise really average toward zero*. *Concepts in Magnetic Resonance*, 3:83–87, 1991.
- [131] Saxton, W. O. und W. Baumeister: *The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein*. *Journal of Microscopy*, 127:127–138, 1982.
- [132] Harauz, G. und M. van Heel: *Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction*. *Optik*, 73:146–156.
- [133] Heel, M. van und M. Schatz: *Fourier shell correlation threshold criteria*. *Journal of Structural Biology*, 151:250–262, 2005.
- [134] Rosenthal, P. B. und R. Henderson: *Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy*. *Journal of Molecular Biology*, 333:721–745, 2003.
- [135] Xiong, Q., M. K. Morphew, C. L. Schwartz, A. H. Hoenger und D. N. Mastronarde: *CTF determination and correction for low dose tomographic tilt series*. *Journal of Structural Biology*, 168:378–387, 2009.
- [136] Plattner, H. und J. Hentschel: *Zellbiologie*. Thieme, 2006.
- [137] Robinson, C. V., A. Sali und W. Baumeister: *The molecular sociology of the cell*. *Nature*, 450:973–982, 2007.
- [138] Philippsen, A., H. A. Engel und A. Engel: *The contrast-imaging function for tilted specimens*. *Ultramicroscopy*, 107:202–212, 2007.
- [139] Fernandez, J. J., J. R. Sanjurjo und J. M. Carazo: *A spectral estimation approach to contrast transfer function detection in electron microscopy*. *Ultramicroscopy*, 68:267–295, 1997.

- [140] Zanetti, G., J. D. Rices, S. D. Fuller und J. A. Briggs: *Contrast transfer function correction applied to cryo-electron tomography and sub-tomogram averaging*. Journal of Structural Biology, 168:305–312, 2009.
- [141] Heinz, C. und M. Niederweis: *Selective extraction and purification of a mycobacterial outer membrane protein*. Analytical Biochemistry, 285:113–120, 2000.
- [142] Heinz, C., E. Roth und M. Niederweis: *Purification of porins from Mycobacterium smegmatis*. Methods in Molecular Biology, 228:139–150, 2003.
- [143] Hoffmann, C.: *Strategies for cryo-electron tomography of the mycobacterial cell envelope and its pore proteins and functional studies of porin MspA from Mycobacterium smegmatis*. Dissertation, Technische Universität München, 2010.
- [144] Fischer, H., I. Polikarpov und A. F. Craievich: *Average protein density is a molecular-weight-dependent function*. Protein Science, 13:2825–2828, 2004.
- [145] Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng und T. E. Ferrin: *UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis*. Journal of Computational Chemistry, 25:1605–1612, 2004.
- [146] Mahfoud, M., S. Sukumaran, P. Hülsmann, K. Grieger und M. Niederweis: *Topology of the porin MspA in the outer membrane of Mycobacterium smegmatis*. The Journal of Biological Chemistry, 281:5908–5915, 2006.
- [147] Wang, L. und F. J. Sigworth: *Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy*. Nature, 461:292–295, 2009.
- [148] Raunser, S. und T. Walz: *Electron crystallography as a technique to study the structure on membrane proteins in a lipidic environment*. Annual Review of Biophysics, 38:89–105, 2009.
- [149] Fernandez, J. J., S. Li und R. A. Crowther: *CTF determination and correction in electron cryotomography*. Ultramicroscopy, 106:587–596, 2006.
- [150] Ortiz, J. O., F. Brandt, V. R. Matias, L. Sennels, J. Rappsilber, S. H. Scheres, M. Eibauer, F. U. Hartl und W. Baumeister: *Structure of hibernating ribosomes studied by cryoelectron tomography in vitro and in situ*. Journal of Cell Biology, 190:613–621, 2010.

## *Literaturverzeichnis*

- [151] Jensen, G. J. und R. D. Kornberg: *Defocus-gradient corrected back-projection*. Ultramicroscopy, 84:57–64, 2000.

# Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde von November 2007 bis August 2011 in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Ich möchte mich bei allen Arbeitskollegen herzlich für das gute Arbeitsklima bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Baumeister danke ich für die Möglichkeit, das ich diese Arbeit in seiner Abteilung unter hervorragenden Arbeitsbedingungen erstellen durfte. Stephan Nickell danke ich für seine Betreuung und die Freiheit, die er mir bei meiner Arbeit gegeben hat. Harald Engelhardt danke ich für seine Initiierung des MspA Projekts, für seinen tiefen Einstieg in die *CTF*-Korrektur, die hervorragende Zusammenarbeit und das genaue Korrekturlesen der MspA Kapitel. Christian Hoffmann danke ich dafür das er nicht aufgegeben hat, MspA in Liposomen zu rekonstituieren und für die freundschaftliche Zusammenarbeit während des MspA-Projekts. Alex Rigort danke ich für die Kryo-FIB Kippserie und ebenfalls für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Florian Beck danke ich für seine Hilfe bei der Subtomogrammalignierung und für die schöne Zeit bei Ausflügen ins Münchner Nachtleben. Jürgen Plitzko danke ich für seine Unterstützung, nicht nur der die sich durch einfaches Abzählen quantifizieren ließe. Inga Wolf danke ich für die schöne Zeit am Institut. Thomas Haller danke ich für seine Implementation der Subtomogrammalignierung. Reiner Hegerl danke ich für das Korrekturlesen des ersten Teils dieser Arbeit. Günther Pfeiffer danke ich für die schöne Zeit bei der Teerunde. Meiner Frau Tanja danke ich ganz herzlich für ihre Geduld und ihre Kraft und für ihr Zurückstehen bei dieser Arbeit. Bei meinen Kindern, Hannah und Jonas, möchte ich mich ganz herzlich für ihren Frohsinn bedanken. Aber vielmehr muss ich mich bei ihnen entschuldigen, das ich eine gefühlte Ewigkeit nicht für sie dasein konnte. Meinen Eltern kann ich gar nicht genug danken.