

Physik

Joachim Frank

Untersuchungen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen hoher Auflösung mit Bilddifferenz- und Rekonstruktionsverfahren

Joachim Frank

Untersuchungen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen hoher Auflösung mit Bilddifferenz- und Rekonstruktionsverfahren

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <https://portal.dnb.de> abrufbar.

Impressum

Korrigierte Neuausgabe

Copyright © 2019 der vorliegenden Ausgabe: TUM.University Press

Copyright © 2019 Joachim Frank

Copyright Abbildungen: Joachim Frank: soweit nicht anders vermerkt; Carol Saginaw: S. 180

Alle Rechte vorbehalten

Das vorliegende Werk folgt der alten deutschen Rechtschreibung der Originalfassung von 1970.
Die nachträglich zugefügten Vor- und Nachworte folgen der neuen deutschen Rechtschreibung.

Transkription: Tomas Mader

Layout und Gestaltung: TUM.University Press

Layoutrichtlinien der Umschlaggestaltung: Designbuero Josef Grillmeier Munich

Umschlaggestaltung: Caroline Ennemoser

Umschlagabbildung: Joachim Frank

TUM.University Press

Verlag der Technischen Universität München

Arcisstraße 21

80333 München

ISBN: 978-395884-021-8

DOI der digitalen Ausgabe: 10.14459/2019md1481676

DOI der Originalausgabe: 10.14459/1970md1442377

www.tum.de

Vorwort von Robert Huber

Das Jahrhundert des Sehens von Molekülen begann im Jahre 1912 mit den Röntgenbeugungsexperimenten an Kristallen durch Max von Laue an der Ludwig-Maximilians-Universität München, unmittelbar gefolgt von Strukturbestimmungen einfacher anorganischer Kristalle durch Vater und Sohn Bragg in Cambridge, Großbritannien. Die Methode wurde später von Max Perutz und anderen zur Analyse der dreidimensionalen atomaren Struktur von biologischen Molekülen weiterentwickelt. Sie hat mit Hilfe neuer Instrumente und Analysemethoden die Naturwissenschaften und die Medizin revolutioniert. Seit einem Jahrzehnt erleben wir, mit großem Staunen über die Geschwindigkeit des Fortschritts, eine zweite Revolution des Sehens von Molekülen mit Hilfe des Elektronenmikroskops, eigentlich ein seit langem bekanntes Instrument, dessen Prototyp Ernst Ruska 1931 in Berlin vorgestellt hat. Wieder waren neue technische Einrichtungen und Analysemethoden Voraussetzung für die revolutionäre Entwicklung und natürlich Forscher, die das Potential erkannten und nutzten.

Joachim Frank ist ein Beispiel dafür und der Nachdruck seiner Dissertation ist mir ein willkommener Anlass, seine bahnbrechende Forschung von ihrem Beginn (1970) bis zur finalen Anerkennung und Auszeichnung (Nobelpreis 2017) zu verfolgen und dabei einige Bemerkungen zu Walter Hoppe, dem Mentor seiner und meiner Promotion, einzuflechten.

Hoppe, Professor in Günter Scheibes Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie an der Technischen Hochschule, heute Technische Universität München (TUM), und später Direktor am Max-Planck-Institut für Biochemie, war unser beider Doktorvater, allerdings zu verschiedenen Zeiten. 1963 wurde meine Dissertation abgeschlossen, 1970 die Franks.

Ich hatte das Glück, bei meinem Studium der Chemie an der TUM für die Diplom- und Doktorarbeit in Walter Hoppe einen Mentor zu finden, dessen Forschungsgebiet meiner Faszination für Kristalle und meiner Vorliebe für physikalisch-mathematische Probleme der Chemie entsprach. Hoppe war ein außerordentlich vielseitiger Forscher und beschäftigte sich mit strukturchemischen Fragen, mit theoretischen Methoden der Röntgenkristallographie (seine Faltmolekülmethode, 1957 formuliert, ist heute unter dem Namen „Molecular Replacement“ die wichtigste Methode zur Lösung von Proteinkristallstrukturen geworden) und mit Elektronenmikroskopie. Er befasste sich sogar mit der Konstruktion von Instrumenten, wie einem mechanischen Fouriersynthetisator (zur Fouriertransformation, heute eine einfache Aufgabe für kleine moderne Laptops, zu jener Zeit aber ein formidables Datenverarbeitungsproblem), ein Densitometer für photographische Filme, die als Detektoren in der Röntgenkristallographie und Elektronenmikroskopie dienten, und ein Einkristalldiffraktometer, allesamt recht komplexe Ingenieuraufgaben, die er brillant meisterte.

Ich konnte in Hoppes Arbeitsgruppe selbstständig an der Kristallstrukturanalyse von Ecdyson, dem Verpuppungshormon von Insekten, zusammen mit Peter Karlson von der Universität München arbeiten und die Molekülstruktur des größten, schweratom-freien organischen Moleküls bestimmen, das ich mit den primitiven Methoden der Röntgenkristallographie zu jener Zeit (1963) analysierte. Dieser Erfolg erlaubte es mir, eine kleine Arbeitsgruppe für Proteinkristallographie einzurichten, die dann – nach der Inauguration des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried (MPIB) und meiner Berufung als Direktor (1972) – im Verlauf der Jahre Instrumente und Methoden für sehr große Proteinkristallstrukturen, wie Membranproteine (1985) und Proteinkomplexe (1995, 1997), oft von Bedeutung für die Pharmakologie, zur Verfügung hatte.

Einer glaubwürdigen Legende zufolge wird Hoppe mit der Aussage zitiert, dass die Röntgenkristallographie für ihn keine reizvolle Herausforderung mehr sei, die Elektronenmikroskopie dagegen solche in Fülle biete.

Hoppe, der Chemiker, war deshalb sicher glücklich über seinen Dissertanden Frank, der in seiner Diplomarbeit mit Elektronen zu tun gehabt hatte und als Physiker mit Mathematik vertraut war, sowie über dessen Themenwahl „Untersuchungen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen hoher Auflösung mit Bilddifferenz- und Rekonstruktionsverfahren“ – ein überaus mutiges Projekt zu einer Zeit, in der die nötige Rechen- und Graphik-Hardware und Software nur rudimentär vorhanden war. Seine Wanderjahre führten Frank über mehrere Stationen in weltbekannten Laboratorien in den USA und Europa 1973 für kurze Zeit zurück nach Martinsried, wo wir uns am eben inaugurierten MPIB begegneten. Er hat 1975 seine erste Forschergruppe im Wadsworth Center in Albany begründet und später als Howard Hughes Medical Institute Investigator (1998) und als Professor an der Columbia University (2008) das Thema „Einzelmolekülanalyse mit dem Elektronenmikroskop“ mit Hilfe von Bildverarbeitung und -überlagerung unter Verwendung moderner Instrumente und Datenverarbeitungsmöglichkeiten weiterverfolgt und vollendet. Ich zitiere die Pressemitteilung der Royal Swedish Academy of

Sciences zum Nobelpreis für Chemie 2017: „Joachim Frank [...] developed an image processing method in which the electron microscope’s fuzzy two-dimensional images are analysed and merged to reveal a sharp three-dimensional structure“. Die Verwandtschaft mit dem Thema seiner Doktorarbeit ist unübersehbar und dokumentiert Franks Beharrlichkeit in der Verfolgung eines Ziels, das ihn fasziniert, über Jahrzehnte hinweg. Natürlich benötigt ein Forscher für die Methodenentwicklung ein Präparat, das Fortschritt und Erfolg anzeigt. Frank wählte das Ribosom, von dem Röntgenkristallstrukturen bekannt sind und das damit ein ideales Objekt für die Validierung der neuen Methode ist, das aber auch eine neuartige und unerwartete Möglichkeit aufzeigt, die Dynamik eines Vielkomponentenkomplexes strukturell zu untersuchen, indem man die Zeit zwischen Agonist-/Antagonist-Zugabe, Einfrieren und Bildanalyse variiert. Weiter erlaubt die Elektronentomographie biologische Makromoleküle in situ, im zellulären Kontext abzubilden. Auch daran arbeiten Frank, Wolfgang Baumeister, mein Kollege am MPIB und andere.

Wir haben das Glück, eine Revolution des Sehens von biologischen Molekülen mit dem Elektronenmikroskop und neuen Möglichkeiten für Medizin und Pharmakologie zu erleben, insbesondere wenn wir die Synergie mit der Röntgenkristallographie nutzen. Diese liefert hochaufgelöste Strukturen im Komplex mit Liganden von Komponenten der Riesenmoleküle, für die wiederum die Elektronenmikroskopie besonders geeignet ist.

Etwas Wasser in den Wein der Begeisterung über die Flut von Veröffentlichungen von Strukturen biologischer Riesenmoleküle möchte ich zuletzt gießen. Es gibt noch viel zu tun – auch nach der Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2017 an Dubochet, Frank und Henderson für „developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution“. Wie viele Strukturbiologen, deren wichtigstes Werkzeug die Röntgenkristallographie ist, wurde auch ich kürzlich zum Amateur der Cryo-EM-Technik und lernte, dass sich die Proben auf dem EM-Grid, ein Ensemble von Einzelmolekülen, keineswegs in einer harmlosen Umgebung befinden und zur Dissoziation oder Deformierung neigen. Die Aussage „in solution“ in der Nobelpreisbegründung bedarf deshalb der Interpretation von Fall zu Fall. Mir erscheint sogar die Molekülumgebung in Proteinkristallen häufig nativer als auf dem EM-Grid zu sein. Insbesondere ist die Proteindichte in Kristallen vergleichbar derjenigen im zellulären Kontext. Vor allem aber wurde der Effekt der Kristallpackung an vielen tausend Beispielen Jahrzehnte lang untersucht. Man hat dabei gelernt, ihn bei der Interpretation der Strukturfunktion ins Kalkül zu ziehen.

Der Aspekt der Validierung der EM-Strukturen und ihrer Interpretation wird wohl im Fokus der Forschung stehen müssen.

Robert Huber, 2019

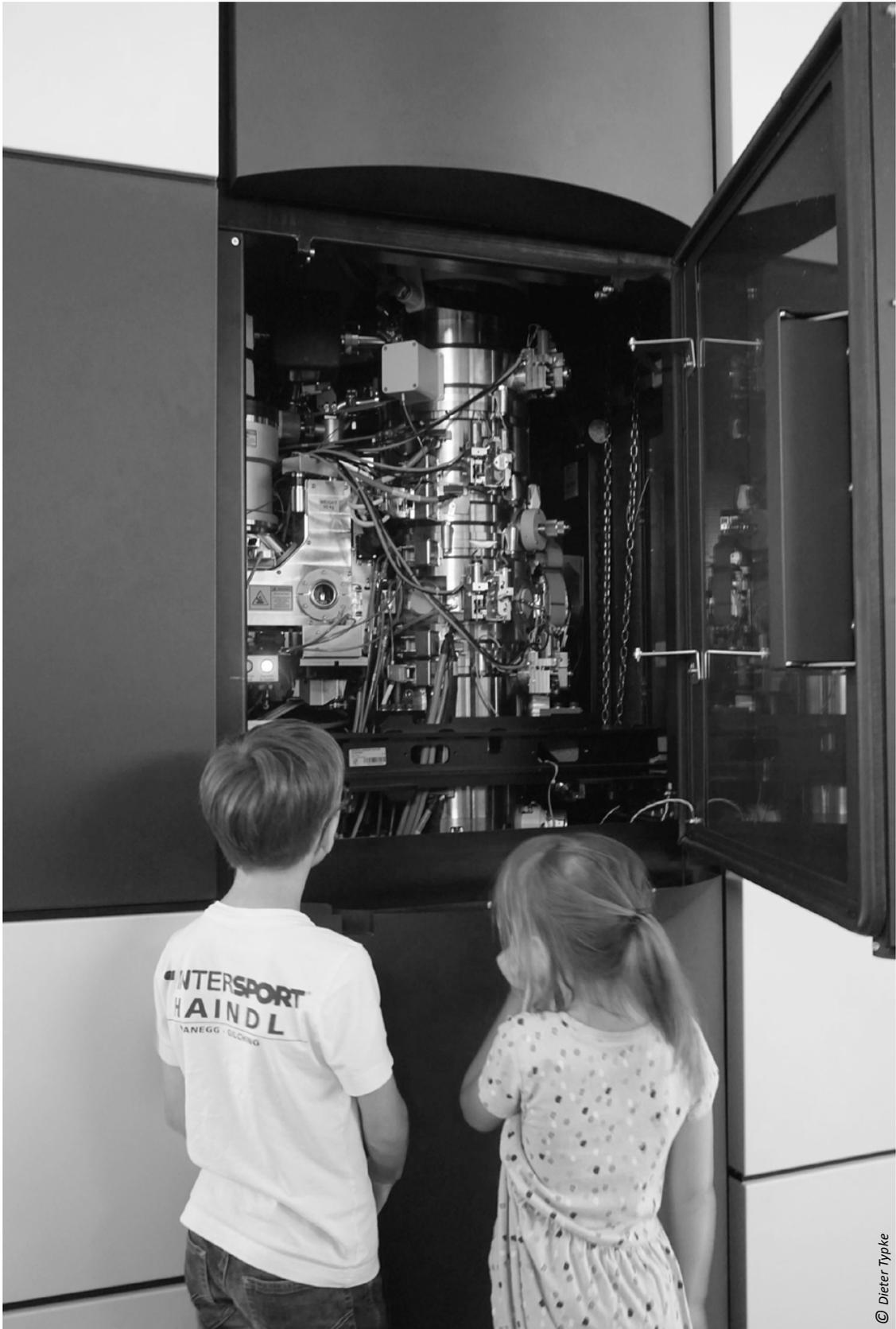


Bild 1: Zwei Betrachter vor einem modernen FEI-Krios-Elektronenmikroskop

Vorwort von Dieter Typke

Die hier nachgedruckte Doktorarbeit von Joachim Frank entstand in den ersten Jahren der heute so genannten dreidimensionalen Elektronenmikroskopie (3DEM), das heißt der biologischen Strukturforschung mit dem Elektronenmikroskop. Als Schüler von Walter Hoppe befasste sich Frank in der zweiten Hälfte der 1960er-Jahre ausführlich mit einigen der grundsätzlichen Fragen, die mit dieser Anwendung zusammenhängen. In seiner Dissertation diskutiert er – und erprobt an praktischen Beispielen – vor allem quantitative Verfahren für die Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Die Rechenmaschinen waren bereits so weit entwickelt und hatten genügend Speicherkapazität, dass man größere Bildbereiche bearbeiten konnte. Die Aufnahmen wurden mit einem im Institut entwickelten Photometer digitalisiert. Auch ein Laserdiffraktometer stand zur Auswertung der Aufnahmen zur Verfügung. An mathematischen Methoden untersuchte Frank insbesondere Korrelations- sowie Bildrekonstruktionsverfahren. Beides sind bis heute unverzichtbare Hilfsmittel der 3DEM. Die Arbeit ist noch heute lesenswert, auch zum Vergleich der damals verfügbaren mit den heutigen Hilfsmitteln.

Wenn heute ein Unbeteiligter ein Labor für elektronenmikroskopische Strukturforschung besucht und vor ein modernes Elektronenmikroskop geführt wird, wird er sich wundern: Er steht vor einem großen Metallschrank. Kein Mensch sitzt vor dem Gerät und macht eine Aufnahme nach der anderen, wie er sich das vielleicht vorgestellt hatte. Erst wenn man die Klappe öffnet, kann man einen Blick auf das Mikroskop selbst werfen (Bild 1). Wenn ein Präparat in das Mikroskop eingeführt ist, erfolgt das Sammeln der für die Strukturbestimmung erforderlichen Daten weitgehend automatisch. Dies geschieht noch immer in Form von Bildern; sie werden von einer modernen Kamera mit Festkörperchip registriert, und zwar mit einer Rate von mehr als hundert Bildern pro Sekunde. Vergleicht man dies mit einem Mikroskop aus den 1960er-Jahren (Bild 2), so kann man ermessen, was für eine Entwicklung die Strukturforschung in rund 50 Jahren genommen hat.

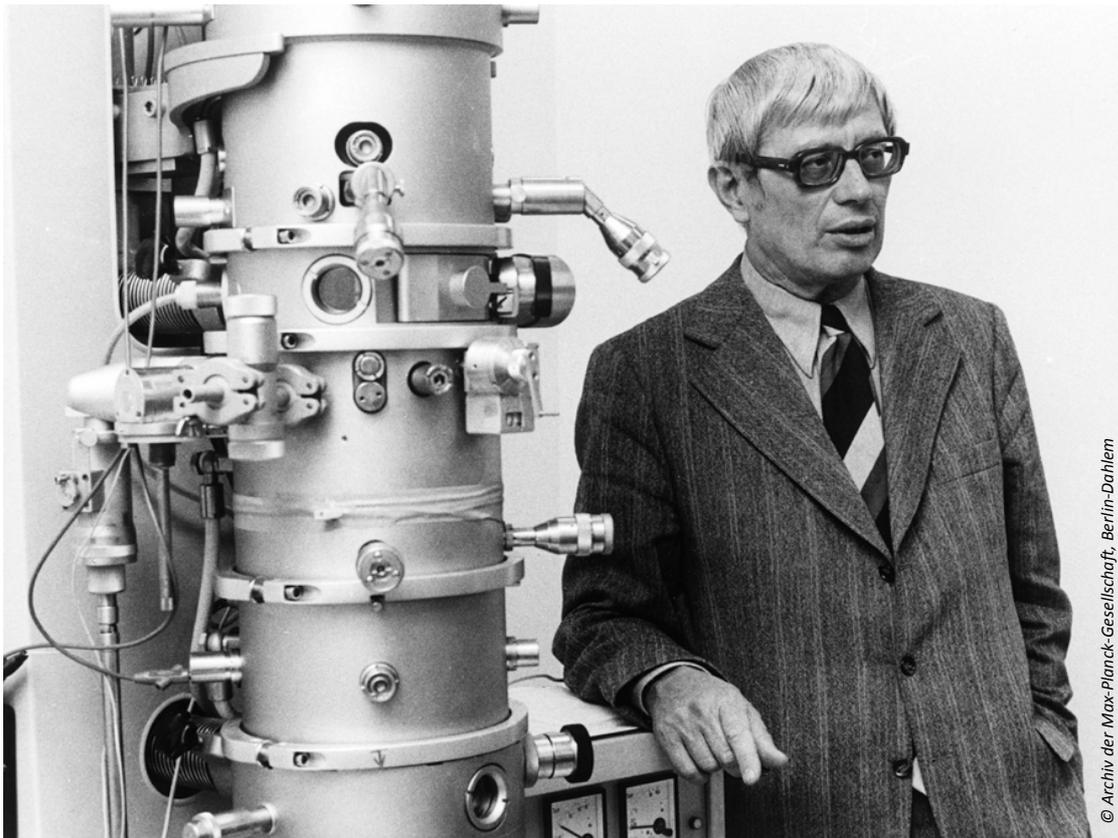


Bild 2: Walter Hoppe (1917–1986) vor einem Siemens Siemens-Elektronenmikroskop

Die Verleihung des Nobelpreises für Chemie an Richard Henderson, Joachim Frank und Jacques Dubochet für ihre wichtigen Beiträge zur biologischen Strukturforschung mit dem Elektronenmikroskop hat die öffentliche Aufmerksamkeit auf dieses Forschungsgebiet gelenkt. Erst seit wenigen Jahren wird auch bei Makromolekülen, die in Form von Einzelpartikeln vorliegen, eine Auflösung erreicht, die eine Deutung der dreidimensionalen atomaren Struktur ermöglicht. Die drei Preisträger waren während all der Jahre an der Weiterentwicklung der Methoden beteiligt. Über ihre Beiträge kann man sich gut über ihre in Englisch, aber auch in Deutsch erschienenen Nobelvorträge informieren [1–3].

Bei einer so komplexen Technik wie der 3DEM biologischer Strukturen waren es Entwicklungen in sehr verschiedenen Bereichen, die letztlich zum Erfolg führten. Dazu gehörte die Weiterentwicklung der Elektronenmikroskope, der rasche Fortschritt der Computertechnik, die Entwicklung geeigneter Software, Fortschritte in der Präparationstechnik und schließlich die Entwicklung von Detektoren mit Halbleiterchip. Letztere brachten den Durchbruch in der Auflösung bei Einzelpartikeln. Die leichten Bewegungen der Objekte und des sie umgebenden amorphen Eises aufgrund der durch die abbildenden Elektronen verursachten Strahlenschädigung konnten nachträglich durch Korrelationsverfahren aus den vielen Einzelbildern weitgehend eliminiert werden. Während das Eis selbst früher fast kontrastlos erschienen war, wurde nun auch die Eisstruktur sichtbar.

Es wäre sicher interessant einmal nachzuzählen, wie viele Studenten, Doktoranden und Wissenschaftler an der weltweiten Entwicklung der 3DEM beteiligt waren. Beschränkt man sich auf den engeren Bereich, so waren es vermutlich mehrere Tausend. Bezieht man den

weiteren Bereich der mit der 3DEM verbundenen technischen Entwicklungen ein, wird man auf mehrere Zehntausend Wissenschaftler und Techniker kommen.

Der Beginn dieser Entwicklung lag in den frühen 1960er-Jahren. Einige Wissenschaftler, die bis dahin Röntgenstrukturforschung betrieben hatten, begannen sich für Elektronenmikroskopie zu interessieren. So begannen Gruppen in München (Walter Hoppe), Cambridge (Aaron Klug) und Basel (Edward Kellenberger) mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen makromolekularer biologischer Strukturen. Elektronen haben bei der (damals) verwendeten Beschleunigungsspannung von 80 bis 100 kV eine sehr viel kürzere Wellenlänge als die üblicherweise verwendeten Röntgenstrahlen, was eine sehr hohe Auflösung ermöglichen sollte. Allerdings hatte der theoretische Physiker Otto Scherzer bereits 1936, also ziemlich am Anfang der Entwicklung des Elektronenmikroskops, gezeigt, dass der Öffnungsfehler von rotationssymmetrischen elektrostatischen wie magnetischen Elektronenlinsen nicht vermeidbar ist [4]. Dies schränkt, wie Scherzer 1949 [5] zeigte, die erreichbare Auflösung deutlich ein. In der gleichen Arbeit behandelte Scherzer auch den bei der Abbildung von Atomen zu erwartenden (Phasen-)Kontrast und bestimmte, für welchen Defokus der Kontrast optimal wird (Scherzer-Fokus).

Walter Hoppes Einstieg in die Elektronenmikroskopie war eine Methode zur Erhöhung der Auflösung. Sie bestand darin, die Bereiche der Objektivlinse, die mit falscher Phase zum Bild beitrugen, durch ein in die Brennebene des Objektivs eingesetztes, als Hoppe-Lenz-Platte bezeichnetes Element, auszublenden. Hoppes eigentliches Ziel war jedoch, ähnlich wie bei Klug oder Kellenberger, die Strukturuntersuchung biologischer Objekte. Hoppe heuerte mehrere Doktoranden an, die sich mit einschlägigen theoretischen wie praktischen Problemen befassten. Joachim Frank war einer dieser Doktoranden der ersten Stunde.

Während Frank nach seiner Doktorarbeit seine Karriere in den USA fortsetzte (für kurze Zeit arbeitete er zwischendurch noch einmal in Hoppes Abteilung) und sich auf die Untersuchung von Einzelpartikeln konzentrierte, widmete sich Hoppe selbst mit seiner Gruppe der Elektrentomographie, bei der aus einer Reihe von Aufnahmen desselben Objekts, das im Mikroskop gekippt wird, die dreidimensionale Struktur bestimmt wird. Dieser Bereich der 3DEM wurde bei der Verleihung des Nobelpreises nicht explizit gewürdigt. Er hat sich aber ebenfalls erfolgreich entwickelt und kann beispielsweise auf ganze (nicht zu große) Bakterienzellen oder Randbereiche größerer Zellen angewendet werden. Ob auch damit atomare Auflösung erreicht werden kann, steht dahin. Mit den modernen Detektoren (und sehr präzisen Goniometern) ist es jedenfalls heute möglich, vollständige Kippserien innerhalb sehr kurzer Zeit (z.B. einer Sekunde) aufzuzeichnen und die Strahlschädigung sehr klein zu halten.

In seiner 1949er-Arbeit [5] hatte Scherzer auch einen Vorschlag gemacht, wie der Öffnungsfehler mithilfe einer dünnen, in den Strahlengang eingesetzten Folie korrigiert werden kann. Von da an bis zu seinem Tod im Jahr 1982 war die Öffnungsfehler- und Farbfehler-Korrektur ein wichtiges Anliegen für ihn. Um dieses Ziel zu erreichen, beschäftigte er eine ganze Reihe von Schülern und Mitarbeitern mit theoretischen und experimentellen Arbeiten. Allerdings waren erst Anfang der 1990er-Jahre sein Schüler Harald Rose (Theorie) und dessen Schüler Max Haider (experimentelle Arbeiten) mit ihren Mitarbeitern erfolgreich [6–8]. Inzwischen haben korrigierte Mikroskope auch Einzug in die 3DEM gehalten [9].

Dieter Typke, 2019

Literatur:

[1a] R. Henderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 10804–10825; From Electron Crystallography to Single Particle CryoEM (Nobel Lecture).

[1b] R. Henderson, *Angew. Chem.* 130 (2018) 10966–10989; Von der Elektronen-Kristallographie zur Einzelpartikel-KryoEM (Nobel-Aufsatz).

[2a] J. Frank, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 10826–10841; Single-Particle Reconstruction of Biological Molecules – Story in a Sample (Nobel Lecture).

[2b] J. Frank, *Angew. Chem.* 130 (2018) 10990–11006; Einzelpartikel-Rekonstruktion biologischer Moleküle – Geschichte in einer Probe (Nobel-Aufsatz).

[3a] J. Dubochet, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 10842–10846; On the Development of Electron Cryo-Microscopy (Nobel Lecture).

[3b] J. Dubochet, *Angew. Chem.* 130 (2018) 11008–11013; Zur Entwicklung der Elektronen-Kryomikroskopie (Nobel-Aufsatz).

[4] O. Scherzer, *Z. Physik* 101 (1936) 593–603; Über einige Fehler von Elektronenlinsen.

[5] O. Scherzer, *J. Applied Physics* 20 (1949) 20; The Theoretical Resolution Limit of the Electron Microscope.

[6] H. Rose, *Optik* 53 (1978) 241; A hexapole spherical aberration corrector.

[7] H. Rose, *Nucl. Instr. and Meth.* 187 (1981) 187–199; Correction of aperture aberrations in magnetic systems with threefold symmetry.

[8] M. Haider et al., *Ultramicroscopy* 75 (1998) 53–60; A spherical-aberration-corrected 200 kV transmission electron microscope.

[9] X. Fan, L. Zhao, C. Liu, J.-C. Zhang, K. Fan, X. Yan, H.-L. Peng, J. Lei, and H.-W. Wang, *Structure* 25 (2017) 1623–1630. Near-atomic resolution structure determination in over-focus with Volta phase plate by Cs-corrected cryo-EM.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Abteilung Röntgenstrukturforschung ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Hoppe, für seine Anregung zu dieser Arbeit und für zahlreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Langer möchte ich für viele klärende Gespräche und praktische Hinweise ganz besonders danken.

Die ausgewerteten Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Langer und Herrn Dr. Feltynowski, die Aufnahme des Murein-Sacculus von Frau Formanek freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ihnen danke ich für die Überlassung der Aufnahmen und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Brodherr und Herrn Steigemann für die Unterstützung bei der Organisation der Datenübertragung danken. Die ersten Ergebnisse des Bildrekonstruktionsverfahrens wären nicht möglich gewesen ohne die Entwicklung des Least-Square-Programms durch Herrn Bußler, dem ich auch an dieser Stelle danken möchte.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes, der Max-Planck-Gesellschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für ihre großzügige finanzielle Hilfe zu großem Dank verpflichtet.

Joachim Frank, 1970

Inhalt

Vorwort von Robert Huber.....	V
Vorwort von Dieter Typke	IX
Danksagung	XV
Kapitel 1	
Einleitung.....	1
1.1. Kohärente Hellfeldabbildung schwacher Phasenobjekte.....	1
1.2. Der Abbildungsprozess in übertragungstheoretischer Darstellung.....	4
1.3. Die Eigenschaften der Phasenkontrast- übertragungsfunktion	5
1.4. Bestimmung der Kontrastzonen im Lichtdiffraktometer.....	6
1.5. Zur Elektronenstatistik	7
1.6. Die Eigenschaften der Photoplatte bei Elektronenbestrahlung.....	8
1.7. Additivität des Rauschens	10
Kapitel 2	
Photometrische Messung.....	11
2.1. Das Photometer	11
2.2. Beschreibung der Photometermessung.....	13
2.3. Der Übergang zur diskontinuierlichen Schwärzungsverteilung.....	15
2.4. Bildbereichsbegrenzung	17
2.5. Zur Darstellung der Schwärzungsverteilung.....	20
Kapitel 3	
Differenzanalyse	23
3.1. Der Gedanke des Bilddifferenzverfahrens	23
3.1.1. Die Frage der Skalierung.....	26
3.1.2. Fehler in der Bestimmung des Differenzbildes	28
3.2. Anwendungen auf die Untersuchung von Strukturänderungen	28
3.3. Experimentelle Bedingungen	29

Kapitel 4

Korrelationsanalyse und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie..... 31

4.1.	Definition der Korrelationsfunktion	31
4.2.	Anwendungen	37
4.2.1.	Anwendung der Korrelationsanalyse für das Bilddifferenzverfahren	37
4.2.2.	Laterale Zuordnung von Aufnahmen einer Defokus-Serie.....	45
4.2.3.	Anwendung für die Beurteilung der Auflösung	48
4.3.	Bestimmung der Korrelationsintegrale	51
4.3.1.	Unterschiede zwischen errechneten und definierten Korrelationsfunktionen	54
4.3.2.	Positionsbestimmung.....	55
4.4.	AKF und KKF im Falle einer keilförmigen Schwärzungsverteilung.....	58
4.5.	Beschreibung der Rechenprogramme für die Ausführung der Bilddifferenzanalyse	62

Kapitel 5

Korrelationsexperimente mit Hilfe des lichtoptischen Diffraktometers..... 67

5.1.	Beschreibung des Experiments	67
5.2.	Verschiebungsexperimente mit Aufnahmen gleicher Defokussierung	68
5.3.	Beziehung zu den Korrelationsfunktionen	70
5.4.	Beobachtbarkeit der Streifen	72
5.5.	Zur Ausführung der Experimente.....	73
5.6.	Laterale Zuordnung von Aufnahmen	74
5.7.	Bestimmung der elektronenoptischen Übertragungsgrenze.....	75
5.8.	Weitere Anwendungen	78
5.9.	Verschiebungsexperimente mit Aufnahmen verschiedener Defokussierung	78

Kapitel 6

Nachweis von Drifterscheinungen im Diffraktogramm 85 |

6.1.	Theorie	86
6.2.	Spezielle Bewegungen.....	86
6.2.1.	Sprungdrift.....	87
6.2.2.	Drift mit konstanter Geschwindigkeit	90
6.2.3.	Periodische Bewegung.....	92

Kapitel 7	
Bildrekonstruktionsverfahren.....	95
7.1. Allgemeine Formulierung des Problems.....	95
7.2. Anwendung des Rekonstruktionsverfahrens in der Elektronenmikroskopie.....	99
7.3. Gesichtspunkte für die Wahl einer Filterfunktion.....	102
7.4. Der Auflösungsgewinn im Scherzer-Gebiet.....	105
7.5. Eigenschaften des verwendeten Filters.....	107
7.6. Bestimmung der Übertragungsfunktion	112
7.7. Beschreibung des Rechenprogramms.....	114
 Kapitel 8	
Ergebnisse	117
8.1. Rekonstruktion.....	117
8.1.1. Murein-Sacculus von Spirillum serpens (Daten s. Tab. 2).....	117
8.2. Bilddifferenzanalyse und Rekonstruktion des Differenzbilds	119
8.2.1. Ein Testversuch ohne Objekt	120
8.2.2. Kohlefolie (Daten s. Tab. 4)	121
8.2.3. Graphitfolie.....	125
 Kapitel 9	
Zusammenfassung.....	127
 Anhang.....	A1
Literaturverzeichnis	155
Nachwort von Joachim Frank.....	159
Über den Autor.....	163

Kapitel 1

Einleitung

Bei der Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen stand bisher die visuelle Analyse im Vordergrund. Die Fähigkeit des Auges zur Gestaltwahrnehmung und Invariantenbildung wird nicht durch Rechenmethoden ersetzt werden können. Andererseits gibt es viele Probleme, die sich nur durch quantitative Auswertung behandeln lassen.

Die vorliegende Arbeit diskutiert die Anwendung von quantitativen Verfahren bei der Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen hoher Auflösung. Die Entwicklung schneller Rechenmaschinen mit großem Kernspeicher ermöglicht es erstmals, Bildverteilungen mit großem Informationsinhalt nahezu unverfälscht zu repräsentieren.

Quantitative Bildauswertungen wurden bereits bei einer niedrigen Auflösung (20 Å) für die räumliche Rekonstruktion von biologischen Präparaten mit helicaler Symmetrie eingesetzt^{1,2}.

Während die apparative Verbesserung des konventionellen Mikroskops mit der Entwicklung des Ruska-Rieckeschen Geräts³ einen gewissen Abschluß erreicht hat und der wirkungsvolle Einsatz von Zonenplatten⁴ durch Justierprobleme stark behindert wird, ist die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen vermittelte Information bisher nur zum Teil ausgenutzt worden. Daß hier eine „Auflösungsreserve“ vorliegt, zeigen die Rechnungen von Langer und Hoppe^{5,6,7} für die Abbildung mit Zonenplatten: Bereits schon die Ablendung der Aperturzonon mit falscher Phase bringt einen deutlichen Gewinn. Umso mehr sollte man bei phasenrichtiger Zuordnung dieser Zonen oder bei Anwendung von Rekonstruktionsverfahren eine Steigerung der Punktauflösung erwarten.

Die Ausführung einer nachträglichen „Bildrekonstruktion“ und das Problem der Trennung von Trägerfolien- und Objektstruktur sind die Hauptthemen der Arbeit. Außerdem wird gezeigt, welche Möglichkeiten durch die Einführung von Korrelationsverfahren in die Elektronenmikroskopie gegeben sind. Das Schwergewicht wird auf der Darstellung der Methoden liegen.

Teile der Arbeit sind bereits vorveröffentlicht, da sie zu aktuellen Fragen einige Beiträge leisten konnten^{8,9,10,11}.

1.1. Kohärente Hellfeldabbildung schwacher Phasenobjekte

Bei der elektronenmikroskopischen Abbildung entsteht ein Bild der Projektion der Ladungs- bzw. Potentialverteilung des Objekts in Primärstrahlrichtung. Nehmen wir an, daß die Primärwelle (Amplitude A) in z -Richtung auffällt, $k_o = (0, 0, k_z)$, so erhält man in der Bildebene die von der elastischen Streuung herrührende Amplitudenverteilung

$$\Psi_s(\vec{r}) = Ae^{ik_z z} \cdot i\lambda \iint_{Ap} F^Z(\vec{h}) e^{2\pi i(\vec{h}\vec{r})} e^{-i\gamma(\vec{h})} d\vec{h}, \quad (1)$$

λ Elektronenwellenlänge.

$\vec{h} = (x^*, y^*)$ kann, abgesehen von einem Maßstabsfaktor, als Vektor in der Objektivaperturbene aufgefaßt werden. Die Integration geht über die Apertur (abgekürzt als „Ap“).

$$F^Z(x^*, y^*) = F(x^*, y^*, \frac{1}{2}(x^{*2} + y^{*2})) \approx F(x^*, y^*, 0) \quad (2)$$

ist angenähert die elastische Streuamplitude für kleine Streuwinkel.

In $\gamma(x^*, y^*)$ ist die Phasenverschiebung durch den Öffnungsfehler und den axialen Astigmatismus in der Objektivlinse zusammengefaßt mit einem gemeinsamen Defokussierungsterm¹²:

$$\gamma(x^*, y^*) = \gamma(\vartheta, \varphi) = -\frac{\pi}{\lambda} \left(\Delta f + \frac{1}{2} \Delta f_A \sin 2\varphi \right) \vartheta^2 + \frac{\pi}{2\lambda} C_0 \vartheta^4, \quad (3)$$

C_0 Öffnungsfehlerkonstante,

Δf Defokussierung,

Δf_A Fokusedifferenz des axialen Astigmatismus,

mit den Winkelkoordinaten $\vartheta^2 = \lambda^2(x^{*2} + y^{*2})$,

$$\varphi = \arctg\left(\frac{y^*}{x^*}\right).$$

Diese Darstellung ist nur richtig für genügend dünne Objekte (vgl. ¹³).

$F^Z(x^*, y^*)$ setzt sich zusammen aus den einzelnen Beiträgen der (längs der z-Richtung) projizierten Atome:

$$F^Z(x^*, y^*) = \sum_j f_j(x^*, y^*) e^{-2\pi i(x^* x_j + y^* y_j)}, \quad (4)$$

f_j Atomformfaktor für Elektronen

und ist für ein nicht-kristallines Objekt eine kontinuierliche Funktion der reziproken Koordinaten.

F^z ist darstellbar als Fouriertransformierte einer ebenen Potentialverteilung, der Projektion einer räumlichen Potentialverteilung des Objekts:

$$F^z(\vec{h}) = \iint \rho^z(\vec{r}) e^{2\pi i(\vec{h}\vec{r})} d\vec{r}^* \quad (5)$$

Nach dem Friedelschen Satz ist ρ^z eine reelle Funktion, wenn die f_j in (4) reell sind. Das ist bei Elektronen noch der Fall für Atome mit niedriger Ordnungszahl.

Primärwelle $\Psi_0 = Ae^{ik_z z}$ und kohärente Streuwelle interferieren und geben in der Bildebene die Intensität

$$I = \Psi\Psi^* = (\Psi_0 + \Psi_S)(\Psi_0 + \Psi_S)^* = A^2 + 2A\text{Re}(\Psi_S e^{-ik_z z}) + \Psi_S\Psi_S^* \quad (6)$$

Wir nehmen an $|\Psi_S| \ll |\Psi_0|$, d.h. schwach streuende Objekte:

$$I = \Psi\Psi^* = A^2 \left[1 - 2\lambda \text{Im} \left\{ \iint F^z(\vec{h}) e^{2\pi i(\vec{h}\vec{r})} e^{-i\gamma(\vec{h})} d\vec{h} \right\} \right] \quad (7)$$

oder, wegen der Gültigkeit des Friedelschen Satzes,

$$I = A^2 \left[1 + 2\lambda \iint F^z(\vec{h}) \sin \gamma(\vec{h}) e^{2\pi i(\vec{h}\vec{r})} d\vec{h} \right] \quad (8)$$

Danach kommt bei elastischer Streuung ein Kontrast in der Bildebene nur zustande durch die Linsenfehler und den Defokussierungsterm.

Eine ideale Abbildung würde mit $\sin \gamma \equiv 1$ nach (5) wieder die ebene Potentialverteilung bzw. Ladungsverteilung als Intensitätsverteilung entstehen lassen. Dies entspräche einer gemeinsamen Phasenverschiebung aller Streuwellen um $\frac{\pi}{2}$ in der Aperturebene, also insgesamt einer Phasenverschiebung von π gegenüber der Primärwelle.

Wir sehen die Analogie zur Phasenkontrastabbildung in der Lichtoptik^{14,15}: Infolge der Phasenverschiebung der elastisch gestreuten Wellen um $\frac{\pi}{2}$ erzeugt die Potentialverteilung $\rho^z(\vec{r})$ eine Phasenmodulation, die erst durch den „Eingriff“ der Linsenfehler in eine Amplituden- bzw. Intensitätsmodulation umgesetzt wird. Deshalb wird ρ^z auch Phasenverteilung oder Phasenstruktur genannt.^{*)}

*) Wir wählen ρ^z zur Bezeichnung der Potentialverteilung, um auf die Ähnlichkeit der Formulierung des Streuvorgangs in der Röntgenstrukturanalyse hinzuweisen.

[†] $S(\vec{h}) = \sin \gamma$ wird mitunter als Phasenkontrast- oder Phasenmodulations-Übertragungsfunktion bezeichnet¹⁸

Wir können diese Funktion aber auch, in der Terminologie der Röntgenstrukturanalyse, als modifizierende Funktion¹⁶ auffassen, die - bei dünnen Objekten - für alle Atome gleich ist und deshalb als Faktor der Strukturamplitude auftritt (vgl. ¹⁷):

$$F^{z'}(\vec{h}) = \sum_j f_j(\vec{h}) S(\vec{h}) e^{-2\pi i(\vec{h}\vec{r}_j)} = S(\vec{h}) F^z(\vec{h}). \quad (4')$$

Während die Modifizierung in der Röntgenstrukturanalyse nachträglich erfolgt, entsteht sie hier im Gerät zwangsläufig, und die Messung unmodifizierter Strukturamplituden ist grundsätzlich nicht möglich.

Die Voraussetzungen des dünnen schwachen Phasenstreuers sind für viele biologische Präparate in guter Näherung erfüllt.

1.2. Der Abbildungsprozess in übertragungstheoretischer Darstellung

Nehmen wir an, daß sich die Bildverteilung $b(\vec{r})$ durch lineare Superposition aus der Objektverteilung $o(\vec{r}')$ ergibt, so können wir die lineare Übertragungstheorie zur Beschreibung der Abbildung verwenden:

$$b(\vec{r}) = \iint o(\vec{r}') s(\vec{r}, \vec{r}') d\vec{r}'. \quad (9)$$

$s(\vec{r}, \vec{r}')$ ist als Greensche Funktion interpretierbar, sie läßt sich deuten als Bildverteilung bei einem punktförmigen Objekt in $\vec{r} = \vec{r}_p$:

$$o(\vec{r}) = \delta(\vec{r} - \vec{r}_p), \quad (10)$$

$$\iint \delta(\vec{r}' - \vec{r}_p) s(\vec{r}, \vec{r}') d\vec{r}' = s(\vec{r}, \vec{r}_p). \quad (11)$$

Ist die Abbildung isoplanatisch, so ist diese Bildpunktfunktion nur noch abhängig von den Differenzen der Vektoren \vec{r}, \vec{r}_p , und aus (9) wird ein Faltungsintegral

$$b(\vec{r}) = \iint o(\vec{r}') s(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}' \stackrel{\text{def}}{=} o(\vec{r}) \widehat{s(\vec{r})}. \quad (12)$$

Unter Einführung der Fouriertransformierten

$$\begin{aligned}
 F\{b\} &= B(\vec{h}), \\
 F\{o\} &= O(\vec{h}), \\
 F\{s\} &= S(\vec{h}) \quad (\text{Übertragungsfunktion})
 \end{aligned}
 \tag{13}$$

erhält man nach dem Faltungstheorem aus (12) die äquivalente Fourierdarstellung

$$B(\vec{h}) = O(\vec{h}) \cdot S(\vec{h}).
 \tag{14}$$

Bei kohärenter Hellfeldabbildung dünner schwacher Phasenobjekte ist nach Abschn. 1.1. die Beschreibung (12) möglich, wenn wir unter der Objektverteilung $o(\vec{r})$ die „Phasenstruktur“ $\rho^z(\vec{r})$, unter $b(\vec{r})$ die Intensitätsabweichung $\Delta I(\vec{r})$ vom Mittelwert I_o verstehen.

In dieser Interpretation ist die Funktion $S(\vec{h})$ zu identifizieren mit dem negativen Imaginärteil der Pupillenfunktion $e^{-i\gamma}$ in (7).

Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, daß auch bei partiell kohärenter Beleuchtung eine Übertragungsfunktion definiert werden kann⁹⁰.

1.3. Die Eigenschaften der Phasenkontrastübertragungsfunktion

Kontrastverhältnisse und Verlauf der Übertragungsfunktion werden verständlich durch ein Zeigerdiagramm (Abb. 1). Die Phase der elastisch gestreuten, gegenüber der Primärwelle um $\frac{\pi}{2}$ verschobene Streuwelle wird in der Aperturebene zusätzlich um γ gedreht. Maximaler positiver bzw. negativer Kontrast tritt auf, wenn die Phase der Streuwelle um $\pm \frac{\pi}{2}$ gedreht wird:

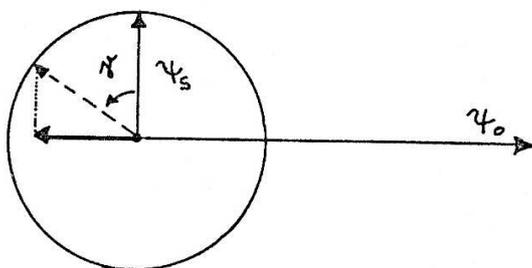


Abbildung 1: Zeigerdiagramm zur Kontrastentstehung

$$\gamma + \frac{\pi}{2} = n\pi \text{ bzw. } \sin \gamma = \pm 1. \quad (15)$$

Der Kontrast verschwindet dagegen für

$$\gamma = n\pi \text{ bzw. } \sin \gamma = 0. \quad (16)$$

Aus (15) und (3) ergibt sich für die Defokussierungsabhängigkeit der Zonen mit Maximalkontrast

$$M = \left\{ \frac{\Delta f_E}{c_0} \pm \left[\left(\frac{\Delta f_E}{c_0} \right)^2 + \frac{(2n-1)}{c_0} \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}}; \Delta f_E \stackrel{\text{def}}{=} \Delta f + \frac{1}{2} \Delta f_A \sin 2\varphi. \quad (17)$$

Thon hat diese Beziehung für Defokussierungsserien von Kohlefolienaufnahmen durch Ausmessung der lichtoptischen Diffraktogramme bestätigen können¹⁹.

1.4. Bestimmung der Kontrastzonen im Lichtdiffraktometer

Das Lichtdiffraktometer ist eine kohärente Fraunhofersche Beugungsanordnung, die das Ortsfrequenzspektrum einer Schwärzungsverteilung zu beobachten gestattet.

Für eine Schwärzungsabweichung $\Delta d(\vec{r})$ von einem Mittelwert $d_0 = \overline{d(\vec{r})}$ ist die Transparenzverteilung hinter einer Fotoplatte angenähert

$$t(\vec{r}) = e^{-2,3d_0} \cdot e^{-2,3\Delta d(\vec{r})} \approx e^{-2,3d_0} (1 - 2,3\Delta d(\vec{r})); \quad (18)$$

ihre Abweichungen vom Mittelwert $\overline{t(\vec{r})}$ sind also proportional zu $\Delta d(\vec{r})$. Da die lokalen Schwärzungsschwankungen selbst proportional den Elektronen-Intensitätsschwankungen im Hellfeld sind (s. Abschn. 1.6.), wird die Intensität im Diffraktogramm einer elektronenmikroskopischen Aufnahme nach (8) proportional zu $|F^z|^2 \sin^2 \gamma(\vec{h})$.

Hat das Objekt einen amorphen Aufbau, so ist $|F^z|$ ungefähr konstant in dem für uns interessanten Aperturbereich ($\vartheta \leq 1,0 \cdot 10^{-2}$ rad), und die Minima und Maxima der Funktion $\sin^2 \gamma$ werden beobachtbar. Aus der Lage dieser Zonen errechnen sich wegen (17) die elektronenoptischen Parameter. Bereits eine qualitative Beobachtung der Kontrastzonenanordnung gibt Aufschluß darüber, ob die Aufnahme für eine weitere Auswertung geeignet ist.

Als Testobjekt wird gewöhnlich eine dünne amorphe Kohlefolie verwendet. Ein ideales statistisch streuendes Objekt mit $|F^2| = \text{const.}$ ist aus verschiedenen Gründen nicht realisierbar:

Einmal wegen des Abfalls des Atomformfaktors für wachsende Streuwinkel. Er beträgt z.B. bei Kohlenstoff 20% innerhalb der Apertur ($\vartheta_{ap} \approx 1 \cdot 10^{-2}$ rad).

Eine andere Ursache liegt in dem Bestehen einer Nahordnung in amorphen Strukturen²⁰.

Auf eine genaue Beschreibung der verwendeten Beugungsanordnung soll hier verzichtet werden. Sie entspricht dem üblichen Aufbau (s. z.B. ²¹). Es sollen nur die wichtigsten Daten angegeben werden:

Lichtquelle (Fa. Spectra-Physics): He – Ne – Laser, $\lambda_L = 630$ nm, Leistung 7 mW

Modenblende \varnothing 6,8 μm

Teleskoplinse (Fa. Spectra-Physics): Brennweite 182 mm, Öffnung 50 mm

Feldlinse: Brennweite 500 mm, Öffnung 60 mm

Nachvergrößerung des Beugungsbildes 3,5 x

Kamera Leica

Kleinbildfilm KB14

Zur Eichung diente ein Kupfer-Netz mit einer Gitterkonstanten von 130 μm .

1.5. Zur Elektronenstatistik

Für die Zahl der auf eine gegebene Fläche F aufgefallenen Elektronen n gilt die Poisson-Statistik

$$p(n = K) = \frac{K^K e^{-K}}{K!} \quad (19)$$

mit dem Mittelwert \bar{K} , der mittleren quadratischen Schwankung

$$\sigma^2 = \Delta \bar{K}^2 = \overline{K^2} - \bar{K}^2 = \bar{K} \quad (20)$$

und dem mittleren Fehler $\sigma = \sqrt{\bar{K}}$.

Das Signal/Rauschverhältnis $\frac{\bar{K}}{\sigma}$ wächst also mit der Wurzel aus der Elektronenintensität

$$I = \frac{\bar{K}}{T}, \quad (21)$$

T Belichtungszeit.

Von diesen Beziehungen gehen die Abschätzungen aus, welche Elektronenintensität für einen signifikanten Kontrastnachweis nötig ist.

Wir verwenden für die Kontrastdefinition

$$C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \approx \frac{\Delta I}{2 \cdot I} . \quad (22)$$

Soll ein Kontrast C noch signifikant nachgewiesen werden, und wird als „signifikant“ eine Abweichung von mindestens 3σ gefordert, so erhalten wir aus (20, 21, 22)

$$\frac{\Delta \bar{K}}{2\bar{K}} \geq \frac{3}{2\sqrt{\bar{K}}}; \quad \bar{K} \geq \frac{12}{C^2} . \quad (23)$$

Um danach den Kontrast von 10% nachzuweisen, benötigen wir $\bar{K} \geq \frac{12}{(0,1)^2} = 1\,200$ Elektronen.

Eine solche Abschätzung berücksichtigt aber noch nicht, ob die erforderliche Anzahl überhaupt von der Emulsion registriert werden kann. Für die Auswertung ist es wichtig, daß die Schwärzung noch im Proportionalbereich (etwa $d < 1,2$, s. Abschn. 1.6) liegt. Die übliche Vergrößerung $V_{elopt} = 180\,000$ setzt eine enge Grenze:

Bei den verwendeten Photomaterialien erzeugt 1 Elektron pro μm^2 bereits eine Schwärzung $d = 1^{22}$. Für die Abbildung eines Atoms von 2 \AA Durchmesser stehen bei der angegebenen Vergrößerung nur $\bar{K} = (1 \cdot 1,8 \cdot 10^5 \cdot 10^{-4})^2 \cdot 3,14 = 1\,000$ Elektronen zur Verfügung.

Diese Zahl reicht nach (23) nicht einmal aus, wenn der Kontrast theoretisch 10% betragen sollte. Da der Kontrast in Hell- und Dunkelfeld für ein einzelnes Atom in günstigen Fällen zwischen 5% und 8% liegt¹³, ist ein Nachweis in dem bisherigen Vergrößerungsbereich nicht möglich.

Für Details an der bisherigen Auflösungsgrenze (3 \AA) erhält man $K = 2\,250$ Elektronen, die den Nachweis eines Kontrasts von etwa 5% zulassen.

1.6. Die Eigenschaften der Photoplatte bei Elektronenbestrahlung

Die Korndichtevertelung in der entwickelten Emulsion kann durch die Messung der Transparenz $t(\vec{r})$ charakterisiert werden:

$$t(\vec{r}) = \frac{I_L(\vec{r})}{I_{oL}} . \quad (24)$$

$I_{oL}, I_L(\vec{r})$ sind die Intensitäten des auffallenden bzw. des durchgelassenen Lichts.

Man definiert die Schwärzung durch

$$d(\vec{r}) = -\log_{10} t(\vec{r}) . \quad (25)$$

Aus dem umfangreichen Material über die Registrierung von Elektronen im interessierenden Energiebereich^{22,23,24,25,26,27} sollen nur die wichtigsten Ergebnisse erwähnt werden:

Die Schwärzung ist in einem großen Bereich ($d < 1,2$) proportional der Elektronenzahl \bar{K}

$$d \sim \bar{K} . \quad (26)$$

1. Für Elektronen gibt es keinen Schwellenwert: jedes getroffene Korn wird entwickelbar.
2. Ein Primärelektron macht eine ganze Anzahl von Körnern (zwischen 10 und 80) entwickelbar, erzeugt also einen Kornhaufen.
3. Durch Sekundärelektronen bildet sich um kleine bestrahlte Stellen ein Diffusionshof aus.
4. Wegen (26) und (20) gibt

$$\overline{\Delta d^2} \sim d . \quad (27)$$

Kornhaufen und Diffusionshofbildung bewirken, daß die Schwärzung innerhalb kleiner Nachbarbereiche korreliert ist; Korrelationsmessungen zeigen, daß diese Distanz zwischen 10 und 20 μm liegt²⁵. Dem derzeitigen elektronenmikroskopischen Auflösungsvermögen entspricht bei einer 180 000-fachen Vergrößerung eine Fläche von 55 μm Durchmesser („Auflösungsfläche“), deshalb wirken diese Effekte nicht auflösungsbegrenzend in der Höchstauflösungselektronenmikroskopie.

Infolge der statistischen Verteilung der Körper und Kornhaufen sind die meßbaren Schwärzungsschwankungen stark abhängig von der Größe der Meßfläche. Diese Abhängigkeit wird beschrieben durch²⁸

$$\overline{\Delta d^2} \sim \frac{1}{F}. \quad (28)$$

Bei einer Meßfläche, die klein ist gegen die „Auflösungsfläche“ (s.o.), können wir deshalb nicht mehr erwarten, daß der theoretischen Beziehung $\Delta I(\vec{r}) \ll \overline{I(\vec{r})}$, die aus der Bedingung $|\Psi_s| \ll |\Psi_o|$ (s. Abschn. 1.1.) folgt, eine Meß-Beziehung $\Delta d(\vec{r}) \ll \overline{\Delta d(\vec{r})}$ entspricht.

Die statistischen Eigenschaften der Kornverteilung können durch das Wienerspektrum oder die Autokorrelationsfunktion (s. Abschn. 4.1.) beschrieben werden.

1.7. Additivität des Rauschens

Wir werden später voraussetzen, daß sich das Rauschen dem Signal additiv überlagert. Nach (20) ist jedoch das durch die Elektronenfluktuationen entstehende Rauschen von der Intensität abhängig, ein Ansatz $b(\vec{r}) = o(\vec{r}) + n(\vec{r})$ also nicht allgemein gerechtfertigt.

Nach Röhler^{29a} ist der additive Ansatz aber noch annähernd aufrechtzuerhalten, wenn Rauschen und Signal etwa dieselbe Größenordnung haben und klein sind gegen den Signalträger. In unserem Fall sind statistische Elektronenfluktuationen und die durch Objekteigenschaften bedingten „Signal“-Schwankungen klein gegen die mittlere Elektronenzahl.

Erst bei Dunkelfeldabbildungen treten an die Stelle der additiven Überlagerung komplizierte nicht-lineare Beziehungen.

Kapitel 2

Photometrische Messung

2.1. Das Photometer

In unserem Institut wurde ein automatisch steuerbares Photometer entwickelt. Der Strahlengang ist in Abb. 2 dargestellt. Der Kondensator K dient zum Ausleuchten der Blende B, die von einem Mikroskopobjektiv O 10-fach verkleinert auf der Filmebene E abgebildet wird. Zur homogenen Ausleuchtung des Blendenbildes und zur Vermeidung von Instabilitäten der Beleuchtung ist es erforderlich, die Wendel W der Glühlampe nicht in B abzubilden, sondern in einer zwischen B und O gelegenen Ebene W'. Die Projektivlinse P ist so angeordnet, daß weder W noch E auf der Multiplierfläche M scharf abgebildet wird; auf diese Weise wird eine homogene Ausleuchtung der Elektrode ohne Mattscheibe erreicht und ein Intensitätsgewinn gegenüber üblichen Anordnungen erzielt. Der Kreuzschlitten, der die Photoplatte trägt, wird über Getriebe durch Schrittmotore in Abständen von 10 oder 20 μm bewegt. Das verwendete Steuerprogramm ist für eine zeilenweise Abtastung angelegt; jede Einzelzeile wird, zur Ausschaltung des mechanischen Spiels der Führungsspindel, im selben Sinn durchlaufen. Multiplier und angeschlossener Verstärker liefern eine Spannung proportional der Transparenz der Emulsion $t(\vec{r})$. Der Strom für die Glühlampe und die Hochspannung für den Photomultiplier sind auf jeweils $1 \cdot 10^{-3}$ stabilisiert. Die Ausgangsspannungswerte werden von einem Analog/Digital-Konverter umgewandelt und auf Lochstreifen ausgegeben.

Der Datenfluß vom Photometer bis zum Magnetband ist in Abb. 3 dargestellt. Die Meßdaten werden beim Einlesen der Lochstreifen in eine Rechenanlage Siemens 305 durch einen Datenkanal zu einer Anlage IBM 1130 übertragen, und von dort aus über eine Datenfernleitung (Remote Job Entry) zur Rechenanlage IBM 360/91 in Garching gesendet, logarithmiert und auf ein magnetisches Band geschrieben. Die ersten Messungen wurden ohne Schwärzungseichung durchgeführt, die Transparenzwerte $t(\vec{r}_i)$ sind nur relativ bestimmt. Die daraus errechnete Schwärzungsverteilung $d(\vec{r}_i) = -\log_{10} t(\vec{r}_i)$ ist also nur bestimmt bis auf eine additive Konstante. Bei der Messung von Aufnahmen für die Differenzanalyse (s. Abschn. 3.) wurden Hochspannungseinstellung des Photomultipliers und die Einstellung des Stromversorgungsgeräts für die Glühlampe unverändert gelassen. Langzeitmessungen zeigen, daß die Langzeitkonstanz des Verstärkerausgangs (bei unbewegter Emulsion) besser als $5 \cdot 10^{-3}$ ist. Für eine gegenseitige Skalierung der Schwärzungsverteilungen sollte diese Genauigkeit ausreichen. Eine Nachprüfung kann mit Hilfe von Absolutmessungen (Schwärzungskeil) oder mit Hilfe der Wilson-Statistik erfolgen (s. Abschn. 3.1.1.).

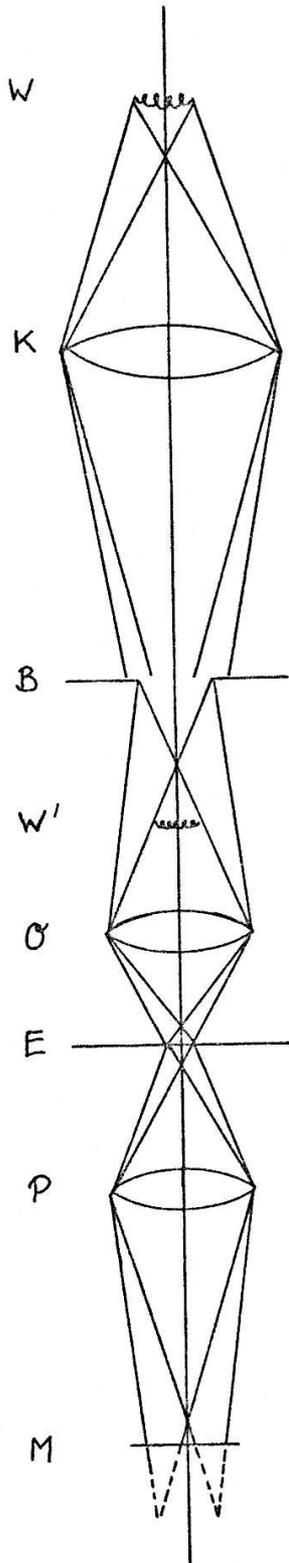


Abbildung 2: Strahlengang im Photometer.

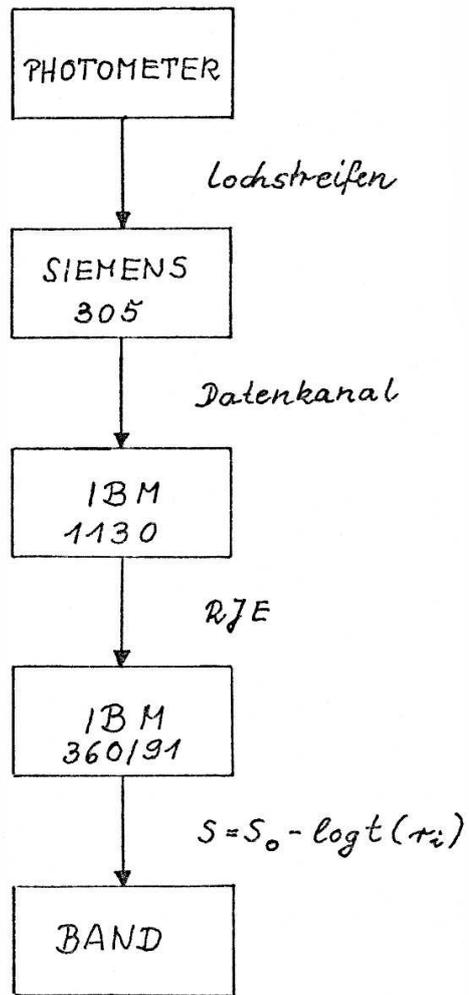


Abbildung 3: Datenfluß vom automatischen Photometer zum Magnetband.

Die Photometermessung liefert eine Folge von digitalen Meßwerten. Wieweit diese Folge noch die ursprüngliche Schwärzungsverteilung repräsentiert, soll im folgenden diskutiert werden.

Wir haben vor allem vier Einflüsse zu betrachten, die zu einer Verfälschung der Messung führen können

1. Übergang von der kontinuierlichen Verteilung zur diskreten Verteilung (dem Meßraster) von Meßpunkten.
2. Das Photometer mißt Transparenzen bzw. Mittelwerte von Transparenzen, nicht die Schwärzung selbst.
3. Die Einzel-Messung repräsentiert nicht einen Punkt, sondern den Mittelwert über die Meßaperturfläche.
4. Der betrachtete Bildbereich ist aus einem größeren Bildbereich willkürlich ausgeschnitten, bzw. das abgebildete Objekt ist nicht begrenzt innerhalb einer Meßfläche entsprechenden Bereichs. Diese Tatsache hat eine Bedeutung, wenn der einzelne Bildpunkt infolge der Abbildungsfehler nicht genügend apodisiert ist und eine größere Fläche überstreicht.

2.2. Beschreibung der Photometermessung

Das Photometer erzeugt aus der kontinuierlichen Schwärzungsverteilung eine diskrete Transparenzverteilung, aus der die diskrete Schwärzungsverteilung wieder berechnet werden muß. Wir können diesen Vorgang durch folgendes Schema beschreiben:

- | | |
|--|---|
| 1. $d(\vec{r}) \rightarrow \hat{t}(\vec{r})$ | kontinuierliche Schwärzungsverteilung \rightarrow kontin., mit der Blendenfunktion gefaltete Transparenzverteilung, |
| 2. $\hat{t}(\vec{r}) \rightarrow \hat{t}(\vec{r}_i)$ | kontinuierliche Transparenzverteilung \rightarrow diskrete Transparenzverteilung, |
| 3. $\hat{t}(\vec{r}_i) \rightarrow \hat{d}(\vec{r}_i)$ | diskrete Transparenzverteilung \rightarrow diskrete modifizierte Schwärzungsverteilung. |

Innerhalb des durch die Photometerblende ausgewählten Bereichs ist die durchgelassene Lichtintensität in jedem Punkt proportional der Transparenz $t(\vec{r})$:

$$I_L(\vec{r}) = I_{L_0} e^{-2,3d(\vec{r})} = I_{L_0} t(\vec{r}) , \tag{29}$$

I_{L_0} Beleuchtungsintensität.

Der Photomultiplier integriert nun über die von der gesamten Blendenfläche E kommenden Beiträge und registriert - gleichmäßige Ausleuchtung der Blende vorausgesetzt¹⁾ - das Integral

$$\int_{(E), \vec{r}_E} I_L(\vec{r}) df = I_{Lo} \int_{(E), \vec{r}_E} e^{-2,3d(\vec{r})} df = I_{Lo} \int_{(E), \vec{r}_E} t(\vec{r}) df = I_{Lo} t(\vec{r}_E). \quad (30)$$

Der Mittelpunkt der Blendenfläche soll sich jeweils in \vec{r}_E befinden.

Die Transparenz-Meßwerte sind demnach darstellbar durch einen Faltungsausdruck

$$\hat{t}(\vec{r}) = t(\vec{r}) \widehat{e(\vec{r})}, \quad (31)$$

$e(\vec{r})$ Blendenfunktion.

Dasselbe gilt für die Schwärzungsverteilung nur unter Einschränkung.

$$\text{Wir betrachten } y = -\log_{10} \hat{t}(\vec{r}_E) = -\log_{10} \int_{(E), \vec{r}_E} e^{-2,3d(\vec{r})} df \quad (32)$$

$$\text{und zerlegen } d(\vec{r}) = \hat{d}(\vec{r}_E) + \Delta d(\vec{r}) \quad (33)$$

$$\text{mit } d(\vec{r}_E) = \int_{(E), \vec{r}_E} d(\vec{r}) df \quad (34)$$

und der Normierung $\int_{(E)} df = 1$.

$$\text{Unter der Voraussetzung von } \Delta d(\vec{r}) \ll 1 \quad (35)$$

¹⁾ Bei ungleichmäßiger Ausleuchtung (Ausleuchtungsfunktion $v(\vec{r})$) ergibt sich im wesentlichen derselbe Sachverhalt, nur braucht der zweite Term in (36) nicht mehr notwendig zu verschwinden.

Aus $\int_{(E), \vec{r}_E} d(\vec{r}) df = 0$ folgt ja nicht allgemein $\int_{(E), \vec{r}_E} v(\vec{r}) d(\vec{r}) df = 0$, sondern nur für spezielle $v(\vec{r})$, wie etwa $v(\vec{r}) \equiv 1$. Zu $\hat{d}(\vec{r}_E)$ tritt ein ortsabhängiger Zusatzterm, und die Faltungsdarstellung für $\log t(\vec{r})$ ist nicht mehr aufrechtzuerhalten.

können wir (32) umformen in

$$y \approx -\log_{10} \int_{(E), \vec{r}_E} e^{-2,3\hat{d}(\vec{r}_E)} (1 - 2,3\Delta d(\vec{r})) df = \hat{d}(\vec{r}_E) - \log_{10} \left\{ \underbrace{\int_{(E), \vec{r}_E} df}_{=1} - \underbrace{\int_{(E), \vec{r}_E} 2,3\Delta d(\vec{r}) df}_{=0} \right\}. \quad (36)$$

Nach (34) ist also das betrachtete Integral y als Funktion von \vec{r}_E die Faltung der Schwärzung mit der Blendenfunktion. D.h. unter der Voraussetzung (35), die bei genügend kleiner Meßblende stets zu realisieren ist, erhält man durch Logarithmieren der gemessenen Transparenzwerte gerade die Werte, die ein hypothetisches, die Schwärzung registrierendes Photometer mit derselben Meßblende liefern würde.

Zur Vereinfachung der weiteren Darstellung beschreiben wir nun formal diese Ersatzmessung.

Wir denken uns zunächst aus der ursprünglichen Schwärzungsverteilung $d(\vec{r})$ eine kontinuierliche Verteilung abgeleitet, die durch Faltung mit der Blendenfunktion geglättet wird:

$$\hat{d}(\vec{r}) = d(\vec{r}) \widehat{e(\vec{r})}. \quad (37)$$

Aus dieser neuen Verteilung entsteht nun der Meßwertsatz durch einen Auswahlprozess: es werden nur die Meßpunkte zugelassen, die auf einem Gitter $g(\vec{r})$ liegen.

2.3. Der Übergang zur diskontinuierlichen Schwärzungsverteilung

Wir betrachten zunächst die Schwärzungsverteilung als unendlich ausgedehnt und verfolgen, wie sich der Übergang von der kontinuierlichen zur diskontinuierlichen Verteilung auswirkt, bei einer Fourier-Transformation³⁰. Das Abtastgitter $g(\vec{r})$ sei erzeugt durch Translation einer δ -Funktion um Vielfache der Vektoren $\vec{a} = (a, 0)$ und $\vec{b} = (0, b)$

$$g(\vec{r}) = \sum_{-\infty}^{\infty} \sum_{-\infty}^{\infty} \delta(x - na, y - mb). \quad (38)$$

Wir legen dieses Gitter auf unsere Schwärzungsverteilung und erhalten

$$d'(\vec{r}) = g(\vec{r}) \cdot \hat{d}(\vec{r}) = g(\vec{r}) \cdot (d(\vec{r}) \widehat{e(\vec{r})}). \quad (39)$$

Nach dem Faltungstheorem ist

$$F\{d'(\vec{r})\} = F\{g(\vec{r})\} \widehat{[F\{d(\vec{r})\} \cdot F\{e(\vec{r})\}]} . \quad (40)$$

Die Transformierte des Abtastgitters ist ebenfalls ein Punktgitter,

$$F\{g(\vec{r})\} = \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \delta(x^* - \frac{h}{a}, y^* - \frac{k}{b}), \quad (41)$$

mit den Perioden $(\frac{1}{a}, \frac{1}{b})$, das zum Abtastgitter reziproke Gitter.

Wir erhalten also die Transformierte des abgetasteten Bereichs, indem wir in jeden Punkt des reziproken Gitters den Nullpunkt der Transformierten

$$F\{\hat{d}(\vec{r})\} = F\{d(\vec{r})\} \cdot F\{e(\vec{r})\} \quad (42)$$

legen.

Die Funktion $F\{e(\vec{r})\}$ beschreibt den Einfluß der Blende. Für Blenden mit einem Durchmesser, der wesentlich unter der nachweisbaren Auflösung liegt, ist diese Funktion praktisch konstant in dem Bereich, in dem $F\{d(\vec{r})\} \neq 0$ ist. Größere Blenden (Blendendurchmesser \approx Auflösungs-
distanz) bewirken jedoch einen Abfall der Fourierkoeffizienten bei höheren Ortsfrequenzen. Für den Fall einer Kreisblende mit dem Radius R wird $F\{e(\vec{r})\} = \frac{J_1(KR)}{KR}$;
 $K = \sqrt{x^{*2} + y^{*2}}$.

Die Fouriertransformierte der kontinuierlichen Bildverteilung ist im allgemeinen nicht unendlich ausgedehnt, sondern hat wesentliche Beiträge nur in einem Bereich $\vec{h} \in B$ („Bandbegrenzung“ in der Nachrichtenübertragungstheorie). Sind nun die reziproken Gitterpunkte so weit voneinander entfernt, daß sich benachbarte Fourier-Bereiche nicht überlappen (d.h. bei genügend feinem Abtastgitter), so erhalten wir aus einem einzigen dieser Bereiche, etwa um den Gitterpunkt ($h = 0, k = 0$) herum, die volle Information über die Ausgangsverteilung. Wir brauchen nur diesen Bereich durch eine geeignete Filterfunktion aus der gesamten Fouriertransformierten auszuschneiden.

Daß diese hier nur plausibel gemachte Tatsache sogar exakt gilt, ist die wesentliche Aussage des Sampling-Theorems in der Ortsdarstellung (Exakte Ableitung s. z.B. ^{29b}).

Wegen des hohen Meß- und Rechenaufwands wird man kein zu feines Raster wählen, sondern ein bei Berücksichtigung der Bandbegrenzung vertretbares. Wenn wir den Bereich nicht verschwindender Fourierkoeffizienten B eingrenzen durch ein Quadrat der Seitenlänge B_0 , so erhalten wir die Bedingung $a = b \leq \frac{1}{B_0}$ für die Seitenlänge der Rasterzelle.

Im Fall der elektronenmikroskopischen Abbildung ergeben sich folgende Werte bei verschiedenen Auflösungen und Vergrößerungen:

Auflösung	B_0	$V_{elopt} = 80\ 000$	180 000	250 000
3 Å	0,33 Å ⁻¹	24 µm	54 µm	75 µm
2 Å	0,5 Å ⁻¹	16 µm	36 µm	50 µm
1 Å	1,0 Å ⁻¹	8 µm	18 µm	25 µm

Wie später in Abschn. 5.7. noch ausgeführt wird, kann man nachweisen, daß der von der elektronenmikroskopischen Abbildung herrührende Ortsfrequenzbereich bereits beim Elmiroskop IA ohne zusätzliche Stabilisierung einer Punktauflösung von 3,6 Å entspricht.

Eine weitere Ausdehnung kann bei Apparaturen mit hoher mechanischer und elektrischer Stabilität erwartet werden^{31,32}.

Ein wichtiger Gesichtspunkt für die Wahl des Abtastgitters s ist auch die Genauigkeit, mit der die Positionen der Aufnahmen beim Bilddifferenzverfahren (s. Abschn. 3.) einander zugeordnet werden müssen.

Deshalb wurde für das Abtastgitter eine Gitterkonstante gewählt, die erheblich unter der für 3 Å, $V = 180\ 000$ aufgeführten liegt. Bei allen Auswertungen wurde ein Raster von $20 \times 20\ \mu\text{m}$ benutzt, entsprechend 1,11 Å bei $V = 180\ 000$. Ein hypothetisches Atom, eine Scheibe von 2 Å Durchmesser, wird damit von etwa 3 Meßpunkten repräsentiert.

Damit die Einzelmessungen voneinander unabhängig sind, ist es erforderlich, die Meßblende nicht größer als die Abtastgitterkonstante zu wählen. Dies ist bei der verwendeten Blendengröße von $15\ \mu\text{m}\ \varnothing$ der Fall. Um die volle Information auszuschöpfen, sollte die Meßblende allerdings gerade so groß sein wie diese Gitterkonstante. In diesem Sinn sind die bisherigen Auswertungen noch nicht optimal; um den aus dem Flächenverhältnis folgende Faktor $\sqrt{\frac{20^2}{15^2}} \approx 1,3$ könnte das Signal/Rauschverhältnis noch verbessert werden.

Insgesamt wurde jeweils ein Bereich von $5,2 \times 5,2\ \text{mm}$ abgetastet (256×256 Meßpunkte), entsprechend einer Fläche von $290 \times 290\ \text{Å}$ am Objektort bei $V_{elopt} = 180\ 000$.

2.4. Bildbereichsbegrenzung

Bisher wurde eine unendlich ausgedehnte Verteilung angenommen. Bei der Messung muß jedoch ein begrenzter Bildbereich aus der Abbildung willkürlich ausgeschnitten werden. Statt von $d(\vec{r})$ haben wir auszugehen von

$$\tilde{d}(\vec{r}) = d(\vec{r}) \cdot c(\vec{r}) , \quad (43)$$

$c(\vec{r})$ „Ausschneide-Funktion“.

Diese Tatsache hat wichtige Konsequenzen, die im Folgenden erörtert werden sollen.

Zunächst einmal widerspricht jede Bildbegrenzung - ob natürlich oder nachträglich erzwungen - der Annahme der Bandbegrenzung; Die Diskontinuität einer unstetigen Begrenzungsfunktion $c(\vec{r})$ kann nur durch eine kontinuierliche, unendlich ausgedehnte Fouriertransformierte $F\{c\}$ dargestellt werden.

Anwendung des Faltungstheorems auf (43) führt zu

$$F\{\tilde{d}\} = F\{d\} \widehat{F\{c\}} , \quad (44)$$

d.h. auch $F\{\tilde{d}\}$ wird unendlich ausgedehnt.

Diese Schwierigkeit entfällt nur bei einem genügend „glatten“ Übergang an den Bildrändern, d.h. bei einer Begrenzungsfunktion, deren erste Ableitungen keine Diskontinuitäten aufweisen. In diesem Fall fällt $F\{c\}$ genügend schnell ab mit wachsendem Radiusvektor in der reziproken Ebene.

Im günstigsten Fall hat das Bild bzw. bereits das Objekt von sich aus schon diese Eigenschaft. Auf die Bedeutung dieser Voraussetzung wurde schon an anderer Stelle hingewiesen³³, im Zusammenhang mit den Problemen einer dreidimensionalen Strukturaufklärung mit Hilfe des Elektronenmikroskops.

Wenn wir hingegen gezwungen sind, eine künstliche Bildbegrenzung einzuführen und die Glättung der Randbereiche durch eine passende Begrenzungsfunktion selbst zu erzeugen, müssen wir uns bei den weiteren Rechnungen stets vor Augen halten, daß diesem modifizierten Bild beim gegebenen physikalischen Abbildungsprozess genau genommen keine Objektverteilung mehr entspricht.

Die Wirkungen, die durch den Eingriff geschaffen werden, übersieht man am besten anhand der Bildpunktfunktionen. Wir schreiben zunächst (44) ausführlich unter Verwendung der Gleichung

$$F\{d\} = F\{o\} \sin \gamma = F\{o\}F\{s\} , \quad (45)$$

wobei $o(\vec{r})$ die Objektverteilung („Phasenstruktur“),

$s(\vec{r})$ die (Intensitäts-) Bildpunktfunktion bedeuten.

$$F\{\tilde{d}\} = [F\{o\}F\{s\}] F\{c\} , \quad (46)$$

Rückwärtstransformation von (46) liefert die Ortsdarstellung

$$\tilde{d} = [o(\vec{r}) \widehat{s(\vec{r})}] \cdot c(\vec{r}) . \quad (47)$$

Je nach Lage des Nullpunkts von $s(\vec{r})$ auf der kontinuierlichen Verteilung $o(\vec{r})$ wird die Bildpunktfunktion asymmetrisch durch die Begrenzungsfunktion beschnitten. Bei idealer Abbildung wird $s(\vec{r}) = \delta(\vec{r})$. Der Bildpunkt besteht aus einem scharfen Peak, dessen genaue Gestalt sich aber erst bei Berücksichtigung des atomaren Aufbaus der Struktur ergibt. Eine Begrenzung kann nur in einem schmalen Randbereich des Bildes, entsprechend der Größenordnung des Atomdurchmessers ($\approx 2 \text{ \AA}$) auftreten. Bei der Abbildung mit einer realisierbaren Übertragungsfunktion dagegen wird der Peak verbreitert, und es können Nebenmaxima in beträchtlicher Entfernung vom Bildpunktzentrum erscheinen^{5,13}, in ungünstigen Fällen bis zu 20 \AA entfernt. Ungestörte Bildpunkte liegen also nur in einem zentralen Bereich unseres Bildausschnittes. Nur in diesem Bereich sind die durch Bildrekonstruktionsverfahren (Abschn. 7.) erhaltenen Aussagen physikalisch interpretierbar.

Wie groß dieser Bereich ist, läßt sich nur anhand der Bildpunktfunktion im konkreten Fall abschätzen.

Es gibt jedoch einen Defokus-Bereich mit besonders günstiger Apodisierung der Bildpunkte^{5,13}, der etwa mit denen von Scherzer angegebenen¹² übereinstimmt (vgl. Abschn. 7.4.).

Obwohl es also für die Ausführung der Bildrekonstruktion - abgesehen vom unterschiedlichen Informationsverlust in der Nähe der Nulllinien von $\sin \gamma$ - prinzipiell gleichgültig ist, mit welcher Defokussierung die auszuwertende Aufnahme entstand, erweist es sich als Folge der in der Praxis stets notwendigen Bereichsbegrenzung als günstig, von Aufnahmen im Scherzer-Gebiet auszugehen.

Wir nehmen die Bereichsgrenzen $0 \leq x \leq X, 0 \leq y \leq Y$ an.

Nach dem Sampling-Theorem in der Frequenzdarstellung³⁴ genügt es, die Werte der Fouriertransformierten in den Punkten eines Flächengitters $\delta(x^* - \frac{h}{X}, y^* - \frac{k}{Y})$ zu kennen, um die gesamte kontinuierliche Fouriertransformierte zu berechnen:

$$F(x^*, y^*) = \sum_h \sum_k F\left(\frac{h}{X}, \frac{k}{Y}\right) \frac{\sin(x^*X - h) \sin(y^*Y - k)}{x^*X - h} \frac{1}{y^*Y - k} . \quad (47')$$

Sie entsteht durch Faltung mit einer „Samplingfunktion“.

Die Werte $F\left(\frac{h}{X}, \frac{k}{Y}\right)$ können durch eine endliche Fouriersumme aus dem empirischen Schwärzungsmeßwerten gebildet werden (vgl. ^{35a}).

$$F\left(\frac{h}{X}, \frac{k}{Y}\right) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} d' \left(\frac{m}{M} X, \frac{n}{N} Y\right) e^{2\pi i \left(\frac{m}{M} \frac{h}{X} + \frac{n}{N} \frac{k}{Y}\right)}, \quad (47'')$$

$$0 \leq h \leq M - 1,$$

$$0 \leq k \leq N - 1.$$

2.5. Zur Darstellung der Schwärzungsverteilung

Zum quantitativen Vergleich der bei der Differenzanalyse und beim Rekonstruktionsverfahren berechneten Bildverteilungen wurde eine FORTRAN-Routine CONTUR benutzt, die Höhen-schichtliniendarstellung erzeugt. Wegen der starken örtlichen Schwankungen der Meßverteilung ist es notwendig, die Auflösung vorher zu reduzieren. Für diese Vorbereitung wurde eine Routine PRCONT entwickelt, die einen wählbaren Bereich der Fouriertransformierten ausschneidet und zurücktransformiert. Eine Routine RELEX sucht die relativen Extrema auf und versieht sie mit einem Symbol entsprechend ihrem absoluten Wert. Als „relative Extrema“ werden die Werte ausgesucht, die größer/gleich bzw. kleiner/gleich ihren 8 Nachbarwerten im Zahlenfeld sind. Zur Identifizierung der nachträglich in die CONTUR-Darstellung eingezeichneten Symbole dient eine Zuordnungsliste. Diese Wertzuordnung erleichtert die Interpretation der CONTUR-Darstellung wesentlich.

Für einen visuellen Vergleich errechneter Schwärzungsverteilungen mit den Originalverteilungen wurde eine Routine WRSYMB entwickelt, die die Schwärzungswerte - mit positivem oder negativem Kontrast - wieder in Schwärzungen mit Hilfe des Druckers umsetzt. Abb. 1 (Anh.) zeigt einen Vergleich eines solchen Ausdrucks mit einer photographischen Vergrößerung der abgetasteten Fläche und einer CONTUR-Darstellung. Es handelt sich um eine 80 000-fach vergrößerte Aufnahme eines Hefe-Fettsäuresynthetase-Enzymsystems³⁶.

Anhand eines Rasterdruck läßt sich nun sehr schön demonstrieren, wie sich eine zu starke Reduzierung der Auflösung auswirkt: Im Diffraktogramm liegen um jeden Punkt des zum Ras-

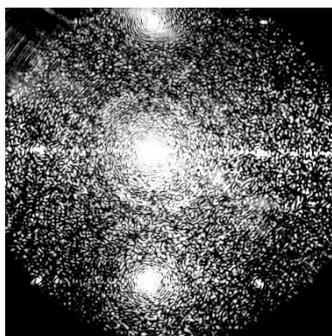


Abbildung 4: *Diffraktogramm eines Schwärzungsausdrucks mit 5 Å Auflösung (Kohlefolienaufnahme, $\Delta f = 4\ 100\ \text{Å}$, $\Delta f_A = 1\ 400\ \text{Å}$, $U = 100\ \text{kV}$)*

ter reziproken Gitters die Übertragungszonen; sie überlappen sich gegenseitig, wenn die Auflösung auf etwa 5 \AA herabgesetzt wird. (vgl. Abschn. 4.6., 7.7.) In Abb. 4 ist ein derartiges Diffraktogramm eines Schwärzungsausdrucks abgebildet, der den photometrierten Bereich einer Kohlefolie darstellt. Die Kontrastzonen um benachbarte Punkte des reziproken Gitters erscheinen überlappt.

Kapitel 3

Differenzanalyse

3.1. Der Gedanke des Bilddifferenzverfahrens

Bei der elektronenmikroskopischen Abbildung entsteht ein Bild der Projektion der Präparatstruktur⁷⁾, also einer Überlagerung der Projektion der interessierenden Objektstruktur, mit der der Trägerfolie. Erst eine Rekonstruktion der räumlichen Struktur, etwa durch die Auswertung mehrerer Kippaufnahmen¹⁷ würde die vollständige Trennung der beiden Strukturanteile ermöglichen.

Es soll gezeigt werden, daß bereits ohne räumliche Analyse eine Trennung der beiden Projektionen durchführbar ist.

Die Grundzüge des Bilddifferenzverfahrens werden bereits, zusammen mit anderen Vorschlägen zur Abtrennung der Foliestruktur, in ¹⁰ erläutert. Danach besteht eine alternative Möglichkeit in der Präparation kristalliner Trägerfolien. Bisher stieß jedoch die Herstellung solcher Folien auf große Schwierigkeiten; insbesondere entsteht auch auf kristallinen Folien in kurzer Zeit eine ungeordnete Kontaminationsschicht, die nach lichtdiffraktometrischen Untersuchungen die Eigenschaften normaler amorpher Trägerfolien aufweist.

Dagegen ist das im Folgenden beschriebene Verfahren schon jetzt realisierbar.

Das Bild des interessierenden Objekts ist überlagert vom Bild der - zumeist amorphen - Trägerfolie. Die Aufgabe, aus dem auf der Photoplatte entstehenden Bild Informationen über die Objektstruktur zu erhalten, ist analog dem nachrichtentechnischen Problem, ein Signal in einer Rauschumgebung aufzufinden.

(Wieweit die Ähnlichkeit zwischen der theoretischen Behandlung von statistischen Zeitfunktionen und von statistischen zweidimensionalen Verteilungsfunktionen besteht, wird in ³⁷ ausführlich erörtert).

Die Eigenschaften der Photoplatte und die endliche Zahl der an der Abbildung beteiligten Elektronen bringen es mit sich, daß wir selbst dann, wenn wir das Objekt trägerfrei im Vakuum „halten“ könnten, nur Wahrscheinlichkeitsaussagen über dessen Struktur machen können. Dies gilt jedenfalls streng im Höchstauf Lösungsbereich. Wir wollen dieses Problem bei der folgenden Überlegung abtrennen und zunächst sowohl Elektronenstatistik als auch die Komplikationen bei der photographischen Abbildung vernachlässigen.

⁷⁾ Obwohl die Bedeutung der Begriffe „Präparat“ und „Objekt“ gewöhnlich nicht unterschieden werden, soll hier vereinbart werden, den Ausdruck „Objekt“ für das untersuchte Detail (Molekül, Virus, Enzymkomplex etc.) vorzubehalten, das im allgemeinen auf einer Folie gehalten ist. Beides zusammen soll „Präparat“ genannt werden.

Welches Verfahren zur Abtrennung der Signalverteilung $o(\vec{r})$ vom Rauschuntergrund $n(\vec{r})$ geeignet ist, hängt wesentlich von der Art der a-priori-Information ab, die wir über beide Verteilungen haben. Es sollen zwei verschiedene Fälle gegenübergestellt werden:

A) Kennen wir lediglich ihre Wienerspektren, d.h. den aus vielen Realisationen erhaltenen mittleren Verlauf von $|F\{o\}|^2$ bzw. $|F\{n\}|^2$ (genauere Einführung s. Abschn. 4.1.) so können wir nach Wiener³⁸ ein optimales Filter zur Rauschverminderung konstruieren^{29c}.

Der Gedankengang soll kurz erläutert werden:

Man geht aus von der durch Rauschen gestörten Objektverteilung

$$o'(\vec{r}) = o(\vec{r}) + n(\vec{r}), \quad (48)$$

deren Abbildung zur gestörten Bildverteilung

$$b'(\vec{r}) = o'(\vec{r}) \widehat{s(\vec{r})} = [o(\vec{r}) + n(\vec{r})] \widehat{s(\vec{r})} = b(\vec{r}) + n_s(\vec{r}) \quad (49)$$

führt. Gesucht ist eine Integraltransformation

$$\hat{b}'(\vec{r}) = \iint b'(\vec{r}') s'(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}', \quad (50)$$

$$\text{die das Integral } \iint [\hat{b}(\vec{r}') - b(\vec{r}')]^2 d\vec{r}' \quad (51)$$

minimalisiert, die also die transformierte und die ungestörte Bildverteilung einander möglichst „ähnlich“ macht.

Man erhält für die „Filterfunktion“ $S'(\vec{h}) = F\{s'(\vec{r}')\}$ die Bedingung ^(29c)

$$S'(\vec{h}) = \frac{S^2(\vec{h}) \cdot O^2(\vec{h})}{S^2(\vec{h}) \cdot N^2(\vec{h}) + S^2(\vec{h}) \cdot O^2(\vec{h})} = \frac{O^2(\vec{h})}{N^2(\vec{h}) + O^2(\vec{h})}, \quad (52)$$

$$S(\vec{h}) = F\{s(\vec{r})\}; \quad O(\vec{h}) = F\{o(\vec{r})\}; \quad N(\vec{h}) = F\{n(\vec{r})\}.$$

Der gesuchte Integralkern in (50) ist also gegeben durch

$$F^{-1}\{S'(\vec{h})\} = F^{-1}\left\{\frac{O^2}{N^2 + O^2}\right\}.$$

In unserem konkreten Fall nützt die Konstruktionsvorschrift (52) jedoch wenig, da nur das Wiererspektrum der amorphen Folie N^2 annähernd bekannt ist.

B) Der Sachverhalt ändert sich grundlegend, wenn wir die Signalverteilung bereits kennen und nur ihr Vorhandensein im gestörten Bild feststellen wollen.

Die Aufgabe ein bekanntes Signal in einer Rauscheinbettung wiederzufinden, wird durch Korrelationsmethoden gelöst:

Ist die Orientierung der Signalverteilung $o(\vec{r})$ bezüglich der Bildverteilung $b(\vec{r})$ bekannt, so kann der unbekannte Translationsvektor aus dem Integral

$$\Phi_{o,b}(\vec{r}') = \iint o(\vec{r})b(\vec{r} + \vec{r}')d\vec{r} \quad (53)$$

bestimmt werden.

$\Phi_{o,b}(\vec{r}')$ ist die später genauer beschriebene (s. Abschn. 4.1.) Kreuzkorrelationsfunktion.

Die gegenseitige „Einpassung“ von Strukturen ist aus der Faltmolekülmethode⁴² bekannt; hier werden allerdings nicht die unseren Signalverteilungen entsprechenden Objektstrukturen, sondern ihre Pattersonfunktionen verwendet. Die Faltmolekülmethode bietet überdies eine Möglichkeit, um eine Orientierungsbestimmung vor der Translationsbestimmung auszuführen (s. Abschn. 4.2.1.).

In einer anderen Sprechweise entspricht die Berechnung des Integrals (53) der Einführung eines angepaßten Filters³⁹: Besteht der Verdacht, daß in einem Signal/Rauschgemisch $b(\vec{r})$ ein Signal $b_1(\vec{r})$ vorhanden ist, so genügt es, auf $B(\vec{h}) = F\{b\}$ das komplexe Filter $B_1^*(\vec{h}) = F^*\{b_1\}$ anzuwenden. Die Transformierte $\Phi = F^{-1}\{BS_1^*\}$ besitzt nur dann einen hohen Wert im Nullpunkt, wenn wenigstens für einen Teil des Frequenzraums $B(\vec{h}) = S_1(\vec{h})$ erfüllt ist. (Bzw. im verschobenen Nullpunkt, wenn bestimmte Phasenbeziehungen zwischen $B(\vec{h})$ und $S_1(\vec{h})$ herrschen, vgl. Abschn. 4.2.3.). Das Verfahren wird z.B. für die Zeichenerkennung ausgenutzt⁴⁰.

Die Anwendung der Korrelationsmethoden auf die Zuordnung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfordert eine genauere Erörterung, die später gegeben wird (s. 4.2.1.).

Die Idee des Bilddifferenzverfahrens ist nun die Umkehrung der Betrachtungsweise:

Wir betrachten die Struktur der Trägerfolie als Signalverteilung, über die wir die maximale Information bereits besitzen, und das auf der Folie liegende Objekt als völlig unbekannt.

Die Information über die Trägerfolie erhalten wir durch eine vorangehende Aufnahme des Foliebereichs ohne Objekt-Präparation.

Da die Auffindung dieser Signalverteilung in der „gestörten“ Nachbaraufnahme gleichzeitig die gegenseitige laterale Zuordnung liefert, und da sich nach Voraussetzung (8) die von den Objektelementen herrührenden Bildelemente linear superponieren, erhält man das Bild des Objekts als Differenz der beiden Bildverteilungen. Es erweist sich hier als günstig, nicht wie üblich die statistischen Eigenschaften der Trägerfolie, sondern ihre individuelle Struktur zu betrachten und für eine Isolierung des Objektbilds zu benutzen.

3.1.1. Die Frage der Skalierung

Die Schwärzungsverteilungen sind für die beiden Bilder nach Abschn. 1.6. jeweils proportional zu den Intensitätsverteilungen

$$I_1(\vec{r}) = \Psi_{o1}^2 + 2\Psi_{o1}Re\Psi_{s1} = I_{o1} + I_1(\vec{r}), \quad (54)$$

$$I_2(\vec{r}) = \Psi_{o2}^2 + 2\Psi_{o2}Re\Psi_{s2} = I_{o2} + I_2(\vec{r}),$$

$\Psi_{o1,2}$ reelle Primärquelle,

$\Psi_{s1,2}$ kohärente elastische Streuwelle.

Halten wir die Primärstrahlintensität konstant, so wird $I_{o1} = I_{o2}$, und das gesuchte Differenzbild ergibt sich direkt als Differenz der Schwärzungs- bzw. Intensitätsausdrücke:

$$\Delta I(r) = I_1(\vec{r}) - I_2(\vec{r}) = \Delta I_1(\vec{r}) - \Delta I_2(\vec{r}). \quad (55)$$

Sind die Primärstrahlintensitäten verschieden, so können wir

$$I_{o1} = \overline{I_1(\vec{r})} \text{ und } I_{o2} = \overline{I_2(\vec{r})} \text{ setzen} \quad (56)$$

und wegen $|\Psi_{o1,2}| = \sqrt{I_{o1,2}}$

die Gleichung (55) umschreiben in

$$\Delta I(\vec{r}) = (I_1(\vec{r}) - \overline{I_1(\vec{r})}) - (I_2(\vec{r}) - \overline{I_2(\vec{r})}) \sqrt{\frac{\overline{I_1(\vec{r})}}{\overline{I_2(\vec{r})}}} . \quad (57)$$

Das Vorgehen in (56) bedeutet, daß wir $\overline{\Delta I_1(\vec{r})} - \overline{\Delta I_2(\vec{r})} = 0$ annehmen. Dies muß tatsächlich immer gelten, da die Phasenkontrastübertragungsfunktion am Nullpunkt der reziproken Ebene verschwindet.

Bei dieser Art der Skalierung ist eine absolute Gleichheit aller Registrier- und Meßvorgänge erforderlich, die zwischen Elektronenintensität und den Meßwerten des Photometers liegen. Es wäre wünschenswert, eine unabhängige Skalierung zu finden. Ein denkbarer Weg führt über die Wilson-Statistik, die bei ähnlichen Problemen in der Röntgenstrukturanalyse angewandt wird⁴¹. In unserem Fall ist

$$|F^z|^2 = \sum_j f_j^2 + \sum_{j'} \sum_j f_{j'} f_j e^{2\pi i [h(x_{j'} - x_j) + k(y_{j'} - y_j)]} , \quad (58)$$

$$j' \neq j .$$

Bei der Mitteilung über die reziproke Ebene verschwindet der letzte Ausdruck annähernd, wenn die Atome ungeordnet sind

$$\overline{|F^z|^2} = \sum_j \overline{f_j^2} . \quad (59)$$

Wir beobachten nicht F^z , sondern $F_{obs}^z = F^z \cdot \sin \gamma$. Ändert sich die Anzahl der Atome nur unwesentlich, so können wir den Ausdruck

$$\overline{|F_{obs}^z|^2} = \overline{|F^z|^2 \sin^2 \gamma} = \sin^2 \gamma \cdot \sum_j \overline{f_j^2} \quad (59')$$

zur Skalierung verwenden. Bleibt die Übertragungsfunktion genau konstant, so genügt es, die Mittelwerte $\overline{|F_{obs}^z|^2}$ aufeinander zu beziehen.

In der später eingeführten Sprechweise (Abschn. 4.1.) können wir die Aussage der Wilson-Statistik folgendermaßen interpretieren:

(59') ist wegen des Parseval-Theorems nichts anderes als der Wert der AKF im Nullpunkt $\Phi_{\Delta I, \Delta I}(0)$ bzw. $\Phi_{\Delta b, \Delta b}(0)$. Dieser Wert sollte sich nur unwesentlich ändern, wenn kleine Strukturveränderungen stattfinden.

Dabei zeigen sich nun die Grenzen der Anwendbarkeit auf unser Problem: Der erst auf der Bild-Seite hinzukommende Rauschbeitrag zum AKF-Peak bleibt nicht notwendig konstant. Da

er außer von dem Emulsionstyp und den Entwicklungsbedingungen auch von der gesamten aufbestrahlten Elektronenmenge abhängt, bietet die Wilson-Statistik nur im Falle von geringen Intensitätsunterschieden zwischen beiden Aufnahmen eine Möglichkeit, von der Primärintensität unabhängig zu werden.

Sie kann auch benutzt werden, um die photometrischen Messungen ohne eine zusätzliche Eichung aufeinander zu beziehen.

3.1.2. Fehler in der Bestimmung des Differenzbildes

Aus dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz ergibt sich allerdings, daß die Intensitäten der einzelnen Bilder mit erhöhter Genauigkeit gemessen werden müssen:

$$\sigma_{\Delta} = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 \approx \sigma\sqrt{2}. \quad (60)$$

Hier ist σ_{Δ} der mittlere Fehler des Differenzbildes,
 $\sigma_{1,2}$ die mittleren Fehler der Einzelbilder.

Für $I_{o1} \approx I_{o2}$ ist $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$.

Wie sich in Abschn. 1.5. zeigte, befinden wir uns bereits bei der Registrierung der einzelnen Aufnahmen an der Signifikanzgrenze, bedingt durch die Elektronenstatistik und den Schwärzungsspielraum der Fotoemulsion.

Um also mit Hilfe der Differenzanalyse noch signifikante Aussagen an der Auflösungsgrenze erhalten zu können, bleibt nur noch der in Abschn. 1.5. angedeutete Weg, die Steigerung der elektronenoptischen Vergrößerung.

3.2. Anwendungen auf die Untersuchung von Strukturänderungen

Wir können prinzipiell sämtliche Strukturveränderungen eines Objekts, etwa durch Kontamination, Oberflächenwanderung, Strahlenschäden mit derselben Methode untersuchen. Es besteht die Hoffnung, daß auf diesem Weg eine Klärung der Frage erreicht wird, wie weit Höchstauflösungsaufnahmen noch die Eigenschaften eines Objekts wiedergeben, und welche Artefakte erst bei der Bestrahlung im Elektronenmikroskop erzeugt werden.

Wie Dowell⁴³ durch eine Aufzählung der Bilddetails in aufeinanderfolgenden Aufnahmen nachgewiesen hat, ist der Prozentsatz der in beiden Aufnahmen sichtbaren Details der Größenordnung 3 \AA äußerst gering ($\approx 15 \%$). Es bleibt offen, ob diese Unterschiede von Kontamination, Oberflächenwanderung oder Strahlenschäden herrühren.

In letzter Zeit wird ausführlich die Frage diskutiert, ob die von den Primärelektronen ausgelösten physikalischen und chemischen Prozesse nicht eine grundsätzliche Barriere für eine weitere Steigerung der Auflösung darstellen^{44,45}. Der für den signifikanten Nachweis eines einzelnen Atoms erforderliche Minimalkontrast (s. Abschn. 1.5.) bedingt aus statistischen Gründen eine minimale Strahlendosis.

Es ist denkbar, daß das Bilddifferenzverfahren zusammen mit einer quantitativen Korrelationsanalyse Ergebnisse liefert, die in diesem Zusammenhang interessant sind.

Ein anderer Anwendungsbereich liegt in der Erforschung der günstigsten Vakuum- und Temperaturbedingungen im Objektraum, bei denen die Kontaminationsrate minimal wird. Bisher wurde die Kontaminationsrate nur integral aus dem Massendichtzuwachs ermittelt^{46,47}.

Wir wollen schließlich noch kurz diskutieren, ob der Nachweis einer Schwermetallatomabbildung durch das Bilddifferenzverfahren erleichtert werden kann.

Rechnungen von Langer¹³ für Hellfeldabbildungen zeigen, daß bereits dünnste Folien aus Leichtatomen Kontraste im Bild erzeugen, die dem Kontrast von einem Schweratom entsprechen. Ein auf einer solchen Folie liegendes Schweratom läßt sich also nicht mit Sicherheit im Gesamtbild von Folie + Schweratom identifizieren.

Mit dem Bilddifferenzverfahren könnte diese Trennung vielleicht gelingen. Allerdings bieten sich für die Auffindung von Schwermetallatomen in einer Leichtatomumgebung auch andere Methoden an. Erfolgreich war die Ausnutzung der Z-Abhängigkeit der inelastischen Streuung im Scanning-Mikroskop⁴⁸. Eine andere Möglichkeit besteht theoretisch darin, die vergrößerte anomale Streuung der Schwermetalle zu ihrer Identifizierung zu verwenden¹⁷.

3.3. Experimentelle Bedingungen

Für die praktische Realisierung des Bilddifferenzverfahrens ergeben sich große Schwierigkeiten, die zunächst besprochen werden sollen:

- 1) Die elektronenoptischen Parameter dürfen sich zwischen beiden Aufnahmen nicht verändern. Das bedeutet im Einzelnen: keine Linsenstromdrift, keine Änderung des Astigmatismus durch Blendenverschmutzung.
Ist zwischen den Aufnahmen - etwa zur Durchführung einer „Zielpräparation“ - ein Ausschleusen der Objektpatrone erforderlich, so treten folgende Forderungen hinzu:
- 2) Belüftung und Präparation sollten die Trägerfolie selbst unverändert lassen; bei der üblichen Präparation aus der wässrigen Phase eine schwer erfüllbare Bedingung.
- 3) Die Lage der Objektebene muß genau reproduzierbar sein, da sie recht kritisch die el. opt. Vergrößerung und die Defokussierung beeinflusst. An die konische Passung der Objektpatrone werden also hohe Anforderungen gestellt.

- 4) Der betrachtete Folienbereich muß nach dem Einschleusen wieder im Bildfeld aufgefunden werden. Dies ist nur anhand von „Marken“ möglich, etwa kleiner Schmutzteilchen, Lochanordnungen oder -formen etc.

Weitere allgemeine Forderungen sind:

- 5) Bei rechteckiger Abtastung des Photometers ist es ohne größeren Rechenaufwand nicht möglich, neben der Translations- auch eine Orientierungszuordnung der beiden Aufnahmen zu erreichen (s. Abschn. 4.2.).

Wegen der Führungsungenauigkeit der Filme oder Platten in den Kassetten bzw. der Kassetten in der Plattenkammer ist die gegenseitige Orientierungsbestimmung nicht anhand der Film- oder Plattenkanten durchzuführen^{*)}. Man ist angewiesen auf weit auseinanderliegende „Marken“. Liegen zwei Marken z.B. 60 mm auseinander und ist ihre Zuordnung auf 0,2 mm genau festzulegen, so beträgt die maximal mögliche, der Winkeldivergenz entsprechende Auswanderung einander zugeordneter Punkte ca. 20 µm auf einem Bildfeld von 5,2 x 5,2 mm. Diese Entfernung entspricht bei 180 000-facher Vergrößerung etwa 1 Å Objektdistanz.

- 6) Für eine genaue Punkt-für-Punkt-Zuordnung der Aufnahme ist es erforderlich, daß die Emulsion während der Belichtung völlig eben liegt. Diese Forderung ist nur für Foto-Platten erfüllbar.
- 7) Die Entwicklungsbedingungen müssen für die beiden Filme bzw. Platten gleich sein.
In der Praxis bleiben benachbarte Platten einer Belichtungsserie auch im Entwicklungsbad einander benachbart, so daß die Einflüsse von Temperaturgradienten und Konzentrationsgefälle nahezu ausgeschaltet sind.
- 8) Die Emulsion der beiden Filme bzw. Platten muß dieselben Eigenschaften haben. Am besten ist dies gewährleistet, wenn das Fotomaterial aus derselben Charge stammt.
- 9) Um eine strenge Punkt-für-Punkt-Zuordnung zu gewährleisten, müssen die betrachteten Bildbereiche jeweils im selben isoplanatischen Teilbereich des Bildfeldes liegen. Wenn die Aufnahme bei unveränderter Objektlage hintereinander entstehen, ist diese Bedingung von selbst erfüllt.

^{*)} erst recht nicht, wenn sich beim Aus- und Einschleusen die Orientierung der Patrone gegenüber dem Objektisch ändert.

Kapitel 4

Korrelationsanalyse und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie

Die Korrelationsanalyse besitzt, über die Anwendung im Bilddifferenzverfahren hinaus, eine große praktische Bedeutung für die Auswertung ganzer Aufnahmeserien. Sie wird deshalb unter allgemeineren Gesichtspunkten eingeführt, später werden die einzelnen Probleme gesondert behandelt.

- a) Für die Realisierung einer Bilddifferenzanalyse, die in Abschn. 3.1. theoretisch erörtert wurde, ist eine sehr genaue gegenseitige Zuordnung der einzelnen Bilder erforderlich. Sollen Veränderungen nahe der elektronenmikroskopischen Auflösungsgrenze untersucht werden, so ist mindestens eine Positionszuordnung innerhalb von $1,5 \text{ \AA}$ notwendig. Veränderungen im 3 \AA -Bereich sind besonders interessant, da sich in diesem Gebiet Kristallkeimbildung und Aufwachsen von strukturierten Kontaminationsschichten im Mikroskop beobachten lassen sollten.
- b) Weiter hat der Vergleich von Aufnahmen, die unmittelbar nacheinander bei unveränderter Einstellung des Geräts belichtet werden, eine Bedeutung für die Beurteilung der Stabilität der Anlage und für die Ermittlung der Übertragungsgrenze. Der Vergleich von Details in solchen Aufnahmen wird von vielen Autoren als Kriterium für das Punktauflösungsvermögen verwendet.
- c) Schließlich ist die genaue Zuordnung von Aufnahmen einer Defokusserie^{49,50} bzw. von Aufnahmen, die mit gewissen, zueinander komplementären Eingriffen in die Apertur-ebene entstanden⁵¹, unerlässlich für die Ausführung von Bildrekonstruktionsverfahren.

Alle angeführten Probleme können durch eine Korrelationsanalyse gelöst werden.

4.1. Definition der Korrelationsfunktion

Die später benötigten Funktionen sollen zunächst durch formale Definitionen eingeführt werden.

f und g seien zwei statistisch homogene Funktionen, d.h. Funktionen, deren statistische Eigenschaften translationsinvariant sind. Sie sollen Fouriertransformierte besitzen:

$$F(\vec{h}) = F\{f\}; G(\vec{h}) = F\{g\}.$$

Wir definieren folgende Korrelationsfunktionen¹⁾

$$X_{fg}(\vec{r}) = \frac{1}{B} \iint_B f^*(\vec{r}') g(\vec{r} + \vec{r}') d\vec{r}'; F\{X_{fg}\} = F^*(\vec{h}) G(\vec{h}), \quad (61)$$

$$X_{ff}(\vec{r}) = \frac{1}{B} \iint_B f^*(\vec{r}') f(\vec{r} + \vec{r}') d\vec{r}'; F\{X_{ff}\} = F^*(\vec{h}) F(\vec{h}). \quad (62)$$

Sie enthalten eine Aussage über die statistische Abhängigkeit von Nachbarbereichen in einer bzw. in zwei gegebenen Verteilungen. Bei der Mittelung über den Integrationsbereich geht die Information über die Lage der einzelnen Beiträge verloren⁵⁾.

Die Funktion (62) ist in der Röntgenstrukturanalyse als Pattersonfunktion bekannt. Die Integration erfolgt hier über die Elementarzelle.

Zum Vergleich seien noch die in der Röntgenstrukturanalyse verwendeten Faltungsfunktionen gegenübergestellt, die wir ebenfalls benutzen werden:

$$\widehat{f g} = \frac{1}{B} \iint_B f^*(\vec{r}') g(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}' = F^{-1}\{F(\vec{h}) G(\vec{h})\}, \quad (63)$$

$$\widehat{f f} = \frac{1}{B} \iint_B f^*(\vec{r}') f(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}' = F^{-1}\{F(\vec{h}) F(\vec{h})\}. \quad (64)$$

Sind die beiden betrachteten Funktionen f , g zentrosymmetrisch, so ergibt sich kein Unterschied zwischen den Ausdrücken (61) und (63) wegen $f^*(-\vec{r}') = f^*(\vec{r}')$ und $g(-\vec{r}) = g(\vec{r})$ ist dann

$$\iint f^*(\vec{r}') g(\vec{r} - \vec{r}') d\vec{r}' = \iint f^*(\vec{r}'') g(\vec{r} + \vec{r}'') d\vec{r}'' . \quad (65)$$

¹⁾ f^* soll die konjugiert komplexe, nicht etwa - wie in der Röntgenstrukturanalyse üblich - die enantiomorphe Verteilung zu f bezeichnen.

⁵⁾ Üblicherweise werden nicht die Funktionen (61) und (62), sondern ihre Grenzwerte für unendlich große Flächen bzw. bei ergodischen Prozessen für unendlich viele Realisierungen auf der Teilfläche B als Korrelationsfunktionen eingeführt^{29d}. Wir begnügen uns hier mit der Annahme, daß B hinreichend groß ist, um die Näherung zu rechtfertigen.

Sind die Funktionen f, g rein reell, wie in den folgenden Anwendungen, so sind alle Funktionen (61 - 64) rein reell. Die Funktion $X_{,ff}$ ist überdies als Transformierte einer reellen Funktion $F^*(\vec{h})F(\vec{h})$ zentrosymmetrisch.

Wir betrachten speziell die Funktionen

$$f' = f - \bar{f}, \quad (66)$$

$$g' = g - \bar{g},$$

setzen also die Existenz der Mittelwerte

$$\bar{f} = \frac{1}{B} \iint_B f(\vec{r}) d\vec{r}, \quad \bar{g} = \frac{1}{B} \iint_B g(\vec{r}) d\vec{r} \quad (67)$$

voraus.

Für die Korrelationsintegrale $X_{f'g'}$ bzw. $X_{f'f'}$ gilt nach den Definitionen (61) und (62)

$$X_{f'g'} = X_{fg} - \bar{f}\bar{g}, \quad (68)$$

$$X_{f'f'} = X_{ff} - \bar{f}^2.$$

Diese normierten Korrelationsfunktionen sollen nun im Folgenden einheitlich bezeichnet werden durch:

Abkürzung:

$$X_{f'f'} = \Phi_{ff} = f * f \quad (\text{Autokorrelationsfunktion}) \quad (\text{AKF}), \quad (69)$$

$$X_{f'g'} = \Phi_{fg} = f * g \quad (\text{Kreuzkorrelationsfunktion}) \quad (\text{KKF}).$$

In der Wahrscheinlichkeitstheorie und in der Nachrichtentechnik werden für die Werte der entsprechenden Funktion am Nullpunkt auch die Namen Varianz bzw. Kovarianz gebraucht⁵².

$$\text{var}(f) = \Phi_{ff}(0) , \quad (70)$$

$$\text{cov}(f, g) = \Phi_{fg}(0) .$$

Durch eine Normierung der Kovarianz gelangt man zum Korrelationskoeffizienten

$$\rho(f, g) = \frac{\text{cov}(f, g)}{\sqrt{\text{var}(f)\text{var}(g)}} = \frac{\Phi_{fg}(0)}{\sqrt{\Phi_{ff}(0)\Phi_{gg}(0)}} . \quad (71)$$

Aus den Gleichungen (71) und (70) folgt $\rho(f, f) = 1$.

Wichtig sind folgende, in der Wahrscheinlichkeitstheorie bewiesene Eigenschaften des Korrelationskoeffizienten^{53a} :

1. $-1 \leq \rho \leq 1$.
2. Die Beziehung $f = C_1 g + C_2$ (72)(lineare Abhängigkeit) gilt genau dann, wenn $\rho^2 = 1$ ist.
3. Aus $f = C_1 g + C_2$ folgt $\overline{fg} = \bar{f} \cdot \bar{g}$ und damit $\rho = 0$, dagegen ist die Umkehrung nicht richtig.

Der Kreuzkorrelationskoeffizient kann als ein Maß für die statistische Abhängigkeit der Bildverteilungen verstanden werden.

Die Fouriertransformierte der AKF heißt Wienerspektrum

$$F\{\Phi_{ff}\} = W(\vec{h}) \quad (= F(\vec{h})^2) . \quad (73)$$

Wir wollen die entsprechende Transformierte der KKF, Kreuzkorrelationsspektrum oder kurz Korrelationsspektrum nennen¹⁾.

$$F\{\Phi_{fg}\} = C(\vec{h}) \quad (= F^*(\vec{h})G(\vec{h})) . \quad (74)$$

¹⁾ Die Beziehungen (73) und (74) folgen sofort aus dem Faltungstheorem. Denken wir uns aber den oben erwähnten Grenzübergang $B \rightarrow \infty$ ausgeführt, so existieren nur noch die Korrelationsfunktionen; die Fouriertransformierte einer Rauschverteilung f existiert nicht mehr, da sie nicht absolut integrierbar ist auf der unbegrenzten Fläche. Die wesentliche Aussage des Wiener-Khinchin Theorems⁵⁴ ist nun, daß wenigstens die Korrelationsfunktionen Fouriertransformierte besitzen, daß weiterhin also eine Frequenzdarstellung der Rauschvorgänge möglich ist.

Das Wienerspektrum ermöglicht eine vollständige Beschreibung der statistischen Eigenschaften einer Ausgangsverteilung f . Als rein reelle Verteilung vermittelt es keine Phaseninformation, entsprechend der Informationsreduktion bei der Bildung der Autokorrelationsfunktion.

Aus der Beziehung (73) und (62) folgt das Parsevalsche Theorem⁵⁴

$$\Phi_{ff}(\sigma) = \iint f^2(\vec{r}') d\vec{r}' - \bar{f}^2 = \sigma_f^2 = \iint W(\vec{h}) d\vec{h}, \quad (75)$$

d.h. $W(\vec{h})$ gibt den aus dem jeweiligen Ortsfrequenzbereich kommenden Beitrag zum mittleren Schwankungsquadrat.

Bei der Analyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen haben wir es mit einer Überlagerung der vom Objekt stammenden systematischen Verteilung und einer Rauschverteilung zu tun.

$$b'(\vec{r}) = b(\vec{r}) + n(\vec{r}). \quad (76)$$

$b(\vec{r})$ ist die Bildverteilung, die sich ohne Rauschen ergeben würde. Die Bedeutung der Korrelationsintegrale für die Bildanalyse ergibt sich bei Annahme einer bestimmten Rauschverteilung: Weißes Gaußsches Rauschen (Varianz σ_n). Dies entspricht der Annahme von vielen unabhängig zusammenwirkenden Störquellen und der Unabhängigkeit zwischen den Rauschbeiträgen an verschiedenen Punkten⁷⁾.

$$p(n(\vec{r})) = \exp\left[-\frac{n^2(\vec{r})}{2\sigma_n^2}\right] = \exp\left[-\frac{(b' - b)^2}{2\sigma_n^2}\right]. \quad (77)$$

In diesem Fall läßt sich die Wahrscheinlichkeit dafür bestimmen, daß bei Vorliegen einer Bildverteilung $b'(\vec{r})$ eine bestimmte Signalverteilung $b_i(\vec{r})$ vorlag^{29e,55}. Haben die verschiedenen, zur Auswahl kommenden Signalverteilungen $b_i(\vec{r})$ ungefähr gleiche a-Priori-Wahrscheinlichkeiten, so läßt sich zeigen, daß die gesuchte Wahrscheinlichkeit für die Signalverteilung den größten Wert hat, für die

$$\Phi_{b_i b'}(0) = \iint b_i(\vec{r}') b(\vec{r}') d\vec{r}' \text{ maximal wird.} \quad (78)$$

⁷⁾ Nach dem Samplingtheorem sind die Funktionswerte auf jeden Fall abhängig, wenn sie dichter als die Samplingpunkte zusammenliegen. Mit „verschiedene Punkte“ sind deshalb hier die Samplingpunkte gemeint.

Demnach kann der Wert des Kreuz-Korrelationsintegrals (78) als Kriterium für die Prüfung der Hypothese dienen, b' sei durch einen weißen, gaußschen Rauschprozess aus einem b_i hervorgegangen.

Der Sachverhalt ist in unserem Anwendungsfall insofern komplizierter, als wir die Ausgangsverteilungen b_i nicht kennen, sondern nur eine weitere gestörte Bildverteilung b'' .

Wir können jedoch auf dieselben Voraussetzungen zurückkommen:

Wegen
$$b' = b_i + n_1, \tag{79}$$

$$b'' = b_i + n_2$$

ist
$$b'' = b' - n_1 + n_2,$$

d.h. wir betrachten die Hypothese, das eine gestörte Bild sei die Signalverteilung und das andere durch einen zweistufigen Rauschprozess über ein bestimmtes b_i , einen Zwischenzustand, aus ihm hervorgegangen¹⁾.

Das ist äquivalent der Hypothese, beide Bildverteilungen stammten (von ein und demselben nicht näher bekannten b_i (= Hypothese H).

$n' = -n_1 + n_2$ ist nach dem Faltungstheorem für Wahrscheinlichkeitsdichten^{53b} wieder gaußverteilt, mit der doppelten Varianz wie n_1 bzw. n_2 in (77).

Wieder haben wir als Kriterium für die Wahrscheinlichkeit der Hypothese (H) den zu (78) analogen Ausdruck

$$\Phi_{b'b''} = \iint b'(\vec{r}') b''(\vec{r}') d\vec{r}'. \tag{80}$$

Betrachtet man reale Schwärzungsverteilungen einer elektronenmikroskopischen Aufnahme, so ergeben sich gewisse Komplikationen, die aus der Quantennatur der an Abbildung und Registrierung beteiligten Prozesse resultieren. Aus der Diskussion dieser Prozesse in den Abschn. 1.5., 1.6. folgt, daß die Beschreibung der Schwärzungsverteilungen durch eine kontinuierliche Funktion nur eine Näherung darstellt. Der Einfachheit halber werden in der folgenden Besprechung der Anwendungen der Korrelationsanalyse ausschließlich kontinuierliche Verteilungen angenommen, aus denen die Messung eine diskontinuierliche „Probe“ ausschneidet. Erst am Schluß, bei der Darstellung der Korrelationsanalyse im Lichtdiffraktometer,

¹⁾ Den einen Rauschprozess betrachten wir also formal als umgekehrt verlaufen als in Wirklichkeit

wird eine Erörterung der Komplikationen folgen, die sich beim Übergang zu den realen Verteilungen ergeben (Abschn. 5.3.).

Dieses Vorgehen entspricht tatsächlich einem Unterschied der Messungen: Im einen Fall führt bereits die Mittelung über die Meßblende im Photometer zu einer geglätteten Funktion; im anderen Fall wird im Lichtdiffraktometer die reale Kornverteilung wirksam.

4.2. Anwendungen

4.2.1. Anwendung der Korrelationsanalyse für das Bilddifferenzverfahren

Wir gehen aus von zwei Aufnahmen, die vom selben Objekt herrühren. Das Objekt kann sich in der Zeit zwischen den Aufnahmen verändert haben, durch eine Zielpräparation, durch Kontamination oder andere strukturverändernde Vorgänge. Die elektronenoptischen Abbildungsparameter sollen sich nicht ändern in dieser Zeitspanne¹⁾.

Weiter seien die Bildstellen, die jeweils von der Abbildung derselben Objektstellung herrühren, um einen unbekanntem Vektor \vec{r}_D verschoben. Dagegen soll die Winkelorientierung der beiden photometrierten Bereiche exakt gleich sein. Wie bereits in Abschn. 3.3. ausgeführt, ist diese Übereinstimmung anhand von weit entfernten „Marken“ einigermaßen genau zu erreichen.

Eine wesentliche Verbesserung könnte durch eine rechnerische Orientierungszuordnung erreicht werden, die zweckmäßigerweise vor der translatorischen Zuordnung ausgeführt wird. Ähnlich wie in der Faltmolekülmethode⁴² die Pattersonfunktion eines bekannten Molekülteils in die der Elementarzelle „eingepaßt“ wird, sollten sich die Autokorrelationsfunktionen der beiden Aufnahmen durch Rotation annähernd ineinander überführen lassen. Man kann erwarten, daß die Autokorrelationsfunktion der Aufnahme eines amorphen Objekts genügend strukturiert ist. Es hat sich gezeigt, daß diese Vermutung richtig ist (s. Abschn. 8.2.).

Das Objekt sei durch eine Phasenstrukturverteilung $o(\vec{r})$ beschrieben. Daraus erhalten wir die Bildverteilung nach (12) durch Faltung mit der Bildpunktfunktion

$$b(\vec{r}) = o(\vec{r}) \widehat{s(\vec{r})}. \quad (81)$$

Die Transformierte von $s(\vec{r})$ ist die (Phasenkontrast-)Übertragungsfunktion $S(\vec{h}) = \sin \gamma(\vec{h})$.

¹⁾ Diese Voraussetzung kann man fallenlassen, wenn man auf eine nachfolgende Rekonstruktion des Differenzbildes verzichtet. Für die gegenseitige Zuordnung der beiden Aufnahmen spielt sie keine Rolle. Sie wird jedoch wichtig, wenn man quantitative Aussagen über die Ähnlichkeit der neu zukommenden Struktur ableiten will (s. Abschn. 4.2.1.2).

Wir beschreiben die stattgefundenene Objektveränderung mit $\Delta o(\vec{r})$ und nehmen noch an, daß das Rauschen additiv ist. Die Additivität des Rauschvorgangs ist nur in der hier interessierenden linearen Näherung (s. Abschn. 1.1.) für den Übergang von Amplituden zu Intensitäten in der Bildebene gegeben (Näheres dazu s. Abschn. 1.7.).

Die beiden Bildverteilungen werden demnach beschrieben durch

$$b_1 = \widehat{o s} + n_1 , \quad (82)$$

$$b_2 = (o + \Delta o) \widehat{s \delta(\vec{r} - \vec{r}_D)} + n_2 .$$

Wir bilden nun das Kreuz-Korrelationsintegral nach (61)

$$\begin{aligned} \Phi_{b_1 b_2} &= b_1 * b_2 = (\widehat{o s}) * [(o + \Delta o) \widehat{s \delta(\vec{r} - \vec{r}_D)}] \\ &\quad + n_1 * [(o + \Delta o) \widehat{s \delta(\vec{r} - \vec{r}_D)}] \\ &\quad + (\widehat{o s}) * n_2 \\ &\quad + n_1 * n_2 \\ &\equiv \alpha + \beta . \end{aligned} \quad (83)$$

Es läßt sich zerlegen in einen „Signalanteil“ α und einen „Rauschanteil“ β , dessen einzelne Summanden mindestens einen Rauschfaktor enthalten.

Wir behandeln zunächst α :

$$= [(\widehat{o s}) * (\widehat{o s})] \widehat{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D)} + [(\widehat{o s}) * (\Delta o \widehat{s})] \widehat{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D)} . \quad (84)$$

Der erste Term ist die um \vec{r}_D verschobene Autokorrelationsfunktion des ungestörten Bildes. Bei Benutzung der Fourier-Darstellung der Korrelations- bzw. Faltungsoperationen können wir stattdessen auch schreiben

$$\widehat{(o * s)} * \widehat{(o * s)} = F^{-1}\{OS(OS)^*\} = F^{-1}\{OO^*SS^*\} = (o * o) \widehat{(s * s)}, \quad (85)$$

d.h. diese entsteht durch Faltung der AKF der Objektverteilung mit der AKF der Bildpunkt-funktion.

Der zweite Term enthält die ebenfalls um \vec{r}_D verschobene Kreuzkorrelationsfunktion, die sich ähnlich umformen läßt in

$$(o * \Delta o) \widehat{(s * s)}, \quad (86)$$

d.h. sie entsteht durch Faltung der KKF der Objektverteilung und der die Objektänderung beschreibenden Verteilung mit der AKF der Bildpunkt-funktion.

Der Rauschanteil β besteht aus 3 Termen, die alle keinen systematischen Beitrag zur KKF liefern. Das ist am einfachsten zu erkennen, wenn wir unverschobene Bilder annehmen ($\vec{r}_D = (0,0)$):

Damit im Nullpunkt einer KKF Φ_{fg} ein Beitrag entstehen kann, ist es notwendig, daß zwischen den Transformaten F, G der jeweils zu korrelierenden Funktion f, g eine feste Phasenbeziehung besteht; diese Bedingung muss zumindest für einige Gebiete der reziproken Ebene erfüllt sein.

Der Nullpunktsbeitrag ist

$$\begin{aligned} \Phi_{fg}(0) &= \iint FG^* d\vec{h} = \iint |F||G|e^{i\varphi_1 - i\varphi_2} d\vec{h} \\ &= \iint |F||G| \cos(\varphi_1 - \varphi_2) d\vec{h}, \end{aligned} \quad (87)$$

$$\text{wegen} \quad F = |F|e^{i\varphi_1}, \quad (88)$$

$$G^* = |G|e^{-i\varphi_2},$$

$$F(-\vec{h}) = F^*(\vec{h}) = |F|e^{-i\varphi_1},$$

$$G^*(-\vec{h}) = G(\vec{h}) = |G|e^{i\varphi_2}.$$

Werte mit einer festen Phasendifferenz ungleich $\frac{\pi}{2}, \frac{3\pi}{2}$ tragen also zum Peak im Nullpunkt bei. Ist dagegen eine von beiden Funktionen die Transformierte einer Rauschfunktion, so ist die Phase dieser Funktion und damit auch die Phasendifferenz in (87) gleichmäßig statistisch verteilt im Intervall $\{0, 2\pi\}$.

Da zwischen den Phasendifferenzen und den Größen $|F||G|$ keine statistische Abhängigkeit besteht, können wir in (87) den Mittelwert des Produkts durch das Produkt der Mittelwerte ersetzen (vgl. (72)):

$$\Phi_{fg}(0) = \iint |F||G| d\vec{h} \cdot \iint \cos(\varphi_1(\vec{h}) - \varphi_2(\vec{h})) . \quad (89)$$

Die Integration über \vec{h} im 2. Term läßt sich bei bekannter Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\Delta\varphi)$ ersetzen durch eine Integration über $\Delta\varphi$:

$$\iint \cos(\varphi_1(\vec{h}) - \varphi_2(\vec{h})) d\vec{h} = \frac{\int_0^{2\pi} p(\Delta\varphi) \cos(\Delta\varphi) d\Delta\varphi}{\int_0^{2\pi} p(\Delta\varphi) d\Delta\varphi} . \quad (90)$$

Dieser Ausdruck verschwindet bei Annahme einer Gleichverteilung $p(\Delta\varphi) \equiv 1$, d.h. $\Phi_{fg}(0) = 0$.

Der Übergang in (90) ist streng genommen nur dann korrekt, wenn die Integration tatsächlich bis unendlich ausgeführt wird. Haben wir jedoch - wie in der Praxis stets - eine endliche Integrationsgrenze, so braucht der Ausdruck in (90) nicht mehr exakt zu verschwinden.

Wir haben also gezeigt, daß in (83) der „Rauschbeitrag“ zum Kreuzkorrelationsintegral verschwindet, bis auf die zuletzt genannte Einschränkung.

Für einen späteren Vergleich (Abschn. 5.3.) soll das gesamte Integral (83) nochmals, unter der Benutzung der Umformung (85) ausgeschrieben werden:

$$\begin{aligned} \Phi_{b_1 b_2} &= \overbrace{\Phi_{oo}} \overbrace{\Phi_{ss}} \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) + \overbrace{\Phi_{o\Delta o}} \overbrace{\Phi_{ss}} \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) \\ &+ \overbrace{\Phi_{n_1 o}} \overbrace{s} \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) + \overbrace{\Phi_{n_1 \Delta o}} \overbrace{s} \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) \\ &+ \overbrace{\Phi_{on_2}} \overbrace{s} \\ &+ \Phi_{n_1 n_2} . \end{aligned} \quad (91)$$

4.2.1.1. Genauigkeit der Positionsbestimmung

Wir betrachten nun genauer den „Signalanteil“, der - bis auf die Verschiebung - durch die Ausdrücke (85) und (86) gegeben ist.

Zunächst interessiert die Frage, wie genau die Verschiebung des Peaks festgestellt werden kann. Die Feststellung ist offenbar umso genauer, je schärfer dieser Peak ausfällt.

Bei idealer Übertragungsfunktion wird die Bildfunktion und demnach ihre AKF zu einer δ -Funktion. In der Nähe des Nullpunkts ist dann ϕ_{oo} ausschließlich durch die AKF des „idealen Atombildes“ gegeben. Die endliche Größe dieses Bildes entsteht durch den Abfall des Atomformfaktors für kohärente elastische Streuung mit wachsenden Streuwinkeln.

Mit diesem Peak haben wir im realen Fall die AKF der Bildpunktfunktion zu falten. Je nach der Wahl der elektronenoptischen Parameter wird nun der Peak der AKF verschieden stark verbreitert. Wir wissen von den Berechnungen der Bildpunktfunktionen für verschiedene Parameter^{5,13}, daß die Halbwertsbreite des zentralen Bildpunktextremums beträchtlich über der bisherigen Auflösungsgrenze des Elektronenmikroskops liegen kann. Diese Halbwertsbreite bestimmt nun im konkreten Fall die Genauigkeit, mit der eine laterale Zuordnung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen möglich ist. Es hat sich aber gezeigt (s. Abschn. 4.6.), daß die Zuordnung auch in ungünstigen Fällen (große Defokussierung) besser ist als die Distanz, die der Auflösungsgrenze entspricht.

Daneben bewirkt die unterschiedliche Höhe des zentralen Bildpunktextremums bei verschiedenen elektronenoptischen Bedingungen, daß der AKF-Peak $\phi_{ss}(0)$ unterschiedliche Werte besitzt. Demnach kann die Varianz von Bildverteilungen von verschiedenen Objekten nur dann sinnvoll verglichen werden, wenn die Übertragungsfunktion die gleiche ist.

Die Größe von $\phi_{ss}(0)$ ist nach dem Parsevalschen Theorem gegeben durch

$$\frac{\lambda^2}{\pi \vartheta_{Ap}^2} \iint_{Ap} \sin^2 \gamma \, d\vec{h} = \frac{2}{\vartheta_{Ap}^2} \int_0^{\vartheta_{Ap}} \sin^2 \gamma \, \vartheta d\vartheta. \quad (92)$$

Sie ist identisch mit einer Linfotschen Bildgütefunktion⁵⁶ im Fall statistischer Objekte, dem sog. relativen Strukturgehalt. Sie interessiert in einem anderen Zusammenhang (Abschn. 7.1) und wird dort ausführlich behandelt.

4.2.1.2. Zur Bestimmung des Korrelationskoeffizienten

Um zu einer quantitativen Aussage über die Größe (86) und damit über das Ausmaß der Objektveränderung Δo zu kommen, können wir (85)

$$(o * o) \widehat{=} (s * s)$$

versuchsweise vergleichen mit der AKF des durch Rauschen gestörten Bildes, die wir berechnen können.

$$\Phi_{bb} = (\widehat{o * o}) (\widehat{s * s}) + n_1 * n_1 + 2n_1 * (\widehat{o s}) . \quad (93)$$

Der erste Term ist mit (85) identisch; der dritte Term liefert nach den obigen Überlegungen keinen Beitrag. Dagegen kann der zweite Term nicht vernachlässigt werden. Sein Wert im Nullpunkt ist nach dem Parsevalschen Theorem (s. Abschn. 4.1.) durch das Integral über das Wienerspektrum gegeben; setzen wir ein „weißes“ Wienerspektrum voraus, so besteht die AKF nur aus diesem δ -artigen Beitrag.

Diese Tatsache kann nun zusammen mit der oben erwähnten „Verschmierung“ des AKF-Peaks von $(o * o)$ benutzt werden, um den gesuchten Anteil (85) in (93) abzuspalten:

$$\Phi_{b_1 b_1}(\vec{\varepsilon}) \approx (\widehat{\Phi_{oo} \Phi_{ss}})_{r=0} , \quad (94)$$

wobei $\vec{\varepsilon}$ ein Vektor von kleinem Absolutbetrag ist.

Wie groß $\vec{\varepsilon}$ zu einer sauberen Trennung des Rausch-AKF-Peaks sein muß, läßt sich erst im Experiment bestimmen. Dazu eignet sich die Berechnung der AKF einer frei mit Elektronen belichteten Platte. In diesem Fall haben wir eine Schwärzungsverteilung, die nur durch die Elektronen-, Kornhaufen- und Kornstatistik gegeben ist (s. Abschn. 8.2.1.).

Wir können schon jetzt abschätzen, wie groß der Durchmesser der größten statistisch abhängigen Nachbarbereiche in der Schwärzungsverteilung einer solchen Platte ist:

Er ist gegeben durch die laterale Reichweite aller von einem primären Elektron ausgelösten Prozesse, die überhaupt zu einer Kornbildung führen können, d.h. dem Durchmesser des „Lichthofs“. Er beträgt bei den Emulsionen, die in der Höchstauflosungselektronenmikroskopie verwendet werden, max. 20 μm (s. auch Abschn. 1.6.).

Bei Verwendung einer Photometerblende von 15 μm und einer Abtastweite von 20 μm besteht die AKF einer solchen Verteilung also tatsächlich nur aus einem Beitrag im Nullpunkt. Danach sollte es zur Abtrennung dieses Peaks genügen, eine Einheit vom Nullpunkt abzurücken:

$$\text{z.B. } \vec{\varepsilon} = (20 \mu\text{m}, 0)$$

d.h. in unmittelbarer Nähe des Nullpunkts ist der Beitrag von $n_1 * n_1$ bereits auf Null abgesunken; der Beitrag von

$$(\widehat{o * o}) (\widehat{s * s})$$

bleibt dagegen nahezu unverändert gleich dem Wert im Nullpunkt.

Damit ist uns jetzt der Ausdruck (86) bekannt

$$[(o * \Delta o) \widehat{(s * s)}]_{r=0} = \Phi_{b_1 b_2}(\vec{r}_D) - \Phi_{b_1 b_1}(\vec{\varepsilon}) . \quad (95)$$

Wir können (95) verstehen als Meßvorschrift für die Bestimmung der Kreuzkorrelationsfunktion von Objekt und Objektveränderung im Nullpunkt.

Den zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten erforderlichen Nullpunktwert der AKF,

$$[(\Delta o * \Delta o) \widehat{(s * s)}]_{r=0}$$

können wir ähnlich aus $\Phi_{b_2 b_2}$ bestimmen.

Zunächst ist

$$\Phi_{b_2 b_2} = (o * o) \widehat{(s * s)} + (\Delta o * \Delta o) \widehat{(s * s)} + 2(o + \Delta o) \widehat{(s * s)} + n_2 * n_2 . \quad (96)$$

Unter der Verwendung von (95) folgt daraus, mit derselben Argumentation wie bei der Ableitung von (95)

$$[(\Delta o * \Delta o) \widehat{(s * s)}]_{r=0} \approx \Phi_{b_2 b_2}(\vec{\varepsilon}) - \Phi_{b_1 b_1}(\vec{\varepsilon}) - 2\Phi_{b_1 b_2}(\vec{r}_D) - \Phi_{b_1 b_1}(\vec{\varepsilon}) \quad (97)$$

$$= \Phi_{b_2 b_2}(\vec{\varepsilon}) + \Phi_{b_1 b_1}(\vec{\varepsilon}) - 2\Phi_{b_1 b_2}(\vec{r}_D) .$$

Speziell interessieren wir uns für den Korrelationskoeffizienten $\rho(o, \Delta o)$

Für seine Berechnung haben wir zu bilden

$$\rho = \frac{[\Phi_{o\Delta o} \widehat{\Phi_{ss}}]_{r=0}}{\sqrt{[\Phi_{\Delta o\Delta o} \widehat{\Phi_{ss}}]_{r=0}} \sqrt{[\Phi_{oo} \widehat{\Phi_{ss}}]_{r=0}}} \quad (98)$$

Die in (98) auftretenden Ausdrücke sind aus (94), (95) und (97) bereits bekannt.

Der Ausdruck (98) ist abhängig von der jeweiligen Übertragungsfunktion. Um also Korrelationskoeffizienten für verschiedene Differenzanalysen untereinander zu vergleichen, muß die Bildpunktfunktion bzw. die Übertragungsfunktion annähernd die gleiche sein. Am günstigsten liegt der Fall bei der Auswertung von mehreren Aufnahmen einer Serie mit unveränderter Einstellung (z.B. eine Kontaminationsserie, s. Abschn. 8.2.). Je nachdem, ob $\rho = 0$ ist oder signifikant von Null verschieden ist, können wir von einer unkorrelierten oder von einer korrelierten Strukturveränderung sprechen. Eine korrelierte Strukturveränderung liegt z.B. bei epitaktischem Aufwachsen vor, deshalb könnte $\rho \neq 0$ ein Hinweis auf Epitaxie sein.

In (18) erhalten wir nur eine Vereinfachung, wenn wir das Objekt als atomar aufgebaut betrachten, mit Atomen derselben Art. In diesem Fall ist die AKF in Nullpunktnähe einfach aufgebaut aus Vielfachen der AKF eines „Atombildes“:

o sei aufgebaut aus N Atomen, Δo aus ΔN Atomen; die AKF eines Atombildes sei $a * a$, dann ist in der Nähe des Nullpunkts der AKF bzw. KKF

$$o * o = N \cdot a * a, \quad (99)$$

$$\Delta o * \Delta o = \Delta N \cdot a * a, \quad (100)$$

$$\Delta o * \Delta o = N' \cdot a * a, \quad 0 \leq N' \leq \Delta N \quad (101)$$

für die N' Fälle, in denen Atom-Projektionen der Kontaminations-Struktur in unmittelbarer Nähe zu denen der ursprünglichen Struktur liegen.

In dieser Interpretation wird einfach

$$\rho = \frac{N'}{\sqrt{N \cdot \Delta N}} \quad (102)$$

unabhängig von der Übertragungsfunktion.

Da wir hierbei die möglichen Verschiebungen der N' Atome nicht berücksichtigt haben, stellt diese Betrachtung allerdings eine starke Vereinfachung dar. Jedenfalls ist die Ungleichung $\rho \leq \sqrt{\frac{\Delta N}{N}}$ stets erfüllt, da die Beiträge im Zähler von (102) nur kleiner werden können, und wegen der Gültigkeit von (101).

4.2.2. Laterale Zuordnung von Aufnahmen einer Defokus-Serie

Bei der gegenseitigen Zuordnung von Aufnahmen desselben Objektbereichs mit verschiedener Defokussierung interessiert vor allem, wie gut der verschobene Korrelations-Peak sich von seiner Umgebung abhebt. Anstelle von (82) haben wir den Ansatz

$$b_1 = \widehat{o} s_1 + n_1 , \quad (103)$$

$$b_2 = \widehat{o} s_2 + n_2 .$$

Für die Anwendung eines Bildrekonstruktionsverfahrens ist man bei der Aufnahme der Serie daran interessiert, Objektveränderungen innerhalb der Aufnahmezeit möglichst auszuschließen, deshalb wurde ein Term Δo in (103) nicht eingeführt. Von der Diskussion im vorigen Abschnitt her wissen wir, daß ein solcher Term lediglich einen weiteren Beitrag zum verschobenen Peak liefert, für die Bestimmung seiner Position also unwesentlich ist. Indem wir von vorneherein die nach Abschn. 4.2.1. unkorrelierten Beiträge der Rauschfunktionen weglassen, erhalten wir

$$\Phi_{b_1 b_2} = (\widehat{o} s_1) * [\widehat{o} s_2 \delta(\vec{r} - \vec{r}_D)] = [(\widehat{o} * \widehat{o}) (s_1 * s_2)] \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) . \quad (104)$$

Hierbei wurde von der bereits bei der Ableitung von (85) benutzten Umformung

$$(\widehat{o} S_1) \cdot (\widehat{o} S_2)^* = (\widehat{o} \widehat{o}^*) \cdot (S_1 S_2) \quad (104a)$$

Gebrauch gemacht.

Neu ist in (104) lediglich das Auftreten der Kreuzkorrelationsfunktion zweier verschiedener Bildpunktfunktionen.

$\Phi_{s_1 s_2}$ ist eine zentrosymmetrische Funktion, denn für

$$S_1(\vec{h}) = \sin \gamma_1(\vec{h}) , \quad (105)$$

$$S_2(\vec{h}) = \sin \gamma_2(\vec{h})$$

$$\text{gilt } S_{1,2}(-\vec{h}) = S_{1,2}(\vec{h})$$

als Sonderfall des Friedelschen Satzes für eine rein reelle Funktion.

Aufgrund des Parsevalschen Theorems und wegen (105) können wir statt $\Phi_{s_1 s_2}(0)$ das Integral

$$y = \frac{\lambda^2}{\pi \vartheta_{Ap}^2} \iint_{Ap} \sin \gamma_1(\vec{h}) \sin \gamma_2(\vec{h}) d\vec{h}$$

betrachten, oder bei Fehlen von Astigmatismus

$$y = \frac{2}{\vartheta_{Ap}^2} \int_0^{\vartheta_{Ap}} \sin \gamma_1 \sin \gamma_2 \vartheta d\vartheta. \quad (106)$$

Dieses Integral kann, unabhängig von der Wahl des Wertetripels $(\vartheta_{Ap}, \Delta f_1, \Delta f_2)$ alle Werte zwischen -1 und +1 annehmen.

Mit anderen Worten: Der gesuchte Korrelationspeak kann positiv oder negativ werden und in einigen Fällen sogar ganz verschwinden. (s. Abb. 5; für feste $\Delta f_1, \Delta f_2$ ist y in Abhängigkeit von ϑ_{Ap} aufgetragen.)

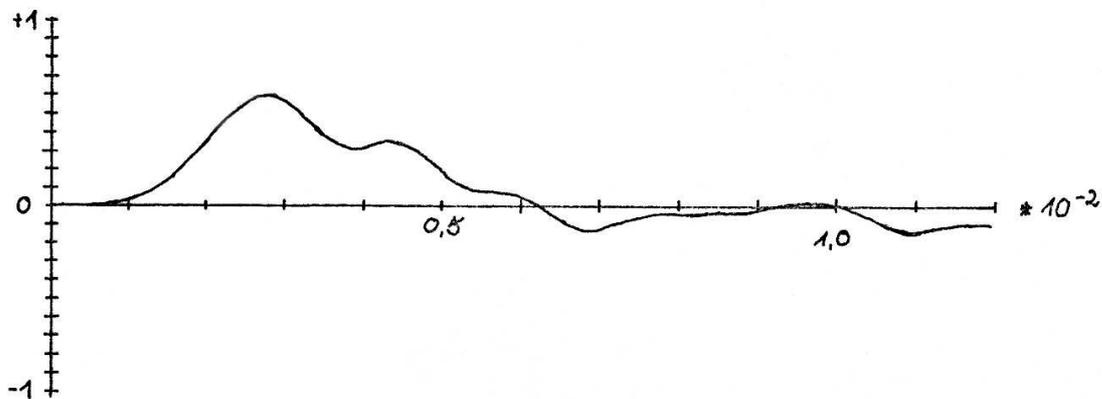


Abbildung 5: Höhe des Korrelationspeaks in Abhängigkeit von der Aperturöffnung ($\Delta f_1 = 3\,000 \text{ \AA}$, $\Delta f_2 = 4\,000 \text{ \AA}$)

Die gegenseitige Zuordnung der Aufnahmen im Computer wird also unter Umständen sehr erschwert. Man kann sich aber dadurch helfen, daß man in zweifelhaften Fällen die Berechnung von $\Phi_{b_1 b_2}(0)$ nach Einführung einer „künstlichen Apertur“, d.h. durch Abschneiden der Fouriertransformierten, wiederholt. Bei den üblichen Werten von C_0 gilt nämlich in einem größeren Bereich um den Nullpunkt der reziproken Ebene ($\approx \vartheta \leq 0,2 \cdot 10^{-2}$)

$$\text{sign}\{\sin \gamma\} = -\text{sign}\{\Delta f\}, \quad (107)$$

d.h. $\sin \gamma_1 \sin \gamma_2$ hat in diesem gesamten Bereich ein einheitliches Vorzeichen $\text{sign}\{\Delta f_1\} \text{sign}\{\Delta f_2\}$, trägt also zum Korrelationspeak im gleichen Sinne bei.

Um z.B. im Beispiel der Abb. 5 einen Korrelationspeak mit relativ großem Absolutbetrag zu erzwingen, genügt es, die Fouriertransformierte auf einem Bereich von etwa $\vartheta_{Ap} \leq 0,25 \cdot 10^{-3}$ zu begrenzen. Allerdings wird der so erhaltene Peak recht flach, und die Positionsbestimmung entsprechend ungenau ausfallen.

Eine andere Möglichkeit bietet sich an, wenn die elektronenoptischen Parameter der beiden Aufnahmen bereits bekannt sind, etwa durch Anwendung des Least-Square-Verfahrens (s. Abschn. 7.6.). In diesem Fall kann man die Fourier-Bereiche ermitteln, in denen $\sin \gamma_1$ und $\sin \gamma_2$ unterschiedliches Vorzeichen haben („destruktive“ Beiträge zu (106)) und in diesen Bereichen das Vorzeichen der Fourierkoeffizienten umkehren.

Durch diesen Eingriff ersetzen wir den „Übertragungsteil“ des Spektrums in (104a), $S_1 S_2^* = S_1 S_2$ durch

$$|S_1 S_2| = |S_1| \cdot |S_2|$$

und lassen den „Strukturanteil“ 00^* unverändert. Das Integral (106) wird nun positiv definit⁷⁾.

Das von Hoppe, Langer und Thon vorgeschlagene Halbblendenverfahren⁵¹ ermöglicht die vollständige Rekonstruktion der Objektstruktur und ist besonders interessant, wenn die Atomstreuamplituden einer Atomsorte wesentliche imaginäre Anteile besitzen.

Die beiden, durch Ausblenden komplementärer Bereiche in der Aperturebene entstandenen Intensitätsverteilungen besitzen nach⁵¹ die Fouriertransformierten

$$B_I(\vec{h}) = ie^{i\gamma} F(\vec{h}) \text{ und } B_{II}(\vec{h}) = -ie^{-i\gamma} F(-\vec{h}). \quad (108)$$

Hierbei ist $F(\vec{h}) \neq F^*(-\vec{h})$, da die Atomstreuamplitude komplex ist. (Der Friedelsche Satz ist ungültig.)

Die zur Zuordnung der Aufnahmen notwendige Korrelation führt, bis auf den Verschiebungsterm, auf den Ausdruck

⁷⁾ Man kann die Funktion $\Phi_{s_1 s_2}(\vec{r}) = F^{-1}\{\sin \gamma_1 \sin \gamma_2\}$ jetzt als Kreuzkorrelationsfunktion von zwei rekonstruierten Bildpunkten verstehen, die unter Besetzung der einfachen Filterfunktionen

$$S_i' = \begin{cases} +1 & \sin \gamma_i > 0 \\ -1 & \sin \gamma_i < 0 \end{cases} \quad i = 1, 2 \text{ entstanden (s. Abschn. 7.2.).}$$

$$F^{-1}\{B_I B_{II}^*\} = F^{-1}\{-e^{2iy} F(\vec{h}) F^*(-\vec{h})\}. \quad (109)$$

Bedeutend günstiger ist es, in diesem Fall stattdessen den Faltungsausdruck

$$F^{-1}\{B_I B_{II}\} = F^{-1}\{F(\vec{h}) F(-\vec{h})\} \text{ zu bilden,} \quad (110)$$

der unabhängig ist von der Pupillenfunktion e^{iy} und deshalb einen besonders scharfen Peak besitzen sollte.

Die laterale Zuordnung von Aufnahmen verschiedener Defokussierung ist - mit geringer Genauigkeit - auch mit Hilfe des Lichtdiffraktometers möglich. Die entstehenden Diffraktogramme veranschaulichen darüber hinaus die Unterschiede in der Kontrastübertragung bei der Aufnahmen. Eine ausführliche Darstellung wird in Abschn. 5.6. folgen.

4.2.3. Anwendung für die Beurteilung der Auflösung

Schließlich soll diskutiert werden, wieweit die Korrelationsmethoden für die Beurteilung des Auflösungsvermögens von Interesse sind.

Zunächst einmal bietet die Autokorrelationsfunktion die Möglichkeit, direkt die AKF des realen, in der Bildverteilung versteckten Bildpunkts zu ermitteln.

Für eine gute Auflösung müssen wir fordern, daß die Halbwertsbreite des zentralen Maximums klein ist und daß die AKF möglichst geringe Nebenmaxima besitzt.

Da die AKF einer Bildverteilung jedoch Beiträge vom Rauschanteil enthält (s. die Zerlegung in (93)), ist es eher angebracht, die KKF von zwei unmittelbar nacheinander belichteten Aufnahmen eines Objektbereichs bei unveränderter Einstellung des Elektronenmikroskops zu betrachten. In diesem Fall sind wir sicher, daß der - im allgemeinen verschobene - Peak ausschließlich von der elektronenmikroskopischen Abbildung herrührt und von den nachfolgenden photographischen Prozessen nicht beeinflußt wird.

Die klassischen Auflösungsdefinitionen gehen aus von der Betrachtung der kohärenten bzw. inkohärenten Überlagerung zweier benachbarter Bildpunkte (vgl. ⁵⁷). Sind die beiden Zentral-Maxima noch signifikant getrennt, so werden die Bildpunkte bzw. die ihnen entsprechenden Objektpunkte als aufgelöst bezeichnet. Die Definition ist nur praktikabel, wenn zwei isolierte „Objektpunkte“ realisiert werden können (etwa in der Lichtoptik zwei Lochblenden). Sie versagt aber, wenn eine konkrete Bildverteilung bei unbekanntem Objekt vorliegt; d.h. es existiert dann keine Meßvorschrift mehr. Wegen der nicht-apodisierten Gestalt der Bildpunkte ist es nämlich unzulässig, ein beliebiges Paar von Maxima bzw. Minima aus der Bildverteilung her auszugreifen und umgekehrt einem Paar von Objektpunkten zuzuordnen. Vielmehr stellt die

Annahme, zwei benachbarte Bild-Extrema stammten von genau zwei Objektpunkten, eine Hypothese dar, die nur durch zusätzliche a-priori-Information über die Objektstruktur gerechtfertigt werden kann (vgl. die Kritik von Toraldo di Francia⁵⁸).

Anders ist es, wenn wir die Gestalt des zentralen Maximums der KKF heranziehen. Im Nullpunkt bzw. im verschobenen Nullpunkt der KKF kommen alle Bildpunktzentren der beiden Bildverteilungen exakt gegenseitig zur Deckung. Die Funktionswerte außerhalb des Nullpunkts der KKF geben an, wie stark sich ein Bildpunkt überlappt, d.h. sie geben eine Antwort auf die Frage, ob sich zwei um diesen Betrag verschobene Bildpunkte voneinander trennen lassen oder nicht.

Freilich geht bei der Bildung der KKF die Information darüber verloren, mit welcher Signifikanz die Trennung eines einzelnen Bildpunktes aus seiner Umgebung möglich ist.

Es ist bereits erwähnt worden, daß die Gestalt der Bildpunktfunktionen stark von den elektronenoptischen Parametern abhängig ist. Das Punktauflösungsvermögen wird demnach bestimmt von den Geräteeigenschaften (Stabilität, sekundäre Fehler) und von den von Aufnahme zu Aufnahme verschiedenen Parametern $\Delta f, \Delta f_A$.

Im Hinblick auf die durch die Bildrekonstruktion gegebenen Möglichkeiten ist es aber vor allem wichtig zu wissen, welche Auflösung durch eine geeignete Transformation der Bildverteilung im günstigsten Fall nachträglich erzielt werden kann.

Wie in Abschn. 7. später ausgeführt wird, können wir alle von der Abbildung stammenden Ortsfrequenzbeiträge nach geeigneter Gewichtung bzw. Phasenumkehrung für die Synthese eines verbesserten Bildes ausnutzen. Wir brauchen also zur Bestimmung der hypothetischen Auflösung nur zu ermitteln, welche Ausdehnung der von der elektronenmikroskopischen Abbildung herrührende Teil des Ortsfrequenzspektrums hat. Für die äußere Begrenzung dieses Bereichs wollen wir den Namen „Übertragungsgrenze“ verwenden. Die Übertragungsgrenze sollte nurmehr von den oben angeführten Geräteeigenschaften abhängen⁷⁾.

Die Lage der Übertragungsgrenze kann anhand der Modulation der Fouriertransformierten eines „statistischen Objekts“ durch die jeweilige Übertragungsfunktion abgeschätzt werden (s. Abschn. 1.4.). Diese Methode ist aber nicht generell dazu geeignet. Im Gebiet des Scherzerschen Fokus etwa besitzt ein größerer Bereich der Übertragungsfunktion überhaupt keine Nullstellen. Zudem beginnt die Übertragungsfunktion in den äußeren Bereichen des Ortsfrequenzspektrums wegen des Glieds $C_0 \vartheta^4$ in $\gamma(\vartheta, \varphi)$ schnell zu oszillieren; die Ringe folgen dort so dicht aufeinander, daß sie nicht mehr mit Sicherheit zu trennen sind.

Die Korrelationsmethoden zeigen zum einen Weg, wie man geradezu „Standardmodulationen“ des vom Elektronenmikroskop stammenden Ortsfrequenzanteils erzeugen kann, die es ermöglichen, Aufnahmen unabhängig von der jeweiligen Übertragungsfunktion unter gleichen Bedingungen zu untersuchen.

⁷⁾ Auf dem Umweg über den Farbfehler gibt es allerdings weiterhin einen Einfluß von C_0 und Δf auf die Lage der Übertragungsgrenze. Der Farbfehler wirkt sich auf die Übertragungsfunktion ähnlich wie ein Tiefpaß aus: je schneller ihre Oszillationen aufeinanderfolgen - vorwiegend in den äußeren Bereichen des Ortsfrequenzspektrums - umso stärker werden sie gedämpft. Die Schnelligkeit, mit der die Oszillationen erfolgen, wird aber gerade durch die Größe von C_0 und Δf bestimmt. Rechnen wir die Größe von C_0 zu den Geräteeigenschaften, so bleibt noch der - allerdings geringere - Einfluß der Defokussierung.

Dazu gehen wir aus von der Darstellung (103), diesmal mit $s_1 = s_2 \equiv s$.

Wir wollen also annehmen, daß wir - bis auf eine Verschiebung und verschiedene Rauschverteilungen n_1, n_2 - identische Aufnahmen vorliegen haben.

$$b_1 = \widehat{o s} + n_1, \quad (111)$$

$$b_2 = \widehat{o s} \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) + n_2.$$

Wie in (104) erhalten wir für das Kreuzkorrelationsintegral

$$\begin{aligned} \Phi_{b_1 b_2} &= [(\widehat{o * o}) (\widehat{s * s})] \widehat{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D)} + n_1 * n_2 \\ &+ n_1 * [\widehat{o s} \widehat{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D)}] \\ &+ n_2 * (\widehat{o s}). \end{aligned} \quad (112)$$

Die Fouriertransformierte von (112) lautet:

$$F\{\Phi_{b_1 b_2}\} = OO^* SS^* e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} + OSN_2^* + (OS)^* e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} \cdot N_1 + N_1 N_2^*. \quad (113)$$

Danach besitzt der erste Term eine generelle Phasenmodulation. Die Linien gleicher Phase sind parallele Geraden

$$x^* x_D + y^* y_D = \varphi_o + 2\pi n \quad (114)$$

$$n = \dots -1, 0, +1, 2 \dots$$

$$\vec{r}_D = (x_D, y_D)$$

mit der Steigung $\text{tg } \alpha = -\frac{x_D}{y_D}$, d.h. senkrecht zu dem Verschiebungsvektor \vec{r}_D , dessen Steigung $+\frac{y_D}{x_D}$ ist.

Den gegenseitigen Abstand der Geraden Δp erhalten wir aus der Hesseschen Normalform

$$x^* \cos \alpha + y^* \sin \alpha - \Delta p = 0, \quad (115)$$

$$\cos \alpha = \frac{x_D}{|\vec{r}_D|}; \quad \sin \alpha = \frac{y_D}{|\vec{r}_D|};$$

$$\Delta p = \frac{2\pi}{|\vec{r}_D|};$$

er ist demnach umgekehrt proportional zum Betrag des Verschiebungsvektors.

Dagegen besitzt der 3. Term wegen der statistischen Verteilung der Phasen von N_1 und O^* keine einheitliche Phasenmodulation; die beiden übrigen Terme ohnehin nicht, da ein modulierender Faktor fehlt.

Zur Bestimmung der Übertragungsgrenze genügt es also, die beiden Aufnahmen gegenseitig um einen bestimmten Vektor \vec{r}_D zu verschieben, der zweckmäßigerweise für alle derartigen Untersuchungen einen festen Betrag $|\vec{r}_D| = \xi$ besitzt, und in der Fouriertransformierten des Korrelationsintegrals den Bereich festzustellen, in dem eine gemeinsame Phasenmodulation $e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D}$ nachweisbar ist.

Die beschriebene Methode kann im Computer, einfacher noch im Lichtdiffraktometer durchgeführt werden (s. Abschn. 5.7.). Im letzten Fall läßt sich im Diffraktogramm direkt eine Modulation durch die Funktion $Re \{e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D}\} = \cos(2\pi \vec{h} \vec{r}_D)$ beobachten.

Sei der Verschiebungsvektor der Einfachheit halber $\vec{r}_D = (x_D, 0)$, so könnten wir für einen signifikanten Nachweis der Phasenmodulation $e^{-2\pi i x^* x_D}$ in den verschiedenen Schnitten $y^* = 3$ den Wert des eindimensionalen Fourier-Integrals

$$\int (OO^*SS^*)_{y^*=3} \cdot e^{-2\pi i x^* x} dx^* \quad \text{in } x = x_D \quad (116)$$

jeweils vergleichen mit dem Wert des entsprechenden Integrals über die Rauschbeiträge von (113). Eine solche theoretische Abschätzung ist für eine quantitative Angabe der Übertragungsgrenze nach dem beschriebenen Verfahren notwendig, führt aber über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

4.3. Bestimmung der Korrelationsintegrale

Die rechnerische Auswertung der Kreuz- und Autokorrelationsintegrale ganzer Bildverteilungen wurde erst mit der Entwicklung von Rechenanlagen mit großem Kernspeicher möglich. Es sollte darauf hingewiesen werden, daß es auch eine einfache optische Anordnung gibt, die als Analogrechner für die Bestimmung der Korrelationsfunktion benutzt werden kann⁵⁹.

Ein solches System erzeugt gleichzeitig die gesamte kontinuierliche Funktion durch inkohärente Überlagerung der einzelnen Transparenzprodukte. Käme es lediglich auf die Bestimmung des Verschiebungsvektors an, so wäre dieses Verfahren erheblich schneller und - wegen der hohen Informationsdichte - leistungsfähiger als die Rechenmethoden.

Wie später ausführlich besprochen (Abschn. 5.) haben wir einen lichtoptischen Aufbau im Zusammenhang mit der Korrelationsanalyse nur benutzt, um das Korrelationsspektrum zu beobachten, das durch kohärente Überlagerung der Fouriertransformierten der einzelnen Transparenzen entsteht.

Für die annähernde Berechnung der Korrelationsintegrale wurden die Fourier-Beziehungen (61), (62) ausgenutzt. Wegen der hohen Geschwindigkeit des verwendeten Cooley-Tukey-Programms⁶⁰ ist die doppelte Hin- und einfache Rücktransformation zusammen bei weitem schneller als der direkte Weg. Zur Berechnung einzelner Punkte der AKF, z.B. $\Phi_{ff}(0)$ oder $\Phi_{ff}(\vec{\varepsilon})$ ist es dagegen unnötig, die gesamte Funktion zu berechnen, deshalb kann hier das direkte Verfahren angewandt werden.

Im einzelnen werden folgende Ausdrücke berechnet:

$$B_{\frac{1}{2}}(h, k) = \frac{1}{N^2} \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} b_{\frac{1}{2}}(x_m, y_n) e^{2\pi i \left(\frac{mh}{N} + \frac{nk}{N} \right)}, \quad (117)$$

$$X_{12}(m', n') = \sum_{h=0}^{N-1} \sum_{k=0}^{N-1} B_1(h, k) B_2^*(h, k) e^{-2\pi i \left(\frac{m'h}{N} + \frac{n'k}{N} \right)}, \quad (118)$$

$$X_{11}(m', n') = \sum_{h=0}^{N-1} \sum_{k=0}^{N-1} B_1(h, k) B_1^*(h, k) e^{-2\pi i \left(\frac{m'h}{N} + \frac{n'k}{N} \right)}, \quad (119)$$

$$KKF = \Phi_{b_1 b_2}(x_{m'}, y_{n'}) = \chi_{12}(m', n') - B_1(0,0) B_2(0,0), \quad (120)$$

$$AKF = \Phi_{b_1 b_1}(x_{m'}, y_{n'}) = \chi_{11}(m, n) - B_2(0,0), \quad (121)$$

$$\text{wegen } B(0,0) = \frac{1}{N^2} \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} b(x_m, y_n) = \bar{b} . \quad (122)$$

Für die Berechnung einzelner Punkte

$$\Phi_{b_1 b_2}(x_{m'}, y_{n'}) = \frac{1}{N^2} \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} b_1(x_m, y_n) b_2(x_{m+m'}, y_{n+n'}) , \quad (123)$$

$$\Phi_{b_1 b_1}(x_{m'}, y_{n'}) = \frac{1}{N^2} \sum_{m=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} b_1(x_m, y_n) b_1(x_{m+m'}, y_{n+n'}) . \quad (124)$$

Dabei ist zur Konsistenz mit der Berechnung durch die Fouriertransformation nach der unten folgenden Erörterung notwendig, b_1 bzw. b_2 durch Translation zum Flächengitter zu erweitern (s. Abb. 6).

Wichtig sind wegen der entstehenden Periodizität nur die 6 anschließenden „Elementarzellen“, im Fall der AKF wegen der Zentrosymmetrie nur noch 3.

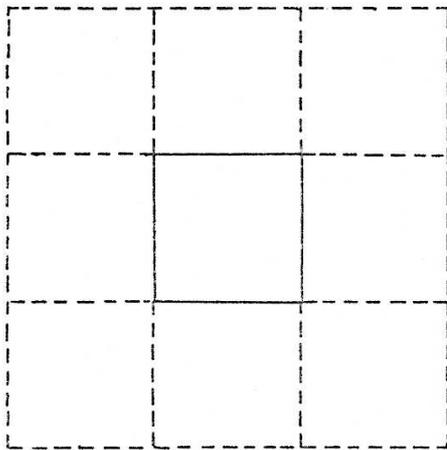


Abbildung 6: Erweiterung zum Flächengitter zur Bestimmung einzelner Werte der Korrelationsfunktion

Wir setzen also in (123) und (124) stets für $o \leq j'' \leq N, o \leq k'' \leq N$

$$b_{\frac{1}{2}}(x_{N+j''}, x_{N+k''}) = b_{\frac{1}{2}}(x_{j''}, x_{k''}) , \quad (125)$$

$$b_2(x_{-j}'' , x_{-k}'') = b_2(x_{N-j}'' , x_{N-k}'') .$$

bzw. entsprechend in den verschiedenen möglichen Indexkombinationen.

4.3.1. Unterschiede zwischen errechneten und definierten Korrelationsfunktionen

Zwischen einer Anwendung der Definition der AKF bzw. KKF auf die gegebene Kornverteilung und den tatsächlich errechneten Funktionen bestehen mehrere Unterschiede, die wir nochmals kurz zusammenstellen und die Konsequenzen in Hinsicht auf die Erfassung der statistischen Eigenschaften diskutieren:

1. Die diskrete Kornverteilung wird durch die Meßblende des Photometers in eine kontinuierliche Schwärzungsverteilung umgewandelt.
2. Aus dieser Verteilung werden „Samplingspunkte“ auf einem Abtastgitter herausgegriffen.
3. Aus dem unendlichen Sampling-Gitter schneiden wir willkürlich einen Teilbereich aus.
4. Diesen Teilbereich denken wir uns als Elementarzelle eines unendlich ausgedehnten Flächengitters.

Der erste Schritt wirkt durch die Mittelung über die Blendenfläche wie ein Tiefpaß, die Schwankungen werden vermindert, das Wienerspektrum praktisch an der zum Blendendurchmesser reziproken Ortsfrequenz abgeschnitten.

Der zweite Schritt hat, sobald die Abtastweite größer ist als die Korrelationsdistanz (\approx Durchmesser des AKF-Peaks) der Rauschverteilung, einen günstigen Einfluß auf das Signal/Rauschverhältnis. Dies wurde für den Übergang von der kontinuierlichen zur diskontinuierlichen „Probenentnahme“ von statistischen stationären Zeitfunktionen nachgewiesen⁶¹. Die andere Grenze wird durch die bereits diskutierte Forderung (s. Abschn. 2.3.) gegeben, das Signal sollte nicht durch Überlagerung der mit dem reziproken Gitter gefalteten Fouriertransformierten verfälscht werden.

Der dritte Schritt führt zu einer Verfälschung gegenüber der Definition der Korrelationsfunktionen, wenn die ausgeschnittene Fläche zu klein gewählt wird.

Der vierte Schritt hat zur Folge, daß wir nicht die KKF bzw. AKF des ausgeschnittenen Bereichs, sondern des ganzen Flächengitters berechnen. Aus der Diskussion in Abschn. 2.4. schließen wir, daß das Wienerspektrum des Ausschnitts alleine an den Fourier-Sampling-Punkten exakt mit den berechneten Werten übereinstimmt, in den Punkten dazwischen jedoch durch die Faltung mit der Funktion $\frac{\sin^2(x^*X)}{(x^*X)^2} \frac{\sin^2(y^*Y)}{(y^*Y)^2}$ erzeugt wird.

Erst durch die Bildung eines Fourier-Integrals der so entstandenen kontinuierlichen Verteilungen entstünde die KKF bzw. AKF des ausgeschnittenen Bereichs allein.

Im Sinne der Theorie der stationären stochastischen Prozesse handelt es sich bei den berechneten Funktionen um Schätzfunktionen, deren statistische Eigenschaften im allgemeinen von denen der exakten Funktionen (61), (62) abweichen. Eine nähere Analyse dieser Abweichungen wird von Davenport^{62,63} gegeben. Da die annähernde Berechnung der kontinuierlichen KKF aus den Werten an den Stützstellen auf theoretische Probleme führt und den Rechenaufwand vervielfachen würde, ist es für die Genauigkeit der gegenseitigen Positionsbestimmung von zwei Aufnahmen besonders wichtig, das Abtastgitter eng zu wählen.

4.3.2. Positionsbestimmung

Es stellte sich heraus, daß die laterale Zuordnung gleich- und verschieden-fokussierter Aufnahmen mit hoher Genauigkeit möglich ist.

Obwohl die Kreuz-Korrelationsfunktion nicht notwendig zentrosymmetrisch ist (s. Abschn. 4.1.), ist die Zentrosymmetrie in einem größeren Bereich um den verschobenen Nullpunkt recht genau erhalten. Dies ist verständlich, wenn man die Zerlegung (83) betrachtet: die AKF der Bildpunktfunktion ist ohnehin zentrosymmetrisch; der nicht-zentrosymmetrische Anteil $\Delta o * o$ besitzt einen zentrosymmetrischen Nullpunktsbereich, der ausschließlich von der Elektronendichteverteilung eines Atoms herrührt.

Infolge dieser Zentrosymmetrie kann das Zentrum des Korrelationspeaks auf Bruchteile eines Angströms genau angegeben werden, man braucht lediglich den Schwerpunktsvektor des Peaks zu ermitteln:

$$\vec{r}_s = \frac{\sum_{Peak} \sum \Phi_{b_1 b_2}(\vec{r}_{m/n'}) \vec{r}_{m/n'}}{\sum_{Peak} \sum \Phi_{b_1 b_2}(\vec{r}_{m/n'})} . \quad (126)$$

Zur Berechnung wird jeweils derjenige Teil des Peaks verwendet, der größer als der Durchschnittswert der AKF bzw. KKF ist.

Die Angabe einer solchen Genauigkeit ist jedoch unrealistisch, solange die gegenseitige Orientierung der beiden Aufnahmen nur anhand der Kantenorientierung der Platten oder Filme bzw. von Marken erfolgt (s. Abschn. 3.3.). Sie läßt sich erst voll ausnutzen, wenn auch die Orientierungsbestimmung rechnerisch ausgeführt wird (s. Abschn. 4.2.1.). Überlegungen zur Genauigkeit der lokalen Punkt-für-Punkt-Zuordnung werden in Abschn. 8.2.2. folgen.

In Abb. 7a sind Profile der AKF einer Kohlefolieaufnahme ($\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$, Beispiel Abschn. 8.2.2.) und der KKF von dieser Aufnahme mit einer Nachbaraufnahme gegenübergestellt. Die KKF ist gegenüber der AKF nur geringfügig verbreitert; die halbe Halbwertsbreite, bezogen auf das Maximum der KKF beträgt für die

KKF	AKF	
68	54	μm
3,7	3	\AA

Diese Angaben sind interessant für eine „pauschale“ Beurteilung des Punktauflösungsvermögens nach den Überlegungen in Abschn. 5.7.

Die AKF und KKF - Profile unterscheiden sich vor allem in Nullpunktnähe stark voneinander; der Unterschied wird durch die AKF des Rauschspektrums verursacht. Bei additivem Rauschen sollte man nach Abschn. 4.2.1 erwarten, daß sich auch die AKF von Bildpunktfunktion und die des Rauschspektrums additiv zur AKF der Bildverteilung zusammensetzen.

Die AKF des Rauschspektrums alleine erhält man aus einer frei (ohne Objekt im Strahlengang) mit Elektronen belichteten Emulsion. In Abb. 7b ist ein Querschnitt durch die berechnete AKF einer solchen Aufnahme (vgl. Abschn. 8.2.1.) dargestellt. Zum Vergleich ist die Differenz von AKF- und KKF-Peak berechnet worden. Obwohl die beiden Funktionen einen ähnlichen Verlauf besitzen, sind doch wesentliche Unterschiede festzustellen: Im einen Fall erstreckt sich der „Einflußbereich“ auf eine Distanz von ca. 25 μm , im andern Fall bis maximal 125 μm . Auffällig ist die Ausprägung des Seitenminimums in der Differenz-AKF, das bei der AKF der frei belichteten Aufnahme nur andeutungsweise zu erkennen ist.

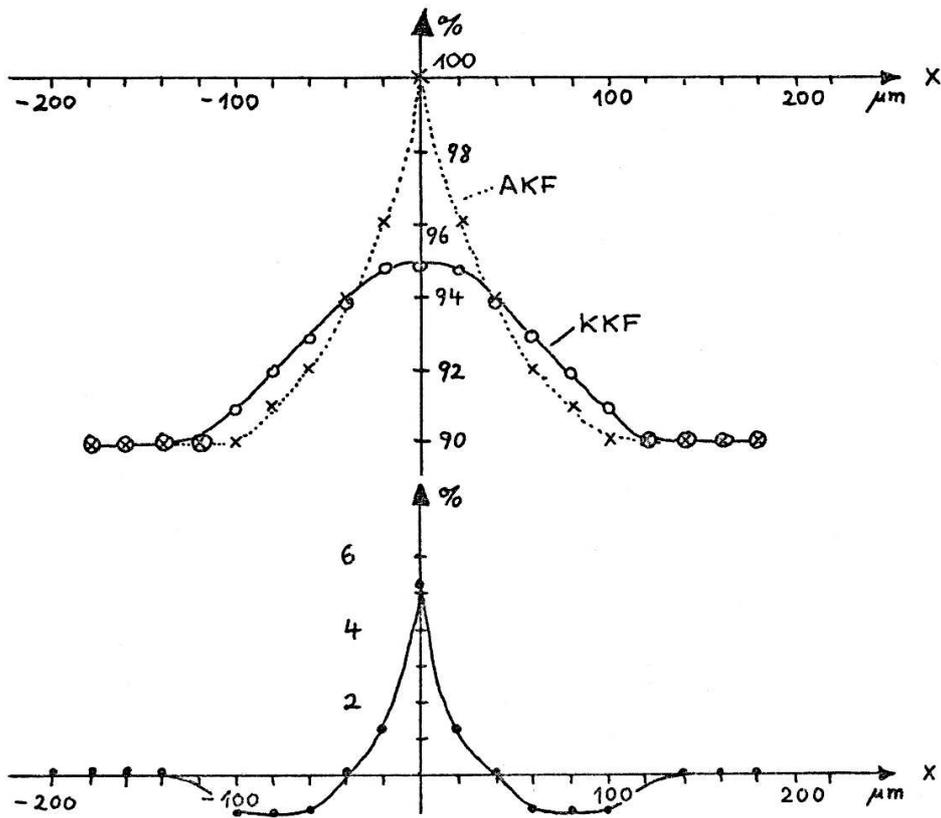


Abbildung 7a: oben: Vergleich des zentralen Maximums von AKF und KKF einer Kohlefolieaufnahme (vgl. CONTUR-Darstellung Abb. 6 a,b Anh.)
 unten: Differenz der Funktionen.

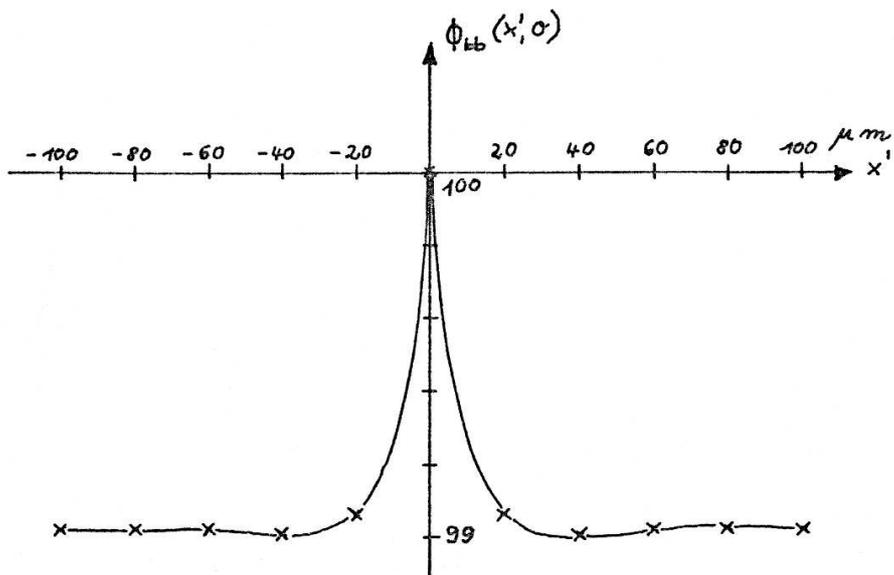


Abbildung 7b: Zentrales Maximum der AKF einer frei mit Elektronen belichteten Aufnahme; $\Delta d \approx 0.5$

Eine mögliche Ursache für den Unterschied der beiden betrachteten Funktionen ist die Abweichung von der Additivität der Rauschverteilung.

Ein Absolutvergleich der beiden Peaks ist nicht möglich, da die Schwärzungen nicht absolut gemessen wurden.

4.4. AKF und KKF im Falle einer keilförmigen Schwärzungsverteilung

In den meisten Fällen besitzt der gesuchte Peak den höchsten Wert der KKF, und es genügt eine einfache Maximumsuche zur Auffindung seiner Position.

Die Methode versagt jedoch, wenn die betrachteten Aufnahmen einen starken Schwärzungsgradienten besitzen, wie er z.B. bei der Untersuchung der Kontamination an Lochrändern von Kohlefolien oder anderen keilförmigen Schichten auftritt.

Die AKF und KKF solcher Aufnahmen haben ein „dachfirst“-artiges Aussehen; der gesuchte Peak der KKF sitzt im allgemeinen auf einer der Flanken, besitzt nicht mehr notwendig den höchsten Wert und ist verzerrt, d.h. sein Schwerpunkt ist gegenüber der „wahren“ Lage verschoben.

Es ist am einfachsten, bereits das Korrelationsspektrum so $F\{b_1\}F\{b_2\}$ zu modifizieren, daß die Auffindung des KKF-Peaks und seines Schwerpunkts erleichtert wird.

Zur Erläuterung, wie sich der Gradient in der AKF bemerkbar macht, betrachten wir das analoge eindimensionale Problem: eine periodische Sägezahnkurve mit der Periode d und der Höhe h (Abb. 8a). Sie entspricht einem Schnitt durch das Flächengitter, dessen Elementarzelle die „keilförmige“ Schwärzungsverteilung ist.

$$y = h \cdot x \tag{127}$$

$$y(x + d) = y(x)$$

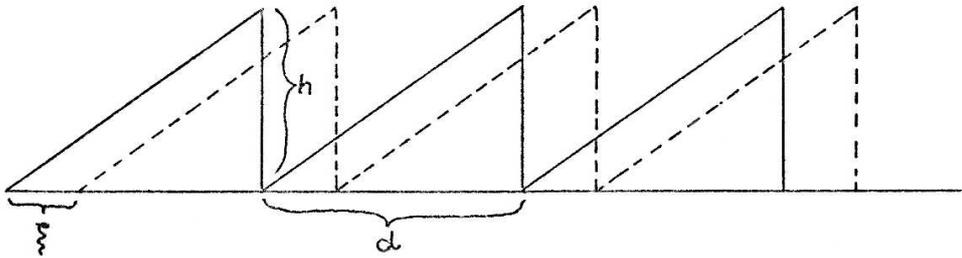


Abbildung 8a: Zur Berechnung der AKF einer Sägezahnkurve.

Die „AKF“ dieser Funktion ergibt sich aus

$$\Phi(\xi) = \frac{h^2}{d} \left\{ \int_0^{d-|\xi|} x(x+|\xi|)dx + \int_{d-\xi}^d x(x-d+|\xi|)dx \right\} - \left(\frac{hd}{2}\right)^2 \quad (128)$$

$$= h^2 \left\{ \frac{1}{2} \xi^2 - \frac{d}{2} |\xi| + \frac{1}{12} d^2 \right\},$$

d.h. für kleine $|\xi|$ fällt die Funktion annähernd linear ab vom Nullpunktswert $\frac{1}{12} d^2$.

In Abb. 8b ist diese Funktion für $h=1$, $d=1$ dargestellt; im Vergleich dazu ein Schnitt durch die berechnete AKF einer Graphitfolien-Aufnahme (Abschn. 8.2.3.) in Richtung des Schwärzungsgradienten.

Wir erhalten das „Wienerspektrum“ der Sägezahnkurve durch Bildung von

$$F\{y\}F^*\{y\}. \quad (129)$$

Es gilt $Re[F\{y\}] = 0$, da die Funktion keine symmetrischen Anteile besitzt.

Nach ^{35b} bilden die rein imaginären Fourierkoeffizienten die Reihe

$$\frac{1}{1}, -\frac{1}{2}, +\frac{1}{3}, -\frac{1}{4} \dots \quad (130)$$

Demnach hat die obige Funktion (129) die reellen Koeffizienten

$$\frac{1}{1}, \frac{1}{4}, \frac{1}{9} \dots \quad (131)$$

Wir können also im Wienerspektrum einer kontinuierlichen keilförmigen Schicht bzw. im Korrelationsspektrum von zwei keilförmigen Schichten in der Richtung, die der Neigungsrichtung des Keils entspricht, eine Reihe von Koeffizienten erwarten, die quadratisch mit wachsender Ordnung abfallen.

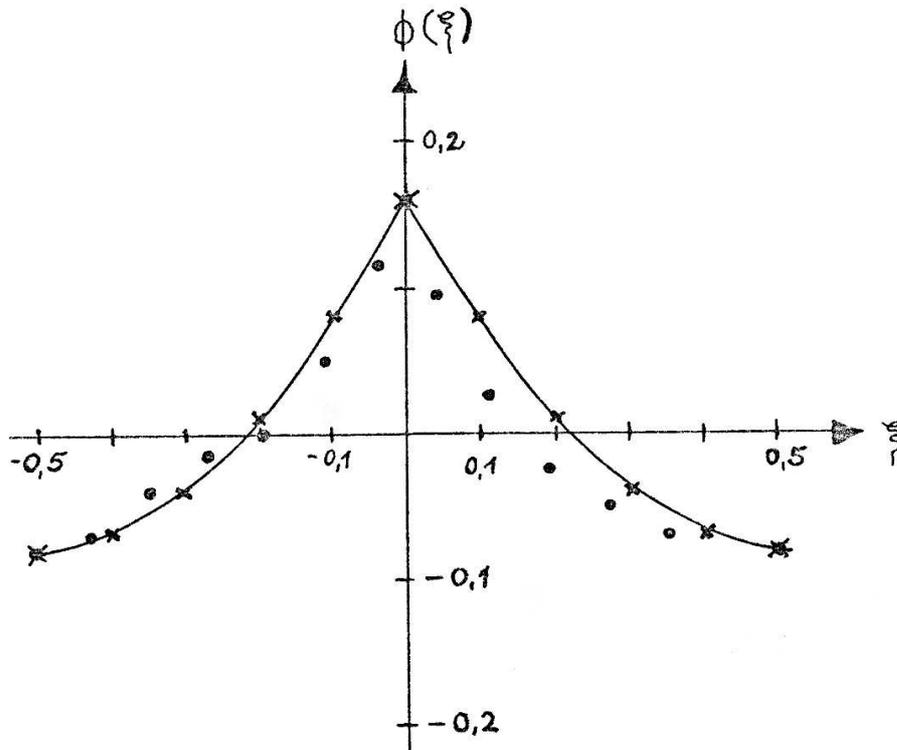


Abbildung 8b: Schnitt durch die AKF einer Aufnahme mit linearen Schwärzungsanstieg.
(x theoretisch, • gemessen)

Überlagert sich der kontinuierlichen Schwärzungszunahme die statistische Verteilung, so addiert sich zu diesem Koeffizienten ein statistischer Term.

Abb. 8c zeigt die Werte von 9 Koeffizienten im berechneten Wienerspektrum der Graphitfolie, im Vergleich dazu eine quadratische Abhängigkeit.

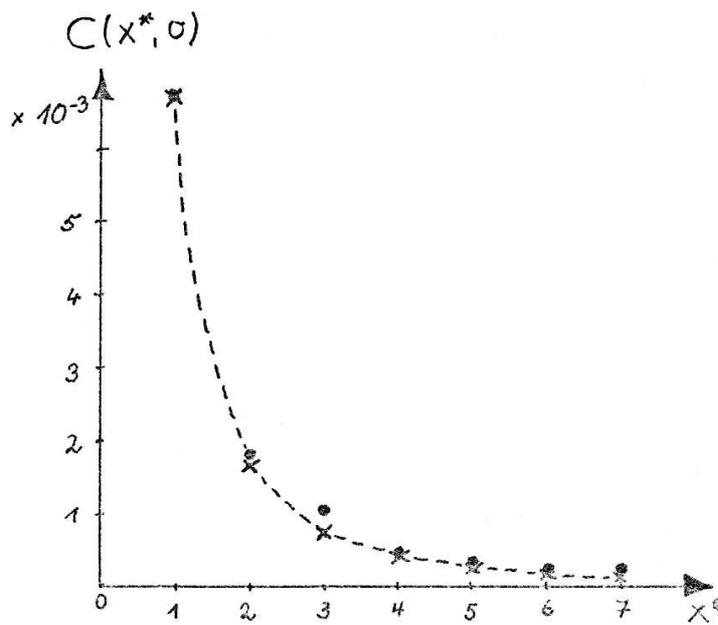


Abbildung 8c: Schnitt durch das Wienerpektrum senkrecht zur Richtung des Schwärzungsgradienten. (x theoretisch, • gemessen)

Durch Auslöschung dieser Koeffizienten¹⁾ im Korrelationsspektrum gelangt man zu einer Kreuzkorrelationsfunktion, die zwar artifiziell ist, aber eine Auffindung des verschobenen Peaks ermöglicht.

Die Abb. 8d und Abb. 8e bringen jeweils eine Gegenüberstellung der KKF und der AKF (in beiden Fällen des zentralen Bereichs) vor und nach dem Eingriff in das Korrelationsspektrum. Der Einfluß des Schwärzungsgradienten auf die Gestalt der Korrelationsfunktionen ist erheblich reduziert. Da nur einige höchste Koeffizienten ausgelöscht werden, verschwindet die Störung nicht vollständig; ein schmaler „Grat“ bleibt stehen. Für die Bestimmung der genauen Position des Peaks ist ausschlaggebend, daß er sich nach dem Eingriff stark von seiner Umgebung abhebt.

¹⁾ genauer: die Koeffizienten werden ersetzt durch ihre Nachbarkoeffizienten mit statistisch erzeugter Phase. (vgl. Beschreibung der Rechenprogramme, Abschn. (4.5.))

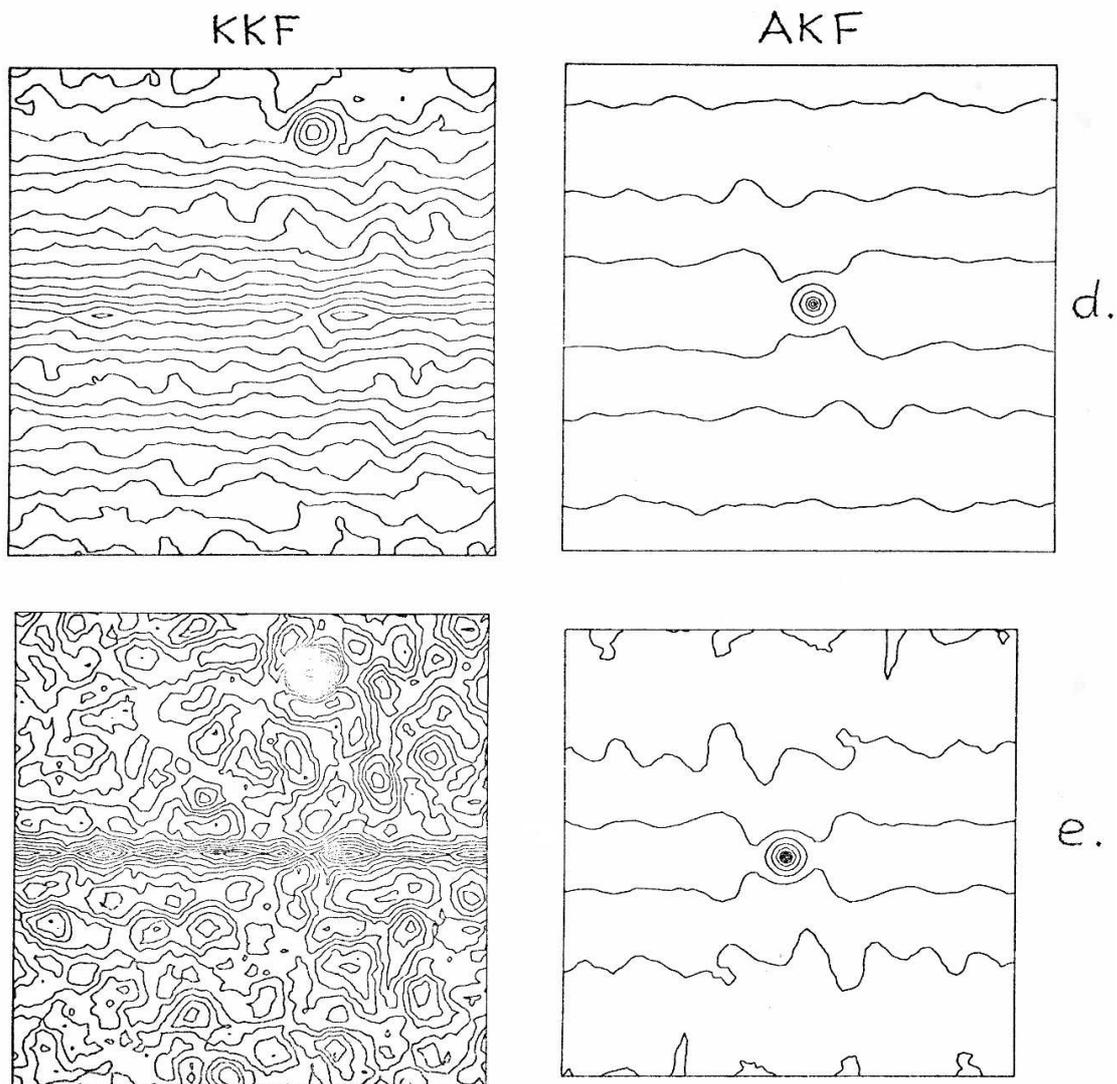


Abbildung 8d: Korrelationsfunktionen einer Aufnahme mit Schwärzungsgradienten (Graphitfolie, Abschn. 8.2.3.)

Abbildung 8e: Korrelationsfunktionen nach dem Auflösen der „Reflexe“ im Korrelationsspektrum.

Diese Darstellungen werden in den Abb. 11 a-d Anh. nochmals vergrößert gezeigt; dort sind auch die CONTUR-Niveaulinien aufgeführt.

4.5. Beschreibung der Rechenprogramme für die Ausführung der Bilddifferenzanalyse

Ein Blockdiagramm des FORTRAN-Programmsystems wird in Abb. 9 dargestellt. Die Routinen führen folgende Operationen aus:

Die beiden Verteilungen werden zunächst durch FOUR Fourier-transformiert. Anschließend wird das Korrelationsspektrum $F\{\Phi_{b_1 b_2}\} = F\{b_1\}F\{b_2\} = C(\vec{h})$ berechnet.

CHECK prüft dieses Spektrum auf das Vorhandensein von starken Reflexen $C_i = C(h_i, k_i)$ in unmittelbarer Nähe des Ursprungs

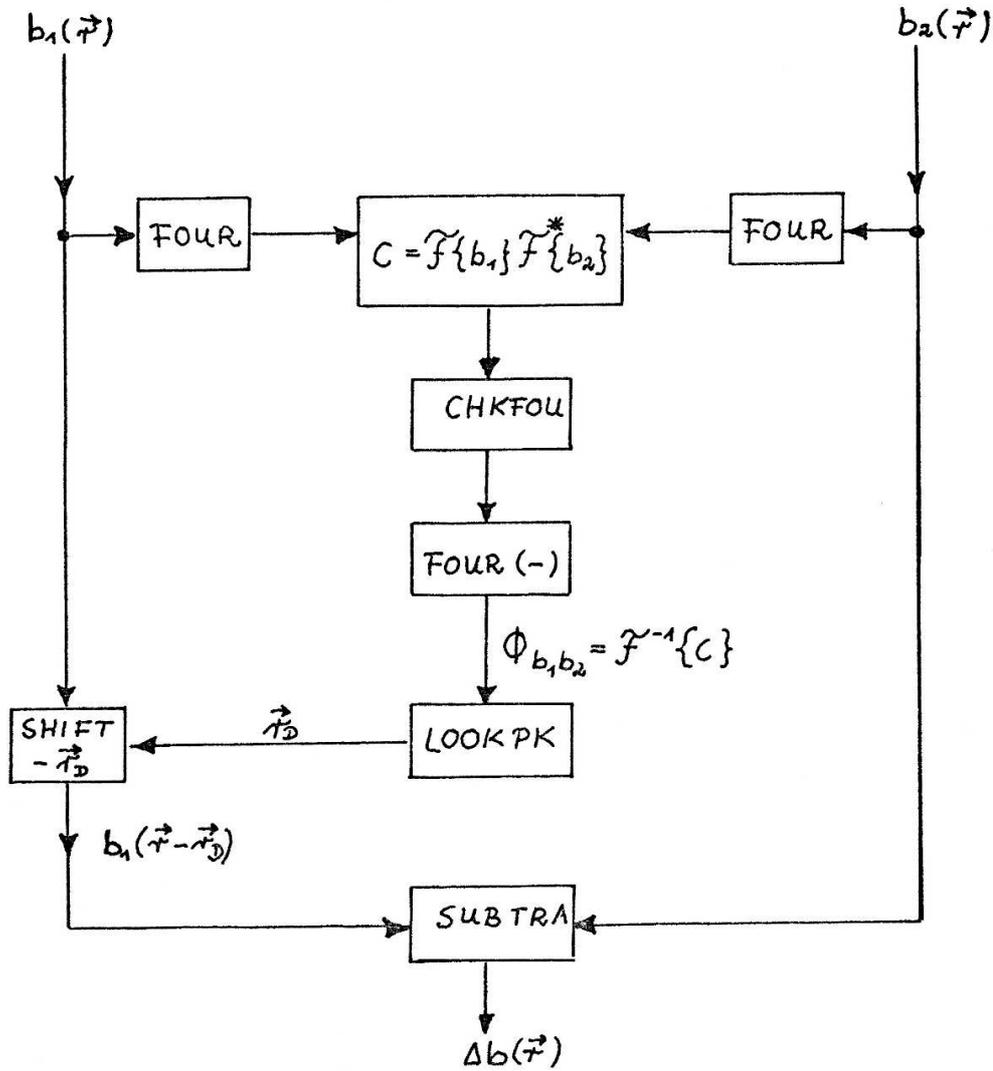


Abbildung 9: Blockschema des Programmsystems zur Differenzanalyse.

und stellt fest, ob sie in einer Winkelrichtung signifikant gehäuft auftreten (vgl. voriger Abschn.). Als Signifikanzkriterium wird der Ausdruck

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i |C_i| \{\varphi_i - \bar{\varphi}\}^2}{\sum_i |C_i|}} \quad (132)$$

gebildet, wobei

$$\varphi_i = \arctg\left(\frac{h_i}{k_i}\right), \quad (133)$$

$\bar{\varphi} = \frac{\sum_i |c_i| \varphi_i}{\sum_i |c_i|}$ gesetzt wird.

Unterschreitet σ einen vorgegebenen Wert $\sigma_{crit.}$, so werden die aufgefundenen Reflexe durch synthetische Reflexe ersetzt, die den Absolutbetrag eines Nachbarkoeffizienten, jedoch eine zufallsverteilte Phase besitzen.

Durch die Einführung einer Zufalls-Phase wird erreicht, daß zwischen den synthetischen Koeffizienten und dem Nachbarkoeffizienten, der zu seiner Konstruktion diente, keine feste Phasenbeziehungen entstehen.

Durch Rücktransformation FOUR (-) wird die Kreuzkorrelationsfunktion gebildet:

$$\Phi_{b_1 b_2} = F^{-1}\{C(\vec{h})\}. \quad (134)$$

LOOKPK sucht den Korrelations-Peak auf, stellt die genaue Position durch Schwerpunktsermittlung gemäß (126) fest und liefert den Verschiebungsvektor \vec{r}_D .

SHIFT verschiebt eines der Bilder um diesen Vektor zurück.

Anschließend werden die Mittelwerte der beiden Bilder

$$\bar{b}_1 = \overline{b_1(\vec{r})}, \quad \bar{b}_2 = \overline{b_2(\vec{r})}$$

nur über der Überlappungsfläche gebildet (s. Abb. 10).

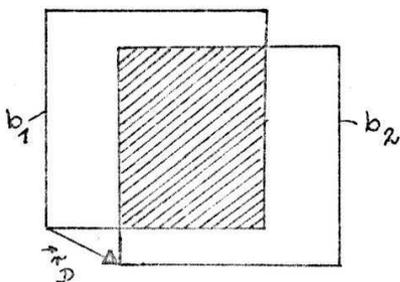


Abbildung 10: Überlappungsfläche

SUBTRA errechnet das Differenzbild nach (57)

$$\Delta b(\vec{r}) = (b_1(\vec{r}) - \bar{b}_1) - (b_2(\vec{r}) - \bar{b}_2) \sqrt{\frac{\bar{b}_1}{\bar{b}_2}}. \quad (135)$$

Der Korrekturterm $\sqrt{\frac{\bar{b}_1}{\bar{b}_2}}$ wurde bei den ersten Rechnungen nicht berücksichtigt. Wenn die Unterschiede zwischen den beiden Mittelwerten nicht groß sind, sollte dies keine große Rolle spielen. Bei der später zu berechnenden Kohlefolie liegt der Unterschied z.B. bei 10%.

Beide Eingabe-Bildverteilungen sowie das Differenzbild können in wählbarer Auflösung mit WRSYMB ausgedruckt oder durch CONTUR gezeichnet werden (Abschn. 2.5.).

Zum Testen des Programms wurde rechnerisch aus einer Bildverteilung (Fettsäuresynthetase, Abb. 1 Anh.) eine neue erzeugt, die um 160 μm in beide Richtungen gegen die ursprüngliche Verteilung verschoben und in einem Quadrat der Seitenlänge 200 μm durch eine kleine additive Konstante ($\Delta d = 0,1$) „kontaminiert“ war. Ungestörte und gestörte Bildverteilung dienten als Eingabe für das Differenzprogramm.

Der Korrelationspeak (Abb. 11a) zeigt die erwartete Verschiebung. Das Programm liefert als Differenzbild das eingegebene Quadrat mit der Belegung $d = 0,1$; in Abb. 11b sind die Größen als Relativwerte ausgedruckt.

Über Ergebnisse bei Anwendung des Programms auf photometrierte Aufnahmen von Kohle- und Graphitfolien wird erst in Abschn. 8. berichtet, zusammen mit den Ergebnissen der Bildrekonstruktion.

Kapitel 5

Korrelationsexperimente mit Hilfe des lichtoptischen Diffraktometers

5.1. Beschreibung des Experiments

Im Lichtdiffraktometer können unter gewissen Voraussetzungen die Korrelationsspektren von zwei Schwärzungsverteilungen sichtbar gemacht werden.

Wir beschreiben folgendes Experiment:

Zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen desselben Objekts werden im Parallelstrahl des Licht-Diffraktometers planparallel mit geringem Abstand angeordnet.

Wir zerlegen nun die Schwärzungsverteilungen

$$d_i(\vec{r}) = d_{0i} + \Delta d_i(\vec{r}); \quad d_{0i} = \overline{d_i(\vec{r})}; \quad i = 1, 2 \quad (136)$$

und definieren $d_0 = d_{01} + d_{02}$

Für die Transparenzverteilung hinter den beiden Platten erhält man bei Voraussetzung von $\Delta d_i(\vec{r}) \ll d_{0i}$

$$\begin{aligned} t(\vec{r}) &= e^{-2,3(d_1(\vec{r})+d_2(\vec{r}))} \approx e^{-2,3d_0}(1 - 2,3\Delta d_1(\vec{r}) - 2,3\Delta d_2(\vec{r})) \\ &= t_0 - \Delta t_1(\vec{r}) - \Delta t_2(\vec{r}). \end{aligned} \quad (137)$$

Unter Annahme kleiner Schwärzungsschwankungen $\Delta d_i(\vec{r})$ können wir also sagen, daß die lokale Transparenzabweichung $\Delta t(\vec{r})$ der übereinandergelegten Platten proportional ist zur Summe der Schwärzungsabweichungen der einzelnen Platten.

Statt Δd_i soll im Folgenden wieder b_i geschrieben werden, so daß

$$\Delta t(\vec{r}) \sim b_1 + b_2. \quad (138)$$

5.2. Verschiebungsexperimente mit Aufnahmen gleicher Defokussierung

Wie in Abschnitt 4.2.1., (82), zerlegen wir die Bildverteilungen in ihre Signal- und Rauschanteile und berücksichtigen eine mögliche Objektveränderung und einen Verschiebungsvektor \vec{r}_D :

$$t(\vec{r}) \sim \widehat{o} s + \widehat{[(o + \Delta o) s]} \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) + n_1 + n_2 . \quad (139)$$

In der Fraunhoferschen Anordnung entsteht in der Beugungsebene, bis auf einen Maßstabsfaktor, die Amplitudenverteilung

$$F\{\Delta t(\vec{r})\} = OS + (O + \Delta O)S \cdot e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} + N_1 + N_2 \quad (140)$$

mit der Notation: $N_1 = F\{n_1\}$,

$$N_2 = F\{n_2\} .$$

Beobachtbar wird auf einer Mattscheibe nur die Intensitätsverteilung

$$I_{Diff.r.} \sim |F\{\Delta t\}|^2 = 2 OO^* SS^* + \Delta O \Delta O^* SS^* + N_1 N_1^* + N_2 N_2^* + N_1 N_2^* + N_1^* N_2 \quad (141)$$

$$+ OO^* SS^* e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} + O \Delta O^* SS^* e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D}$$

$$+ OO^* SS^* e^{+2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} + O^* \Delta O SS^* e^{+2\pi i \vec{h} \vec{r}_D}$$

+ Summanden mit mindestens einem Faktor N_1, N_2 ,

oder wegen $S = \sin \gamma$

$$I_{Diffr.} \sim 2 \cdot OO^* \cdot \sin^2 \gamma + \Delta O \Delta O^* \cdot \sin^2 \gamma + 2 \cdot OO^* \cdot \sin^2 \gamma \cdot \cos(2\pi \vec{h} \vec{r}_D) \quad (142)$$

$$+ 2 \sin^2 \gamma \cdot \operatorname{Re} \left\{ O \Delta O^* \cdot e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} \right\} + W(\vec{h}) + R .$$

Die beiden ersten Terme sind gerade die von den Thonschen Experimenten¹⁹ her bekannten Intensitätsverteilungen im Diffraktogramm der Einzel-Platten. Ist das Wienerspektrum OO^* annähernd „weiß“, so sind die Null-Linien der Übertragungsfunktion klar zu erkennen.

Der dritte Term hat denselben Aufbau, wird jedoch moduliert durch einen Kosinusfaktor mit der Periode $\frac{2\pi}{|\vec{r}_D|}$.

Hier wird also die in Abschn. 4.2.3. bereits erwähnte Phasenmodulation direkt beobachtbar. Auf diese wichtige Tatsache kommen wir später ausführlich zu sprechen. Sie ermöglicht es uns, sämtliche Positionsbestimmungen mit weit geringerem Aufwand durchzuführen. Nach dem Ansatz in (139) tritt dieser Term nur auf, wenn eine beiden Aufnahmen zugrundeliegende Objektstruktur existiert; das Erscheinen einer solchen Modulation kann also z.B. als Kriterium benutzt werden, ob die beiden Aufnahmen überhaupt für eine Bilddifferenzanalyse geeignet sind. Weiter haben wir damit ein einfaches Mittel, die Übertragungsgrenze festzustellen.

Der vierte Term in (142) trägt nur dann zur Kosinusmodulation bei, wenn in der Objektverteilung $o(\vec{r})$ die Änderungsverteilung $\Delta o(\vec{r})$ enthalten ist, etwa bei epitaktischem Aufwachsen. Da eine quantitative Auswertung der Intensitätsverteilung im Diffraktometer infolge des Speckle-Effekts kaum möglich ist, können wir kleine Änderungen der Modulationsamplitude nicht nachweisen, deshalb wird uns dieser Term nicht weiter interessieren. In $W(\vec{h})$ sind die Spektren N_1^2 und N_2^2 zusammengefaßt. Dieser Term liefert einen annähernd konstanten Beitrag zur Gesamtintensität des Diffraktogramms.

Schließlich steht R stellvertretend für die weiteren Terme in (142), die nur Fluktuationen in der Intensitätsverteilung erzeugen, aber nicht signifikant zu den erwähnten Modulationen beitragen.

Abb. 12 zeigt ein typisches Diffraktogramm von übereinanderliegenden Aufnahmen, die nahezu zur Deckung gebracht sind. Das bekannte, von der jeweiligen Übertragungsfunktion herführende Intensitätsmuster ist überlagert von einem parallelen, äquidistanten Streifensystem¹⁾.

¹⁾ Man sollte eine Kosinusförmige Intensitätsschwankung erwarten. Dafür sind jedoch die Maxima zu breit, auf Kosten der Minima. Vermutlich ist diese Erscheinung aus dem Eigenschaften des verwendeten Filmmaterials (KB 14) zu erklären.

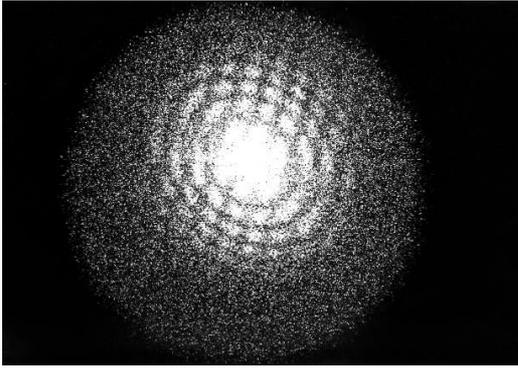


Abbildung 12: *Diffraktogramm von zwei gegenseitig verschobenen Kohlefolien-Aufnahmen.*
 $(\Delta f = 4\,100 \text{ \AA}, \quad \Delta f_A = 1\,400 \text{ \AA})$

Die Streifen verlaufen normal zur Verschiebungsrichtung, wie bereits für die Linien gleicher Phase in der Fouriertransformierten der Kreuzkorrelationsfunktion festgestellt wurde (Abschn. 4.2.3.).

Genau dasselbe Aussehen haben in solchen Fällen auch Diffraktogramme von einzelnen Aufnahmen.

Wir können uns diese Beobachtung durch die Annahme erklären, daß die in (139) vorausgesetzte Überlagerung gegeneinander verschobener Bilder vom selben Objektbereich bereits während der Aufnahme geschieht, sei es durch ein sprunghaftes Wegwandern des Objekts, sei es infolge von Instabilitäten des Elektronenmikroskops selbst.

Diese „Sprungdrift“ wird zusammen mit anderen im Diffraktogramm beobachtbaren Drifterscheinungen in einem eigenen Abschnitt (6.) besprochen (s. auch ¹¹).

5.3. Beziehung zu den Korrelationsfunktionen

Wir wollen (142) in einer Fourierschreibweise darstellen, um sichtbar zu machen, welche Korrelationsfunktionen den einzelnen Termen entsprechen.

$$I \sim F\{\overbrace{\Phi_{00}} + \overbrace{\Phi_{\Delta 0 \Delta 0}} \Phi_{SS}\} \quad (143)$$

$$+ \underbrace{\overbrace{\Phi_{00}} \overbrace{\Phi_{SS}}}_{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D)} + \overbrace{\Phi_{00}} \overbrace{\Phi_{SS}} \delta(\vec{r} + \vec{r}_D)$$

$$+ \underbrace{\overbrace{\Phi_{0\Delta 0}} \overbrace{\Phi_{SS}}}_{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D)} + \overbrace{\Phi_{\Delta 0 0}} \overbrace{\Phi_{SS}} \delta(\vec{r} + \vec{r}_D)$$

$+ \Phi_{nm} + \dots \}$.

Die unterstrichenen Terme sind die in (91) bzw. (83) aufgeführten, bei der Bildung des Kreuzkorrelationsintegrals entstehenden, um \vec{r}_D verschobenen Integrale.

Zusätzlich treten in (143) dieselben Integrale mit der entgegengesetzten Verschiebung auf, daneben die unverschobenen Autokorrelationsfunktionen aller Einzelsummanden o , Δo und n . Alle Terme, außer dem Rauschterm n , sind gefaltet mit der AKF der Bildpunktfunktion.

Obwohl sich beim Lichtdurchgang durch die beiden Emulsionen die Schwärzungsschwankungen addieren (jedenfalls in der in Abschn. 5.1. besprochenen Näherung), bewirkt die Intensitätsbildung in der Beugungsebene, daß wir Terme vorliegen haben, in deren Fouriertransformierte die Schwärzung als gemischte Produkte $\Delta d_1(\vec{r})\Delta d_2(\vec{r} \pm \vec{r}_D)$ eingehen (144).

Um zu untersuchen, wie diese Produkte im Lichtdiffraktometer realisiert werden, gehen wir zurück auf die Interpretation der Schwärzung als einer Kornhaufenverteilung (Abschn. 1.6.).

Einen Beitrag zu (144) können wir nur von Kornhaufen gegenüberliegenden Emulsionen erwarten, die sich gegenseitig teilweise oder vollständig überlappen.

Wir zerlegen jeweils die gesamte Bildfläche in eine Anzahl von gleichgroßen Teilflächen ΔF_i .

Die Zahl der sich überlappenden Kornhaufen in einem herausgegriffenen Flächendruck ΔF_i ist proportional dem Produkt

$$K_I(\vec{r}_i)K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D) , \quad (145)$$

K_I = Zahl der Kornhaufen (= Zahl der Elektroneneinschläge) in einem Flächenstück ΔF_i der Platte I,

K_{II} = Zahl der Kornhaufen (= Zahl der Elektroneneinschläge) im gleichgroßen, gegenüberliegenden Flächenstück ΔF_i , der Platte II, das um den Vektor \vec{r}_D gegenüber ΔF_i verschoben liegt.

Wir wählen die Flächenstücke ΔF_i so groß, daß auf ihnen die Mittelwerte $K(\vec{r}_i)$ der auffallenden Elektronen definiert werden können.

$K(\vec{r}_i)$ ist, bis auf einen für alle Flächenstücke gleichen Faktor, die lokale Elektronenintensität $I(\vec{r}_i)$.

Wir betrachten die Wahrscheinlichkeit dafür, daß $K_I(\vec{r}_i) = \alpha_1$ und gleichzeitig $K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D) = \alpha_2$.

Wegen der Unabhängigkeit der Prozesse ist

$$p[K_I(\vec{r}_i) = \kappa_1 \cap K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D) = \kappa_2] = p[K_I(\vec{r}_i) = \kappa_1] \cdot p[K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D) = \kappa_2] = p_1 \cdot p_2. \quad (146)$$

Um den Erwartungswert des Produkts $K_I(\vec{r}_i)K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D)$ zu finden, müssen wir summieren über alle möglichen Realisierungen der Kombinationen κ_1, κ_2 :

$$E[K_I(\vec{r}_i)K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D)] = \sum_{\kappa_1=1}^{\infty} \sum_{\kappa_2=1}^{\infty} p_1 p_2 \kappa_1 \kappa_2. \quad (147)$$

Stattdessen können wir wegen der statistischen Unabhängigkeit der Elektroneneinschläge Gebrauch machen von der Beziehung

$$E[K_I(\vec{r}_i)K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D)] = E[K_I(\vec{r}_i)]E_{II}[K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D)] \quad (148)$$

$$= K_I(\vec{r}_i)K_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D)$$

$$\sim I_I(\vec{r}_i)I_{II}(\vec{r}_i + \vec{r}_D);$$

das ist gerade der Beitrag des betreffenden Flächenstücks zur Kreuzkorrelationsfunktion der Intensitätsverteilungen.

Somit ist die Anzahl der Kornhaufenüberlappungen in gegenüberliegenden Flächenstücken gegeneinander verschobener Platten im Mittel proportional zum Intensitäts-KKF-Beitrag dieses Flächenstücks, und die nach (143) im Lichtdiffraktometer - indirekt - gebildete Korrelationsfunktion der Kornhaufenverteilung ist im wesentlichen identisch mit der Korrelationsfunktion der Elektronen-Intensitätsverteilung⁷⁾.

5.4. Beobachtbarkeit der Streifen

Die Größe des Verschiebungsvektors kann anhand der Streifenperioden nur in einem begrenzten Bereich bestimmt werden. Ist sein Betrag gleich der Auflösungsdistanz ($\approx 3 \text{ \AA}$), so fällt in das Übertragungsgebiet nur gerade eine ganze Periode der Kosinusfunktion; die Intensitäts-Minima liegen an der Übertragungsgrenze. Für kleiner werdende Verschiebungsvektoren rücken sie aus dem Übertragungsgebiet hinaus.

⁷⁾ Eine genauere Analyse dieses Sachverhalts sollte die verschiedene Größe der Überlappungsflächen in Rechnung stellen, wie es bei einfachen Körnigkeitsmodellen bereits erfolgt ist^{65a}.

Die andere Grenze, für große Verschiebungen, ist durch die Winkeldivergenz der Laserstrahlung in der verwendeten Anordnung bestimmt. Sie errechnet sich aus der Apertur der Modenblende und der Brennweite der Teleskoplinse und beträgt in unserem Fall (s. Abschn. 1.4.) $\approx 5 \cdot 10^{-5}$ rad.

Im Beugungsbild sind noch Perioden Δh trennbar, deren Beugungswinkeldifferenz $10^7 \frac{\lambda_L}{V_{elopt}} \cdot \Delta h > \delta$ ist.

$$\Delta h > \delta \cdot \frac{V_{elopt}}{\lambda_L} = 5 \cdot 10^{-5} \frac{1,8 \cdot 10^5}{6\,000} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}, \quad (149)$$

λ_L Laserwellenlänge ≈ 600 nm .

Demnach sollten die Streifen im Beugungsbild noch sichtbar sein, wenn die Objektverschiebung ca. 650 \AA bzw. die Bildverschiebung $650 \cdot 1,8 \cdot 10^5 \cdot 10^{-7} \text{ mm} = 12 \text{ mm}$ beträgt.

Diese Zahlen ändern sich bei Vorhandensein einer Blende (Durchmesser $2 R$), die im Beugungsbild eine Beugungsfigur $\frac{J_1(2\pi\rho R)}{R}$ erzeugt. Die üblichen Blenden sind jedoch so groß ($2 R \approx 10 \text{ mm}$), daß der Durchmesser des Beugungsscheibchens $\rho \approx \frac{0,61}{R} \text{ mm}$ nur etwa halb so groß ist wie die vorher erwähnte Beugungswinkeldifferenz.

In der Praxis wird das Winkel-Auflösungsvermögen der Beugungsanordnung durch eine Granulation des Diffraktogramms schon auf größere Werte begrenzt. Sie entsteht durch die statistisch verteilten Phasenaberrationen an den einzelnen Elementen der optischen Anordnung und ist unter dem Namen Speckle-Effekt bekannt⁶⁶.

Es soll jetzt im Einzelnen besprochen werden, wie das Auftreten des Modulationsterms experimentell ausgenutzt werden kann.

5.5. Zur Ausführung der Experimente

In unserem Institut wurde ein Gerät entwickelt, das die planparallele Führung und kontrollierte, gegenseitige Verschiebung von zwei Photoplaten oder Filmen im Parallelstrahl des lichtoptischen Diffraktometers gestattet.

Die Verschiebung ist mit einer Genauigkeit von ca. 5 \mu m reproduzierbar.

Zur Vorjustierung ist außerdem einer der beiden Kreuzschlitten als Ganzes um die optische Achse drehbar gelagert.

Zur Vermeidung von Nachbareffekten bei der Durchstrahlung darf der Abstand der beiden Emulsionen einen bestimmten Wert d_{max} nicht überschreiten. Dieser Wert ergibt sich aus der

Forderung, daß ein an der ersten Schicht maximal gebeugter Strahl nur innerhalb eines Bereichs auf der zweiten Schicht auftreten darf, der der halben elektronenmikroskopischen Auflösungsgrenze entspricht (1,5 Å).

Der Beugungswinkel der 1. Ordnung beträgt

$$\alpha \approx \frac{\lambda_L}{V_{elopt} \cdot a}, \quad (150)$$

λ_L Laserwellenlänge,

V_{elopt} elektronenoptische Vergrößerung,

a Distanz, die der erreichbaren Punktauflösung entspricht.

Der unter α abgebeugte Strahl soll auf der zweiten Aufnahme noch innerhalb eines Scheibchens mit dem Durchmesser $V_{elopt} \cdot a$ auftreffen. Damit ergibt sich für den Abstand d der Emulsion $d \cdot \alpha < \frac{V_{elopt} \cdot a}{2}$, also mit Benutzung von (150)

$$d < \frac{(V_{elopt} \cdot a)^2}{2\lambda_L}. \quad (151)$$

Wählen wir λ_L 600 nm,

V_{elopt} 180 000,

a 3 Å,

so ergibt sich $d < 3$ mm.

Dieser Abstand ist bei der üblichen Plattendicke noch realisierbar.

5.6. Laterale Zuordnung von Aufnahmen

Werden die beiden Aufnahmen anhand von auffälligen „Marken“ (Lochränder, Schichtinhomogenitäten, Schmutzteilchen etc.) ungefähr zur Deckung gebracht, so ist bereits im Diffraktogramm ein Streifensystem zu erkennen. Durch gegenseitiges Verdrehen um kleine Winkel erreicht man eine Orientierung, in der die Streifen sich über einen größeren Ortsfrequenzbereich scharf begrenzt erstrecken.

Aus der Form von (142) ergibt sich, daß ein einziges Experiment nicht zum Aufsuchen des Verschiebungsvektors ausreicht. Zum einen ist der Kosinus-Term invariant gegen eine Richtungsumkehr von \vec{r}_D , zum anderen ist die Streifenperiode nicht mehr bestimmbar, wenn der Betrag $|\vec{r}_D|$ kleiner als die Auflösungsdistanz ist.

Man kann aber eine Reihe von Diffraktogrammen mit jeweils veränderter Verschiebung aufnehmen (Abb. 13a) und den Kehrwert der erhaltenen Streifenwellenlänge gegen die Größe der Verschiebung auftragen. Wie Abb. 13b zeigt, ergibt sich eine Gerade, wenn wir die Wellenlänge negativ zählen für negative Verschiebung. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt die gesuchte Position mit einer Genauigkeit von etwa 1 \AA .

Demnach ist es bereits mit den Lichtdiffraktometer möglich, zwei Aufnahmen genauer zur Deckung zu bringen, als es der elektronenmikroskopischen Auflösung entspricht.

5.7. Bestimmung der elektronenoptischen Übertragungsgrenze

Bereits in Abschn. 4.2.3. wurde ausgeführt, daß die Ausdehnung des bei der elektronenmikroskopischen Abbildung übertragenen Ortsfrequenzbereichs mit Hilfe der Modulationen abgeschätzt werden kann, die in der Fouriertransformierten der Kreuzkorrelationsfunktion auftritt. Das Lichtdiffraktometer bietet nun zusammen mit der beschriebenen Verschiebungsapparatur eine bequeme Möglichkeit, diese Modulationen einzustellen und zu beobachten.

Nach Abschn. 5.4. ist die Unschärfe des Beugungsscheibchens im Diffraktogramm etwa $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$, erzeugt also praktisch keinen Fehler in der Bestimmung der Übertragungsgrenze.

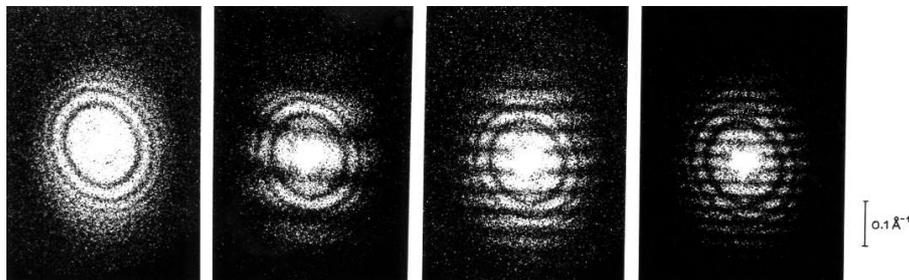


Abbildung 13a: „Verschiebungs-Serie“: Die Aufnahmen wurden in Schritten von umgerechnet 11 \AA gegenseitig verschoben. Ganz links: Deckungsgleichheit.

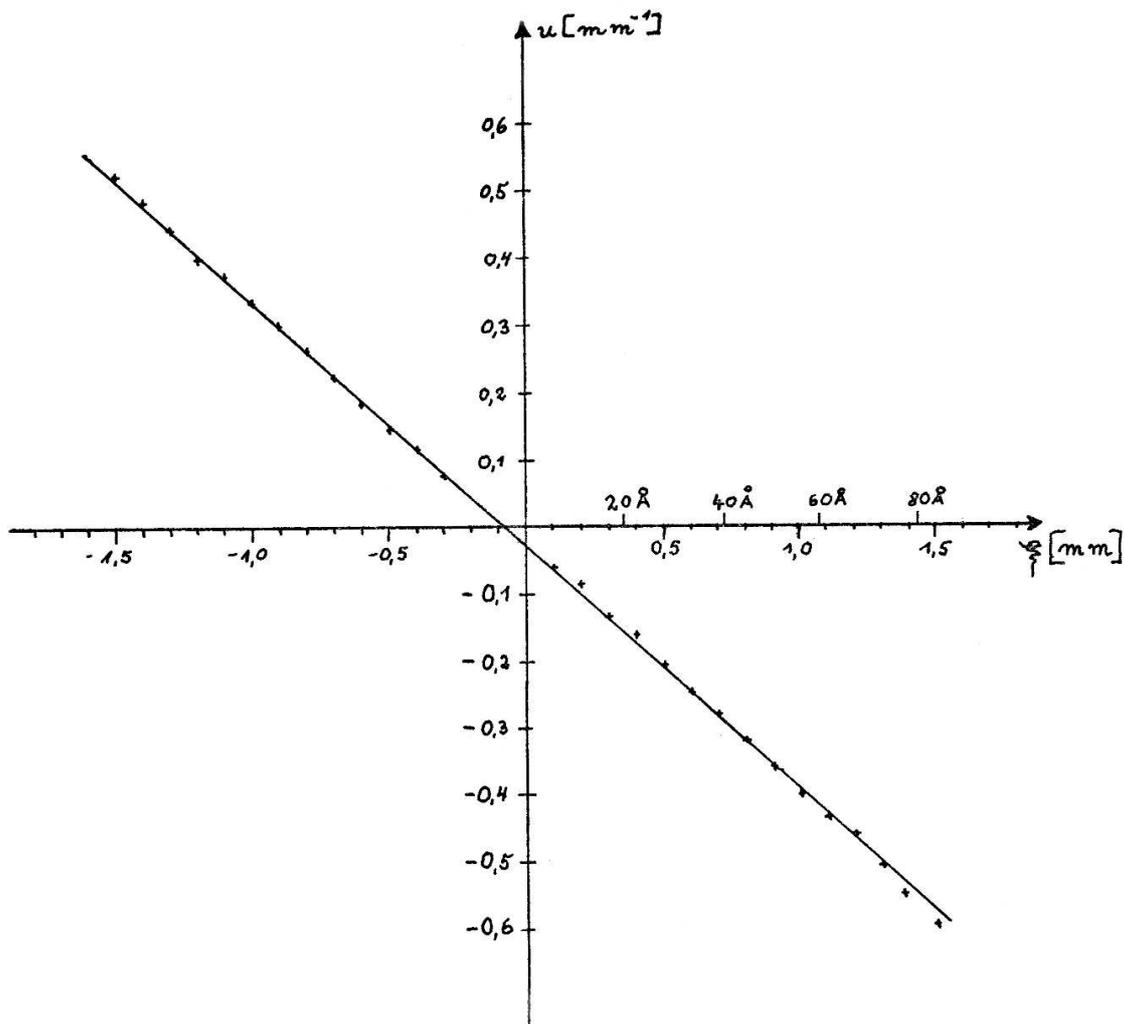


Abbildung 13b: Auswertung einer „Verschiebungs-Serie“: Kehrwert der gemessenen Streifenperiode, aufgetragen gegen die Verschiebung.

Zur Auswertung diente eine Defokus-Serie, bei der jeweils zwei Aufnahmen im Abstand von 10 sec mit unveränderter Linsenstromereinstellung belichtet wurden (Objektraumkühlung, $T = 3 \text{ sec}$, $V_{elopt} = 180\,000$). Es wurde jeweils das Korrelationsspektrum von zwei Aufnahmen gleicher Defokussierung durch das in Abschn. 5.2. beschriebene Verschiebungsexperiment hergestellt ($\xi = 15 \text{ \AA}$). In Abb. 14 sind Beispiele der so erhaltenen Diffraktogramme, in Gegenüberstellung zu den Diffraktogrammen der einzelnen Aufnahmen. In einzelnen Fällen ist deutlich zu erkennen, daß die Reichweite der Streifenmuster in der reziproken Ebene größer ist als die der sichtbaren Kontrastzonen. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die Tatsache, daß die Oszillationen von $\sin \gamma$ in den äußeren Ortsfrequenzbereichen rasch aufeinanderfolgen und die Zonen mit konstantem Kontrast sehr schmal werden (vgl. Abschn. 4.2.3.). Im Fall von Aufnahmen im Scherzer-Gebiet ($\Delta f \approx 1\,700 \text{ \AA}$ bei $C_0 = 3,9 \text{ mm}$ und $U = 100 \text{ kV}$) ermöglichen es die Modulationen erstmals, das Übertragungsgebiet abzuschätzen.

Tabelle 1: Auswertung der Diffraktogramme in Abb. 14

Abb.	Δf (Å)	Übertragungsgrenze (Å ⁻¹)	Auflösung (Å)
14a	1 820	0,254	3,94
14b	880	0,238	4,2
14c	-60	0,275	3,6

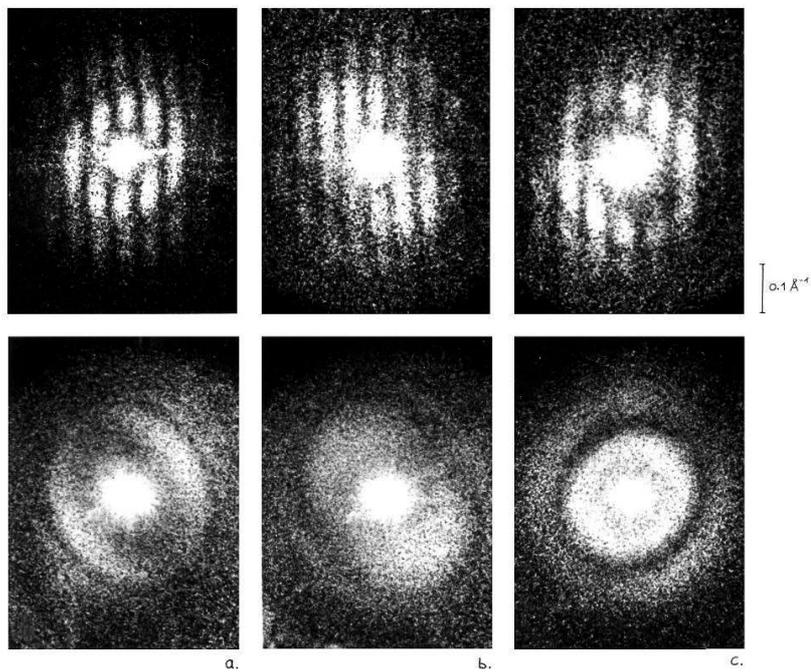


Abbildung 14a-c: Zur Bestimmung der Übertragungsgrenze: siehe Tab. 1. Die Verschiebung beträgt jeweils 15 Å.
oben: Korrelationsspektren;
unten: Diffraktogramme der einzelnen Aufnahmen.

$$U = 100 \text{ kV}; \Delta f_A = 800 \text{ Å}; V_{\text{elopt.}} = 180 \text{ 000}$$

5.8. Weitere Anwendungen

A) Über den speziellen Anwendungsbereich in der Elektronenmikroskopie hinausgehend, läßt sich die besprochene Methode als einfaches Hilfsmittel zur optischen Justierung verwenden. Der Vorteil gegenüber bekannten interferometrischen Methoden liegt in der Unempfindlichkeit gegen Störungen.

Zweckmäßigerweise wird man eine mit diffusem Licht belichtete Platte zusammen mit ihrer Kopie verwenden und so den gesamten Übergangsbereich der Photoplatte ausnutzen. Bereits ohne die in Abschn. 5.6. beschriebene Auswertung läßt sich so eine Justierungsgenauigkeit in der Größenordnung des Diffusionslichthofs für Licht erreichen.

Vor kurzem wurde ein im Prinzip ähnliches Verfahren angegeben, das auf der Ausnutzung des Speckle-Effekts beruht⁶⁷.

B) Die Methode läßt sich benutzen, um Sinus-Testgitter beliebiger Ortsfrequenz zu erzeugen. Man verwendet dazu ein Photomaterial, dessen Wienerspektrum über einen größeren Frequenzbereich konstant ist.

5.9. Verschiebungsexperimente mit Aufnahmen verschiedener Defokussierung

Auch Aufnahmen verschiedener Defokussierung sind mit Hilfe des Licht-Diffraktometers korrelierbar. Die entstehenden Diffraktogramme geben einen anschaulichen Eindruck von den komplizierten Kontrastübertragungsverhältnissen im Elektronenmikroskop. Der Ansatz ist ähnlich wie in (139), nur berücksichtigen wir diesmal keine Objektveränderung und setzen $s_1 = s_2$. Damit ergibt sich

$$t(\vec{r}) \sim \widehat{O} S_1 + \widehat{O} S_2 \delta(\vec{r} - \vec{r}_D) + n_1 + n_2 . \quad (152)$$

Die Fouriertransformation führt diesmal zu

$$F\{t(\vec{r})\} \sim OS_1 + OS_2 e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} + N_1 + N_2 . \quad (153)$$

Bildung des Betragsquadrats ergibt:

$$I_{Diffr.} \sim OO^* S_1 S_1^* + OO^* S_2 S_2^* + OO^* S_1 S_2^* e^{-2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} + OO^* S_1^* S_2 e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}_D} . \quad (154)$$

Indem wir nun $S_1 = \sin \gamma_1$, $S_2 = \sin \gamma_2$ identifizieren, erhalten wir

$$I_{\text{Diffr.}} \sim OO^* \{ \sin^2 \gamma_1 + \sin^2 \gamma_2 + 2 \sin \gamma_1 \sin \gamma_2 \cos(2\pi \vec{h} \vec{r}_D) \}. \quad (155)$$

Die Rauschterme sind weggelassen worden; ihr Einfluß wurde bereits in Abschn. 5.2. diskutiert.

Die Intensität im Diffraktogramm setzt sich also additiv zusammen aus dem Diffraktogramm der einzelnen Aufnahmen und einem Term, der ähnlich wie in (142) moduliert ist.

Man erhält wieder Streifensysteme, die jedoch nur in Bereichen mit einheitlichem Vorzeichen von $\sin \gamma_1$ und $\sin \gamma_2$ eine einheitliche Phase besitzen, in denen mit unterschiedlichem Vorzeichen um π verschoben sind.

Dies wird klarer bei einer anderen Darstellung von (155):

$$I \sim \sin^2 \gamma_1 + \sin^2 \gamma_2 + 2 |\sin \gamma_1 \sin \gamma_2| \cos[2\pi k r_D - \pi(1 - \text{sign}\{\sin \gamma_1 \sin \gamma_2\})]. \quad (156)$$

D.h. Ortsfrequenzbereiche, die in beiden Aufnahmen mit verschiedenem Kontrastvorzeichen übertragen wurden, sind an einer Streifenverschiebung um π im Diffraktogramm gegenüber der normalen Streifenlage (= Maximum im Nullpunkt des Diffraktogramms) kenntlich.

Der Phasensprung erfolgt stets an einer Knotenlinie einer der beiden Übertragungsfunktionen. Liegt die Defokussierung der einen Aufnahme im Scherzer-Bereich, so dient der große Ortsfrequenzbereich einheitlicher Phase gleichsam als Referenzbereich für die Phasen der Vergleichsaufnahme. In Abb. 15 ist ein solches Diffraktogramm abgebildet, dazu die Diffraktogramme der Einzelaufnahmen und eine Darstellung des aus den Parametern und der Verschiebung nach (155) errechneten Intensitätsgebirges. Der Unterschied in der Kontrastzonelage drückt sich in einer Streifenverschiebung in einer schmalen äußeren Zone aus.

In Abb. 16 wird gezeigt, wie sich die Zunahme der Defokus-Differenz bei gleichbleibender Referenzaufnahme auswirkt: weitere Kontrastzonen mit teils umgekehrter, teils gleicher Phase rücken nach innen.

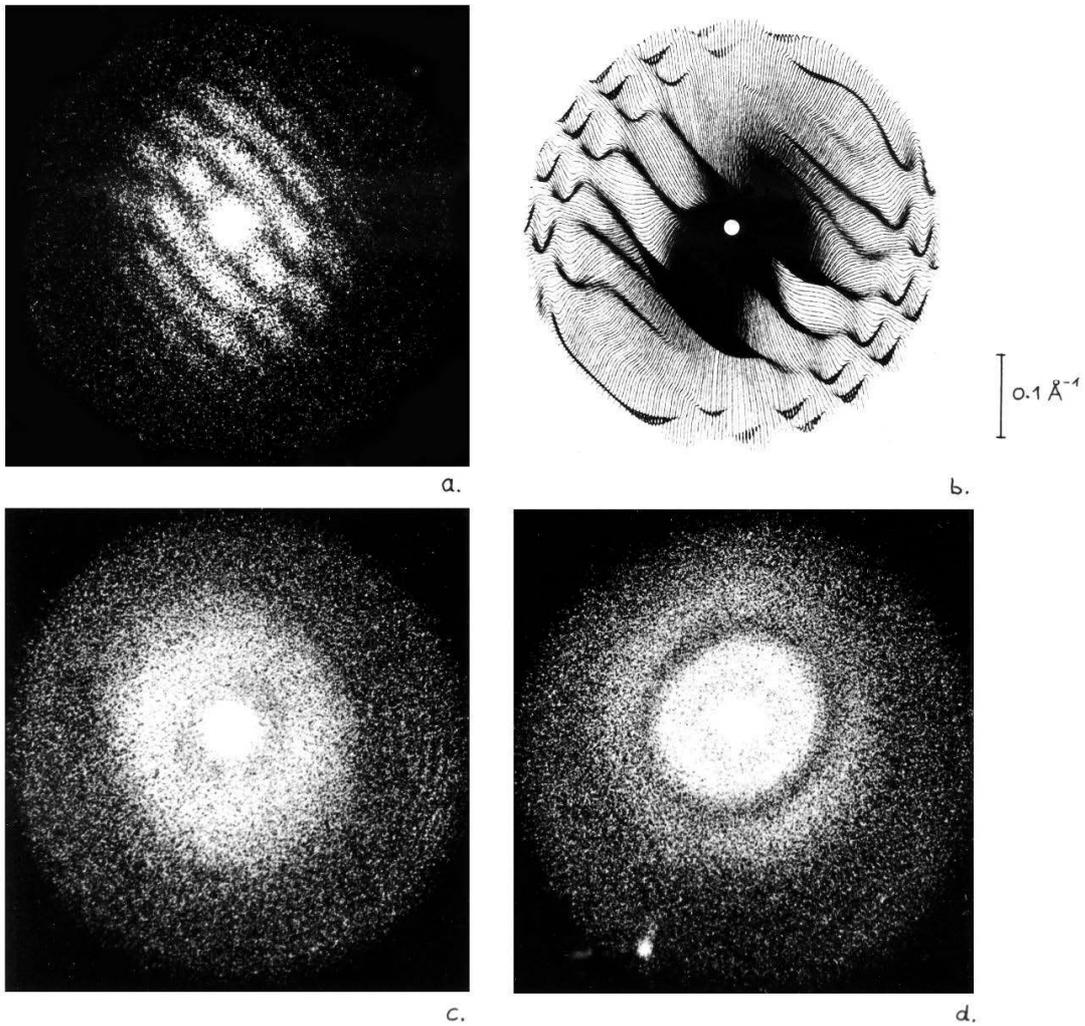


Abbildung 15: *Diffraktogramm von 2 um 15 \AA verschobenen übereinandergelegten Aufnahmen verschiedener Defokussierung ($\Delta f_1 = 1350 \text{ \AA}$, $\Delta f_2 = 1820 \text{ \AA}$). a) experimentell b) berechnet und als Intensitätsgebirge dargestellt, c) und d) Diffraktogramme der einzelnen Aufnahmen.*

Eine Konsequenz von (156) ist, daß der Gauß'sche Fokus $\Delta f = 0$ prinzipiell mit Hilfe einer Reihe von Aufnahmen absolut festgelegt werden kann.

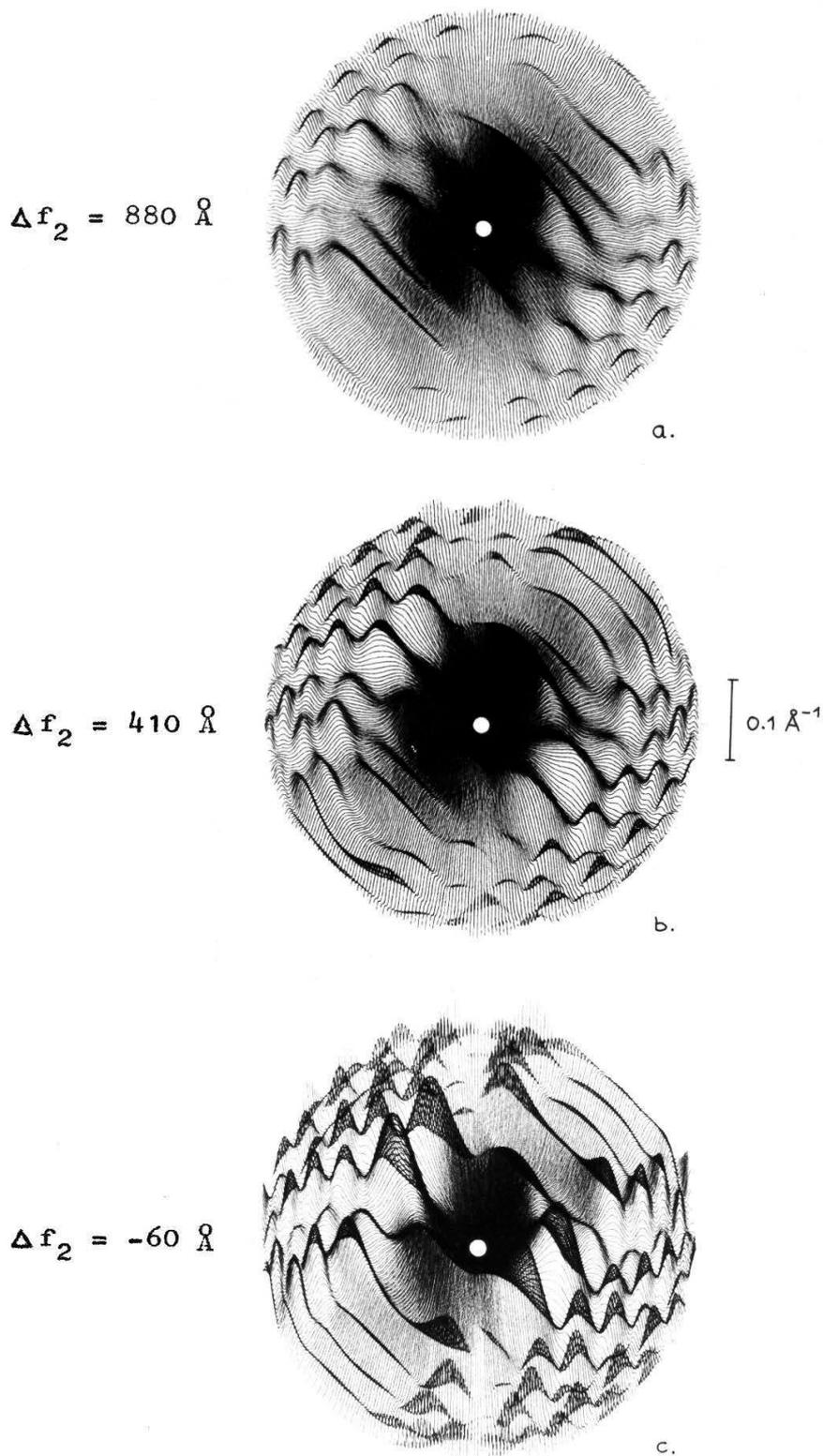


Abbildung 16: Weitere Korrelationsspektren, berechnet für dieselbe Referenzaufnahme wie in Abb. 15 ($\Delta f_1 = 1820 \text{ \AA}$), aber anderen Defokussierungen der Vergleichsaufnahmen ($\xi = 15 \text{ \AA}$).

Für kleine ϑ wird nämlich bei Fehlen des Astigmatismus, bzw. in der Richtung, in der sich der Astigmatismus nicht auswirkt,

$$\text{sign}\{\sin \gamma_i\} = -\text{sign}\{\Delta f_i\}; i = 1, 2 . \quad (157)$$

Die Streifen sind also in diesem Bereich nur dann um π verschoben gegen die Normallage, wenn die beiden Aufnahmen auf verschiedenen Seiten des Gauß'schen Fokus liegen.

Da der für die Kontrastwechsel verantwortliche Term

$$\Delta \gamma = \gamma_2 - \gamma_1 = \frac{\pi}{2\lambda} \vartheta^2 (\Delta f_2 - \Delta f_1) \quad (158)$$

quadratisch mit ϑ wächst, wechseln für große Defokusdifferenzen die Bereiche unterschiedlicher Streifenphase immer schneller einander ab, bis die Extrema der Verteilung (156) zu einem eigenen Muster verschwimmen (Abb. 17).

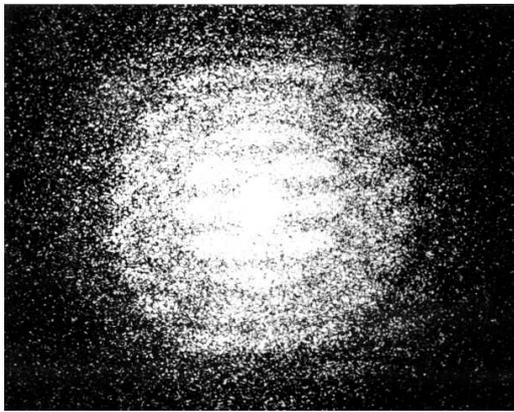


Abbildung 17: Korrelationspektrum bei hoher Defokusdifferenz
($\Delta f_1 = -1\,000 \text{ \AA}$, $\Delta f_2 = -2\,000 \text{ \AA}$)

Man erhält für die Orte der außen gelegenen Maxima nach umständlicher Rechnung (s. Anhang I) einen sehr einfachen Ausdruck: Sie liegen auf konzentrischen Kreisen um zwei „Quellpunkte“, die auf der Streifennormalen auf beiden Seiten des Ursprungs liegen.

Für den Abstand der Quellpunkte vom Ursprung ergibt sich

$$q = \frac{|\vec{r}_D|}{\delta \Delta f \cdot \lambda} \quad (159)$$

$$\text{und für die Radien } r_N = \sqrt{q^2 + \frac{N}{\lambda \cdot \delta \Delta f}} \quad (160)$$

mit $\delta \Delta f = \Delta f_2 - \Delta f_1$.

Aus (157) läßt sich also die Defokusdifferenz der beiden Aufnahmen errechnen, wenn $|\vec{r}_D|$ und λ bekannt ist, ohne Kenntnis der anderen Parameter ($C_{\bar{o}}$, Δf_A).

Bemerkenswert ist, daß q eine in der reziproken Ebene meßbare Größe ist, die direkt proportional ist zu einer Größe im Ortsraum $|\vec{r}_D|$.

Die laterale Zuordnung von zwei Aufnahmen verschiedener Defokussierung ist anhand der Muster immer noch gut möglich, wenn auch etwas ungenauer als im Fall gleicher Δf -Werte. In einem inneren Bereich des Diffraktogramms ist der Einfluß des phasenschiebenden Terms (158) noch sehr klein, deshalb lassen sich hier die Veränderungen der Streifenperiode bei Verschiebung der Aufnahmen ebenso verfolgen wie im Fall von Aufnahmen gleicher Defokussierung.

Dafür bietet die lichtdiffraktometrische Untersuchung einen eindeutigen Vorteil gegenüber Rechenmethoden, wenn das schon besprochene Integral (106) $\int_0^{\vartheta_{Ap}} \sin \gamma_1 \cdot \sin \gamma_2 \vartheta d\vartheta$ verschwindet oder so klein ist, daß der Korrelations-Peak nicht auffindbar ist.

Da Höchstauflösungsaufnahmen verschiedener Defokussierung im Allgemeinen kaum noch Ähnlichkeiten im Detail aufweisen, ist es einigermaßen überraschend, daß es trotzdem noch gelingt, ihre gegenseitige Position mit hoher Genauigkeit wiederzufinden.

Kapitel 6

Nachweis von Drifterscheinungen im Diffraktogramm

Wie bereits in Abschn. 5.2. kurz angedeutet, lassen sich Diffraktogramme einiger Aufnahmen durch die Annahme erklären, daß während der Belichtungszeit eine Objektwanderung (Drift) auftritt.

Erfolgt die Bewegung sprunghaft, so besteht offenbar kein Unterschied zu unseren bereits beschriebenen Verschiebungsexperimenten; wir erwarten wieder eine Intensitätsverteilung im Diffraktogramm, die sich durch eine Kosinus-Modulation aus der ungestörten Intensitätsverteilung ergibt.

Um aber auch andere Zeitabhängigkeiten der Objektbewegungen und ihren Einfluß auf die Fourierquadrat-Verteilung beschreiben zu können, ist es zweckmäßiger, eine allgemeinere Notation einzuführen.

Die anschließenden Überlegungen und experimentellen Ergebnisse werden schon zum Teil in einer vorausgegangenen Arbeit dargestellt¹⁾.

Wir nehmen an, daß die Bildverteilung während der Aufnahmedauer gegenüber der ruhenden Photoplatte eine Translation ausführt¹⁾.

Ursachen einer solchen Bewegung können sein:

- a) Objektbewegungen auf der Trägerfolie
- b) Bewegungen der Folie relativ zur Objektpatrone
- c) Bewegungen des Objektstischs
- d) Instabilitäten der Mikroskopsäule
- e) Bewegungen der Photoplatte in der Schleusenkammer
- f) elektrostatische Aufladung an Blendenrändern.

¹⁾ Rotationen des Bildes während der Belichtungsdauer wurden nicht festgestellt. Auch die Untersuchung von mehreren Aufnahmen einer Serie zeigte, daß die Bildrotation gegenüber der Translation geringfügig ist. Wegen der guten Linsenstromstabilisierung scheiden Linsenfeldänderungen als mögliche Ursachen für Rotationen praktisch aus.

6.1. Theorie

Indem wir den zeitlichen Verlauf der Bewegung noch offenlassen, können wir die Bildverteilung in jedem Augenblick beschreiben durch

$$b(\vec{r} - \vec{r}_D(t)) = b(\vec{r}) \widehat{\delta(\vec{r} - \vec{r}_D(t))} . \quad (161)$$

Nach der Aufnahmezeit T ist auf der Photoplatte die verwaschene Verteilung

$$b'(\vec{r}) = \frac{1}{T} \int_0^T b(\vec{r}) \widehat{\delta[\vec{r} - \vec{r}_D(t)]} dt = b(\vec{r}) \widehat{\frac{1}{T} \int_0^T \delta[\vec{r} - \vec{r}_D(t)] dt} \quad (162)$$

entstanden. Die Schreibweise (161) verhilft uns also zur folgenden Darstellung einer allgemeinen Bewegung als einer Faltung der unveränderten Bildverteilung mit einer „Verwaschungsfunktion“ (vgl. eine ähnliche Darstellung in ^{65b}).

Durch Fouriertransformation erhalten wir aus (162)

$$F\{b'(\vec{r})\} = F\{b(\vec{r})\} \cdot \frac{1}{T} \cdot \int e^{2\pi i \vec{h} \vec{r}_D(t)} dt = F\{b(\vec{r})\} \cdot M(\vec{h}) \quad (163)$$

und als beobachtbare Intensitätsverteilung im Diffraktogramm

$$I_{\text{Diffr.}} \sim |F\{b(\vec{r})\}|^2 \cdot |M(\vec{h})|^2 . \quad (164)$$

Wird als Objekt eine Kohlefolie verwendet, so erscheint in (164) wegen $|F\{b(\vec{r})\}|^2 = OO^*SS^*$ im wesentlichen die Verteilung $\sin^2 \gamma$, moduliert mit einer Funktion $|M(\vec{h})|^2$.

Die Gestalt der Modulationsfunktion hängt nun von dem zeitlichen Verhalten des Verschiebungsvektors $\vec{r}_D(t)$ ab. Eine Annahme über $\vec{r}_D(t)$ entspricht einer Gewichtung der Orte, die die Bildverteilung nacheinander einnimmt.

6.2. Spezielle Bewegungen

Wir besprechen folgende einfache Fälle:

- a) Plötzlicher Sprung des Bildes

- b) Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit
- c) periodische, harmonische Schwingung

Die Bewegung soll dabei jeweils geradlinig erfolgen.

6.2.1. Sprungdrift

Das Bild hat die Position $\vec{r} = 0$ bis zur Zeit T_1 , springt dann in die neue Lage $\vec{r} = \vec{r}'$ und bleibt dort bis zum Ende der Aufnahme.

$$\vec{r}_D(t) = \begin{cases} 0 & 0 \leq t \leq T_1, \\ \vec{r}' & T_1 < t \leq T. \end{cases} \quad (165)$$

Mit Einführung von

$$\eta_1 = \frac{T_1}{T}, \quad \eta_2 = \frac{T_2}{T}, \quad T_1 + T_2 = T,$$

$$M(\vec{h}) = \eta_1 + \eta_2 e^{2\pi i \vec{r}' \cdot \vec{h}}; \quad |M(\vec{h})|^2 = 1 + \eta_1 \eta_2 [\cos(2\pi \vec{h} \cdot \vec{r}') - 1]. \quad (166)$$

Wir erhalten also wieder eine Kosinus-Modulation, deren Amplitude hier von den Verweilzeiten in den beiden Positionen abhängt.

Wir nennen das Verhältnis von periodischem zu konstantem Anteil von $|M|^2$ den Modulationsgrad G .

$$G(\eta_1) = \frac{2\eta_1(1-\eta)}{1-2\eta_1(1-\eta)} = \frac{1}{\frac{1}{2\eta_1(1-\eta)} - 1}. \quad (167)$$

Seine Abhängigkeit von η_1 ist in Abb. 18 dargestellt.

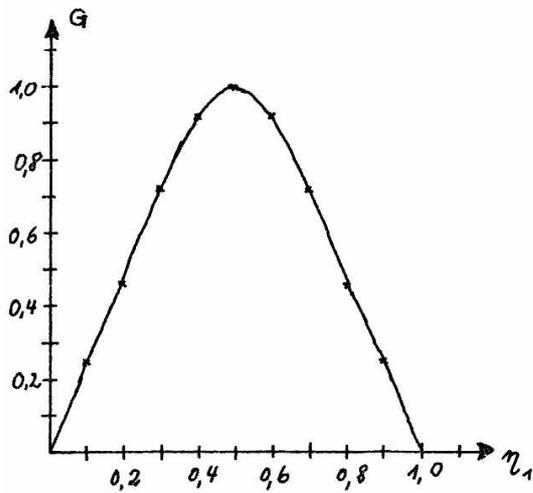


Abbildung 18: Modulationsgrad in Abhängigkeit von den Verweilzeiten bei Sprungdrift.

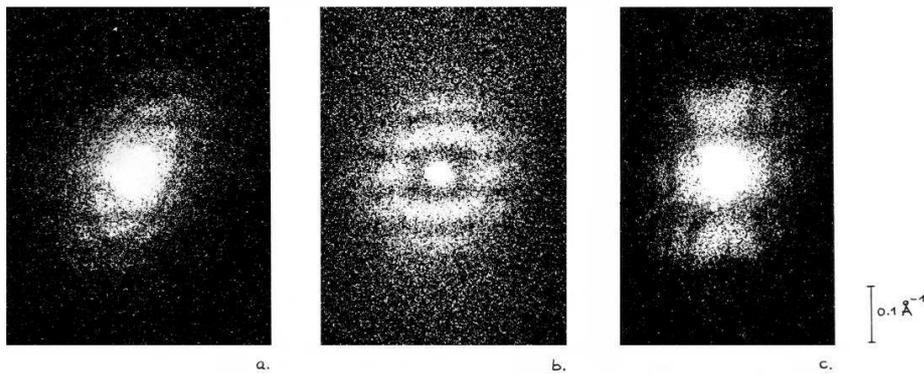


Abbildung 19: Beispiele für eine Modulation des Diffraktogramms durch Sprungdrift ($U = 80 \text{ kV}$, $V_{\text{elopt}} = 220 \text{ 000}$).
Objekt: Amporphe Kohlefolie

a)	$\xi = 20 \text{ \AA}$	$\Delta f = 4 \text{ 100 \AA}$	$f_A = 2 \text{ 100 \AA}$
b)	$\xi = 17 \text{ \AA}$	$\Delta f = 2 \text{ 000 \AA}$	$f_A = 200 \text{ \AA}$
c)	$\xi = 7 \text{ \AA}$	$\Delta f = 1 \text{ 900 \AA}$	$f_A = 2 \text{ 100 \AA}$

G wird am größten für $\eta_1 = \eta_2 = \frac{1}{2}$, d.h. $T_1 = T_2 = \frac{T}{2}$, und aus (166) wird

$$|M|^2 = \frac{1}{2}(1 + \cos(2\pi\vec{h}\vec{r}')) . \quad (168)$$

Aus der Größe des Modulationsgrads kann man also die Verweilzeiten T_1 und T_2 bestimmen.

Das Streifenmuster wurde bei mehreren Kohlefolienaufnahmen beobachtet und konnte verschiedenen Verschiebungen $\xi = |\vec{r}'|$ zugeordnet werden.

Die Abb. 19a – c zeigen einige solcher Diffraktogramme.

In der Abb. 20 a,b ist die elektronenmikroskopische Aufnahme einer verschmutzten Graphitfolie zusammen mit ihrem Diffraktogramm dargestellt. Die Verschmutzungsschicht hat offenbar ähnliche Eigenschaften wie eine amorphe Kohlefolie; im Diffraktogramm sieht man die für aperiodische Objekte typische kontinuierliche Verteilung von $|O|^2$, in der die vom kristallinen Aufbau der Graphitfolie herstammenden Reflexe sich nur in einzelnen Fällen herausheben, im betrachteten Beispiel jedoch untergehen.

Man erkennt in der Aufnahme eine ausgeprägte Vorzugsrichtung, die der Normalrichtung der streifenförmigen Modulation zugeordnet ist.

Zum Vergleich wurde die Funktion $\sin^2 \gamma (1 + \cos(2\pi\vec{h}\vec{r}'))$ berechnet und als „Intensitätsgebirge“ dargestellt (Abb. 20c).

Wir können ausschließen, daß die beobachteten Modulationen eine Eigenschaft des Objekts wiedergeben¹⁾, da stets nur einzelne Aufnahmen einer Defokus-Serie diese Erscheinung zeigen.

¹⁾ Immerhin denkbar, wenn auch sehr unwahrscheinlich ist die Alternativ-Hypothese, ein Teil des Objekts habe selbst eine Doppelstruktur, die man sich durch Translation um \vec{r}' aus einer einfachen amorphen Struktur entstanden denken kann.

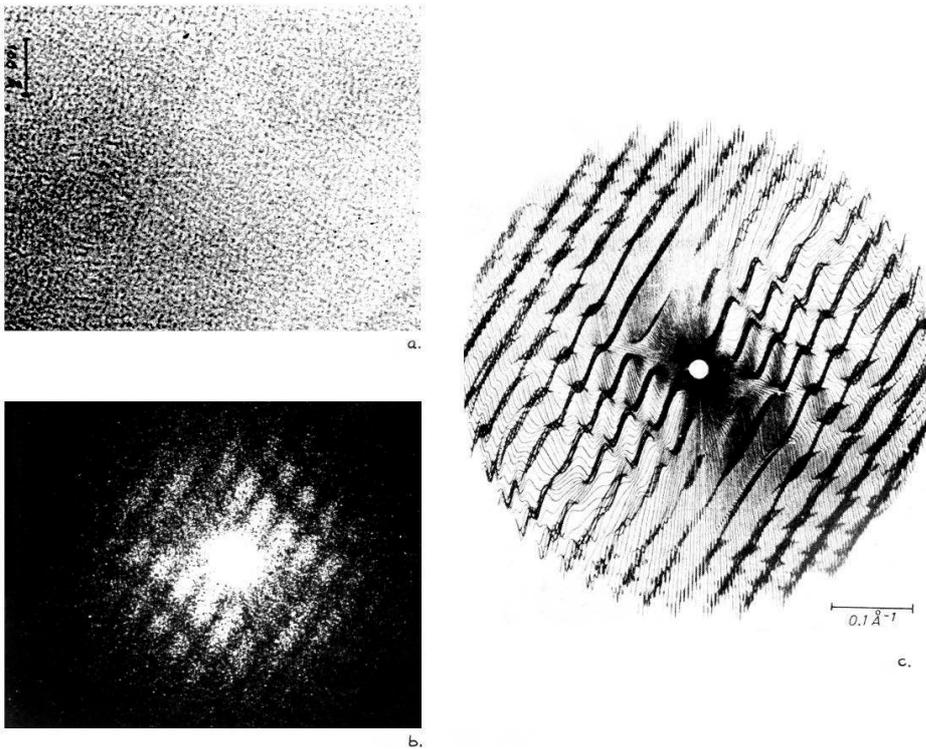


Abbildung 20: Sprungdrift bei der Aufnahme einer Graphitfolie.
 $U = 80 \text{ kV}, V_{\text{elopt}} = 160\,000, \Delta f \approx 1200 \text{ \AA}, \Delta f_A \approx 3800 \text{ \AA}, \xi = 30 \text{ \AA}.$
 a) Aufnahme mit erkennbarer Verwaschungsrichtung
 b) Lichtoptisches Diffraktogramm
 c) berechnetes Intensitätsgebirge $MM^* \cdot \sin^2 \gamma$ ($\vartheta \leq 1,2 \cdot 10^{-2}$).

6.2.2. Drift mit konstanter Geschwindigkeit

$$\vec{r}_D(t) = \vec{v}t. \quad (169)$$

Aus (163) folgt jetzt

$$M = \frac{1}{T} \int_0^T e^{2\pi i \vec{h} \vec{v} t} dt = \frac{\sin(\pi \vec{h} \vec{v} T)}{\pi \vec{h} \vec{v} T} \quad (170)$$

bis auf einen Phasenvektor, und

$$|M|^2 = \left(\frac{\sin \pi \vec{h} \vec{r}'}{\pi \vec{h} \vec{r}'} \right)^2; \quad \vec{r}' \stackrel{\text{def}}{=} \vec{v}T. \quad (171)$$

Wie im Fall der Sprungdrift ist diese Modulationsfunktion nur abhängig von der Komponente des reziproken Vektors in die Richtung der Verschiebung. Wir erhalten wieder ein Streifenmuster, nur ist jetzt der mittlere Streifen doppelt so breit wie die äquidistanten Parallelstreifen. Wegen des schnellen Abklingens der Amplituden mit wachsender Vektorkomponente sind die Nebenmaxima im Diffraktogramm wahrscheinlich nur äußerst schwer zu beobachten. Jedoch findet man öfter den Übertragungsbereich auf einen scharf begrenzten Streifen unterschiedlicher Breite begrenzt (Abb. 21). Wir können den sichtbaren Streifen mit dem Hauptmaximum in (170) identifizieren und aus seiner Breite die gesamte Verschiebung bzw. die Driftgeschwindigkeit errechnen.

Da auch die unten besprochene periodische Bewegung zu einem relativ starken Abfall der Nebenmaxima führt, können wir die in Abb. 21 aufgeführten Beispiele allerdings nicht mit Sicherheit klassifizieren.

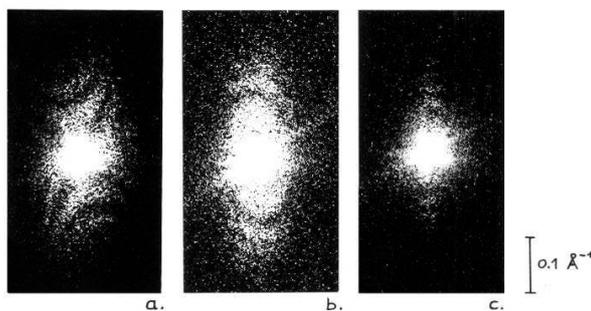


Abbildung 21: Beispiele für eine Modulation des Diffraktogramms durch eine gleichmäßige Drift ($U = 80 \text{ kV}$, $V_{\text{elopt}} = 220 \text{ 000}$). Objekt: Amorphe Kohlefolie

a)	$\xi = 18 \text{ \AA}$	$\Delta f = -250 \text{ \AA}$	$\Delta f_A = 2 \text{ 100 \AA}$
b)	$\xi = 22 \text{ \AA}$	$\Delta f = 1 \text{ 350 \AA}$	$\Delta f_A = 2 \text{ 100 \AA}$
c)	$\xi = 54 \text{ \AA}$	$\Delta f = 6 \text{ 500 \AA}$	$\Delta f_A = 400 \text{ \AA}$

6.2.3. Periodische Bewegung

Die Bildverteilung soll sich mit der Amplitude $r'/2$ und der Frequenz ω relativ zur Photoplatte bewegen:

$$\vec{r}_D(t) = \frac{\vec{r}'}{2} \cos(\omega t). \quad (172)$$

Man erhält

$$M(\vec{h}) = \frac{1}{T} \int_0^T e^{i[\pi \vec{h} \vec{r}'] \cos(\omega t)} dt = \frac{1}{\omega T} \int_0^{\omega t = N \cdot 2\pi} e^{i(\pi \vec{h} \vec{r}') \cos(\omega t)} d(\omega t) = J_0(\pi \vec{h} \vec{r}') \quad (173)$$

$$\text{und } |M|^2 = J_0^2(\pi \vec{h} \vec{r}'). \quad (174)$$

J_0 ist die Besselfunktion nullter Ordnung.

Wir haben wieder ein breites hohes Hauptmaximum; die Nebenmaxima fallen nicht so stark ab wie im Fall der gleichförmigen Bewegung, ihre Breite nimmt ab mit wachsender Vektor-
komponente $\vec{h} \frac{\vec{r}'}{|\vec{r}'|}$.

Aus der Lage der Nullstellen von J_0 bzw. der Lage der dunklen Streifen kann die Amplitude der Schwingung $\frac{|\vec{r}'|}{2}$ errechnet werden. Die 1. Nullstelle liegt z.B. für $|\vec{r}'| = 2 \text{ \AA}$ an der Übertragungsgrenze.

Ein ähnlicher Term wie in (173) tritt in der Röntgenstrukturanalyse bei der Berücksichtigung der thermischen Schwingungen auf⁶⁸. Wegen der Kleinheit der Amplituden können Temperatureffekte im bisherigen elektronenmikroskopischen Auflösungsbereich nur einen leichten zusätzlichen Abfall der Fourieramplituden bewirken. Er beträgt für eine Auslenkung von $|\vec{r}'| = 0,2 \text{ \AA}$ (typische mittlere Schwingungsamplitude bei Zimmertemperatur) etwa 1%, entsprechend 2% im Fourierbetragsquadrat.

Dagegen sollten mechanische Schwingungen kleiner Amplituden im Diffraktogramm nachweisbar sein, die durch Erschütterung der Mikroskopsäule während der Belichtungszeit hervorgerufen werden.

In Abb. 22 a-c sind die Fourierbetragsverteilungen für die drei behandelten Drifterscheinungen gegenübergestellt. Die elektronenoptischen Parameter sind für alle Abbildungen gleich; das ungestörte Diffraktogramm ist in Abb. 22d zum Vergleich berechnet.

In jedem Fall überstreicht die gesamte Bewegung eine Strecke von $|\vec{r}'| = 10 \text{ \AA}$.

Abb. 23 zeigt den Verlauf der Modulationsfunktionen in Abb. 22.

Rein qualitativ lassen sich also die verschiedenen Driftbewegungen im Diffraktogramm anhand folgender Kriterien unterscheiden:

- a) Sprungdrift: äquidistante Minima, gleichbleibende Amplitude
- b) gleichmäßige Bildbewegung: äquidistante Minima, breites Hauptmaximum, nach außen stark abfallende Amplitude.
- c) harmonische Schwingung: nicht-äquidistante Minima, breites Hauptmaximum, nach außen abfallende Amplitude.

Obwohl es grundsätzlich möglich ist, die durch Drift entstandenen Bildverwaschungen durch ein geeignetes Filter (optisch oder rechnerisch) wieder zu beseitigen (vgl. praktische Versuche^{69,70}), ist ein solches Verfahren für die Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen doch von geringem Interesse, da stets ungestörte Nachbaraufnahmen zur Verfügung stehen. Es ist umgekehrt zweckmäßig, solche Aufnahmen von der weiteren Auswertung auszuschließen.

Wie sich gezeigt hat, ist hierfür das Lichtdiffraktometer ein bequemes Hilfsmittel.

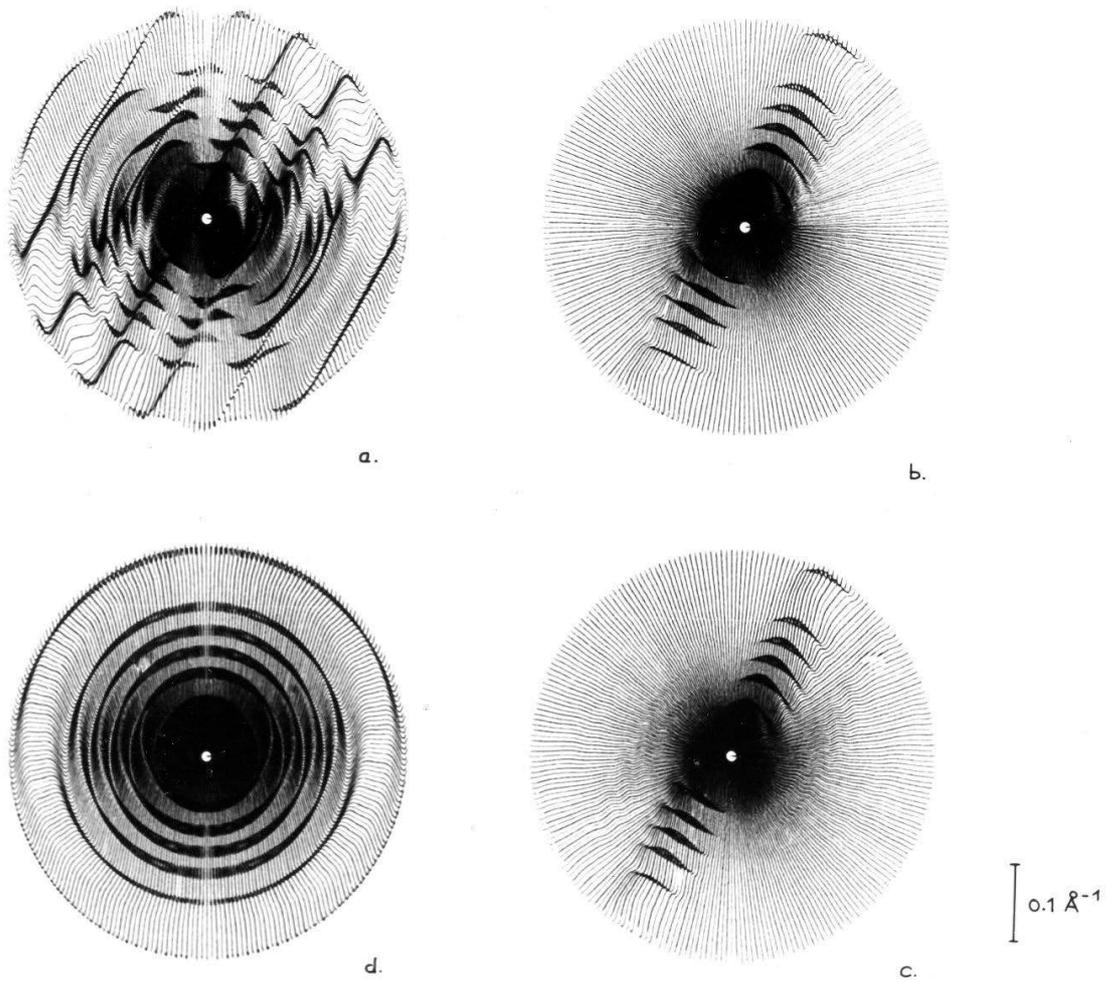


Abbildung 22: Berechnete Intensitätsverteilung im Diffraktogramm ($\theta \leq 1,2 \cdot 10^{-2}$) $\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$; $\Delta f_A = 0 \text{ \AA}$;
 $U = 100 \text{ kV}$; $C_0 = 3,9 \text{ mm}$; $\xi = 10 \text{ \AA}$.
 a) Sprungdrift b) Drift mit konstanter Geschwindigkeit c) harmonische Schwingung d) ungestört.

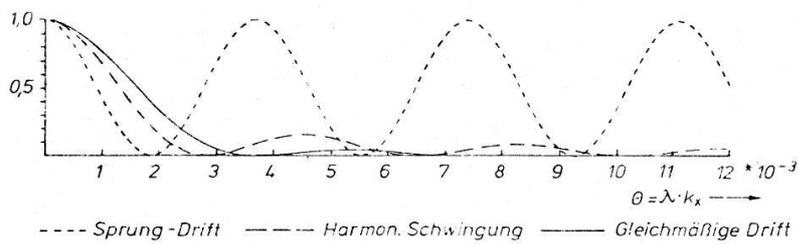


Abbildung 23: Modulationsfunktionen zu Abb. 22

Kapitel 7

Bildrekonstruktionsverfahren

Die Ergebnisse von Abschn. 5.7. legen die Annahme nahe, daß das Übertragungsgebiet in günstigen Fällen weiter ausgedehnt ist, als es der bisher erreichten Punktauflösung entspricht. Die unrichtige Phasenlage eines Teils der Kontrastzonen verhindert jedoch, daß ein gut apodisierter Bildpunkt mit scharfem Zentralmaximum zustande kommt.

Man hat nun zwei Möglichkeiten, die Übertragungseigenschaften zu verbessern:

- 1) der Eingriff in die Aperturbene. Die Phasenumkehr der Zonen mit „falschem“ Kontrast könnte durch Phasenzonenplatten erreicht werden, die aber derzeit noch nicht technisch realisierbar sind. Nach Hoppe⁴ ist aber bereits schon eine Verbesserung zu erzielen, wenn diese Zonen nur abgeblendet werden.
- 2) Nachträgliche Filterung des Bildes. Bei Kenntnis der Übertragungsfunktion ist es wegen der einfachen Fourierbeziehung (8) in Abschn. 1.1. möglich, das „ideale“ Bild nachträglich zu berechnen bzw. durch eine optische Filterung zu erzeugen^{71,72}.

Wir werden zunächst dieses Verfahren allgemein einführen und auf die Phasenkontrastabbildung anwenden. Dabei soll auch der Zoneneingriff in die Aperturbene der Anwendung einer entsprechenden Filterfunktion gegenübergestellt werden.

7.1. Allgemeine Formulierung des Problems

Ausgehend von der Faltungsdarstellung des Bildes

$$b(\vec{r}) = o(\vec{r}) \widehat{s(\vec{r})} + n(\vec{r}) \tag{175}$$

fragen wir nach einer Faltungsoperation, mit der wir die Objektverteilung möglichst ungestört wiedergewinnen. Mit $n(\vec{r})$ ist ein additives, bildseitiges Rauschen gemeint.

Wir fordern also, daß

$$s'(\vec{r}) \widehat{b(\vec{r})} = o(\vec{r}) \widehat{s(\vec{r})} s'(\vec{r}) + n(\vec{r}) \widehat{s'(\vec{r})} = o'(\vec{r}) \tag{176}$$

mit einer zunächst unbekanntem Funktion $s'(\vec{r})$ der Objektverteilung möglichst „ähnlich“ wird. Wir könnten versuchen, analog Abschn. 3.1. von dem Ähnlichkeitskriterium

$$\iint \{o(\vec{r}) - o'(\vec{r})\}^2 d\vec{r}$$

ausgehend, die Funktion $s'(\vec{r})$ zu bestimmen. Die Behandlung dieser komplizierten Variationsaufgabe geht aber über den Rahmen der Arbeit hinaus, deshalb wollen wir uns damit begnügen, diesen allgemeinen Weg anzudeuten.

Die Untersuchung der Gleichung (176) wird wesentlich erleichtert, wenn wir zur Fourierdarstellung übergehen:

$$S'(\vec{h}) B(\vec{h}) = O(\vec{h}) S(\vec{h}) S'(\vec{h}) + N(\vec{h}) S'(\vec{h}) = O'(\vec{h}). \quad (177)$$

Die Fouriertransformierte $S'(\vec{h})$ unserer gesuchten Ortsfunktion, $s'(\vec{r})$, wollen wir Filterfunktion nennen. In der Terminologie der Röntgenstrukturanalyse ist sie die rückmodifizierte Funktion (vgl. Abschn. 1.1).

Man sieht sofort, daß es nicht genügt, $S'(\vec{h}) = S(\vec{h})^{-1}$ zu setzen. Enthält z.B. $S(\vec{h})$ Nullstellen, so würde das Rauschspektrum an den Unstetigkeitsstellen von $S'(\vec{h})$ sehr stark anwachsen, und das rekonstruierte Bild enthielte die Objektverteilung zwar ohne Abbildungsfehler, aber völlig verdeckt in einer verstärkten Rauschumgebung.

Wegen dieser Rauschverstärkung braucht auch dann $S'(\vec{h}) = S(\vec{h})^{-1}$ nicht die günstigste Lösung zu sein, wenn $S(\vec{h})$ keine Nullstellen enthält. Vor der Wahl einer Filterfunktion $S'(\vec{h})$ muß vielmehr stets geklärt werden, welchen Verstärkungsfaktor man bereit ist hinzunehmen.

Wir können zwischen der Varianz (mittleren quadratischen Schwankung) der Rauschverteilung vor und nach der Anwendung der Filterung eine Beziehung herstellen und auf diese Weise einen integralen Rauschverstärkungsfaktor angeben⁷⁰:

Wegen

$$n'(\vec{r}) = n(\vec{r}) \widehat{s'(\vec{r})}$$

besteht zwischen den Wienerpektren $W'(\vec{h}) = N'^2(\vec{h})$ und $W(\vec{h}) = N^2(\vec{h})$ die Beziehung $W'(\vec{h}) = S'(\vec{h})W(\vec{h})$ (178) (s. Absch. 4.1.)

Mittelwertbildung über die Ortsfrequenzebene ergibt

$$\frac{1}{B} \iint_B W'(\vec{h}) d\vec{h} = \frac{1}{B} \iint_B S'^2(\vec{h}) W(\vec{h}) d\vec{h}. \quad (179)$$

Wegen der statistischen Unabhängigkeit der Funktionen $S'^2(\vec{h})$ und $W(\vec{h})$ im rechten Integranden folgt daraus

$$\frac{1}{B} \iint_B W'(\vec{h}) d\vec{h} = \frac{1}{B} \iint_B W(\vec{h}) d\vec{h} \cdot \frac{1}{B} \iint_B S'^2(\vec{h}) d\vec{h} \quad (180)$$

(d.h. $\rho = \overline{WS'} - \overline{W} \overline{S'} = 0$; s. Abschn. 4.1).

Die Anwendung des Parsevalschen Theorems auf beiden liefert

$$\sigma_{n'} = \sigma_n \frac{1}{B} \iint_B S'^2(\vec{h}) d\vec{h} \quad (181)$$

$$\text{oder } V_n = \frac{\sigma_{n'}}{\sigma_n} = \frac{1}{B} \iint_B S'^2(\vec{h}) d\vec{h}$$

als Verstärkungsfaktor für die Varianz σ_n der Eingangs-Rauschverteilung. V_n wird offenbar unendlich groß, wenn $S'(\vec{h}) = S(\vec{h})^{-1}$ gewählt wird und $S(\vec{h})$ Nullstellen im Übertragungsgebiet hat.

Ähnlich gilt für die Varianz der Bildverteilung vor der Rekonstruktion

$$\sigma_b = \sigma_o \frac{1}{B} \iint_B S^2(\vec{h}) d\vec{h} = \sigma_o \cdot V_b \quad (182)$$

und nach der Rekonstruktion

$$\sigma_{b'} = \sigma_o \frac{1}{B} \iint_B S^2(\vec{h}) S'^2(\vec{h}) d\vec{h} = \sigma_o \cdot V_{b'} \quad (183)$$

wobei σ_o die Varianz der Objektverteilung bedeutet (bzw. die einer Bildverteilung bei idealer Abbildung und ohne Rauschen).

Wir können wieder einen Verstärkungsfaktor definieren, der diesmal die Vergrößerung des relativen Strukturgehalts angibt (s. Abschn. 7.3.).

$$V_s = \frac{\sigma_{b'}}{\sigma_b} = \frac{V_{b'}}{V_b} \quad (184)$$

Von unserem Ziel, der Wiedergewinnung des unverfälschten Signals her gesehen, ist es günstig, daß der Wert des Integrals in (183) möglichst nahe an Eins liegt.

Da im Normalfall $\frac{1}{B} \iint_B S^2(\vec{h}) d\vec{h} < 1$ gilt, ist eine Rekonstruktion vom beschriebenen Typ stets gekennzeichnet durch die Eigenschaft $V_s > 1$. (185)

Uns interessiert nun insbesondere, wie sich das Signal/Rauschverhältnis ändert durch die Filterung. Wir bilden dazu den Quotienten

$$\tau = \frac{\sigma_{b'}/\sigma_{n'}}{\sigma_b/\sigma_n} = \frac{\sigma_{b'}/\sigma_b}{\sigma_{n'}/\sigma_n} = \frac{V_s}{V_n} = \frac{\iint_B S^2(\vec{h}) S'^2(\vec{h}) d\vec{h}}{\frac{1}{B} \iint_B S^2(\vec{h}) d\vec{h} \iint_B S'^2(\vec{h}) d\vec{h}}. \quad (186)$$

Diese Beziehung ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Wahl einer geeigneten Gewichtsfunktion.

Damit die Filterfunktion endlich bleibt in den Nullstellen von $S(\vec{h})$, bilden wir nun

$$S'(\vec{h}) = \frac{g(\vec{h})}{S(\vec{h})} \quad (187)$$

mit einer geeigneten Gewichtsfunktion $g(\vec{h})$, die dieselben Nullstellen haben soll wie $S(\vec{h})$. Aus (181) bzw. (184) wird jetzt

$$V_n = \frac{1}{B} \iint_B \left(\frac{g(\vec{h})}{S(\vec{h})} \right)^2 d\vec{h} \quad (188)$$

$$V_s = \frac{\frac{1}{B} \iint_B g^2(\vec{h}) d\vec{h}}{\frac{1}{B} \iint_B S^2(\vec{h}) d\vec{h}} \quad (189)$$

und die eingangs gesuchte Funktion lautet

$$s'(\vec{r}) = F^{-1} \left\{ \frac{g(\vec{h})}{S(\vec{h})} \right\}.$$

Das beschriebene Rekonstruktionsverfahren wurde bereits durch optische Filterung⁶⁹ und durch Transformation von digital dargestellten Schwärzungsverteilungen^{70,73} realisiert; als Input diene in diesen Fällen jeweils ein Bild, das durch lichtoptische Abbildungsfehler oder durch Verwaschung entstand.

7.2. Anwendung des Rekonstruktionsverfahrens in der Elektronenmikroskopie

Gegenüber den Anwendungen in der Lichtoptik entstehen bei der Rekonstruktion von elektronenmikroskopischen Aufnahmen weit kompliziertere Verhältnisse, infolge der häufigen Nulldurchgänge der Übertragungsfunktion und ihrer mitunter starken Abweichung von der Radialsymmetrie. Deshalb ist die Durchführung mit Hilfe von lichteoptischer Filtertechnik außerordentlich erschwert. Trotzdem wurden solche Experimente an Kohlefolien-Aufnahmen bereits ausgeführt^{50,74}.

Entsprechend der in Abschn. 1.2. eingeführten übertragungstheoretischen Beschreibung der Phasenkontrastübertragung im Elektronenmikroskop interpretieren wir nun die einzelnen Größen der Ausgangsgleichung (175) folgendermaßen:

- $b(\vec{r})$ ist die Intensitätsschwankung, die durch die Superposition von Streuwellen in der Bildebene entsteht, bzw. die Schwärzungsschwankung.
- $o(\vec{r})$ ist die Projektion der Phasenverteilung des Objekts in Richtung der einfallenden Primärwelle.
- $F\{s(\vec{r})\}$ ist die Phasenkontrastübertragungsfunktion, der Imaginärteil der Pupillenfunktion.
- $n(\vec{r})$ beschreibt die durch die Elektronenstatistik und die Kornverteilung zusätzlich entstehenden Fluktuationen der meßbaren Schwärzungsverteilung.

Der additive Ansatz ist nach Abschn. 1.7. annähernd gerechtfertigt.

Die Filterfunktion (187) lautet nun

$$S'(h) = \frac{g(\vec{h})}{\sin \gamma(\vec{h})} \quad (190)$$

und das Signal/Rauschverhältnis verändert sich nach (186) um den Faktor

$$\tau = \frac{\iint_B g^2(\vec{h}) d\vec{h}}{\frac{1}{B} \iint \sin^2 \gamma(\vec{h}) d\vec{h} \iint_B \frac{g^2(\vec{h}) d\vec{h}}{\sin^2 \gamma(\vec{h})}} \quad (191)$$

Wir wollen gleich an dieser Stelle andere, einfachere Filterfunktionen gegenüberstellen, die man durch Eingriffe in die Objektivaperturebene realisieren kann. Da der Realanteil der Pupillenfunktion nicht in die Abbildung einer reinen Phasenverteilung eingeht, ist eine partielle

Ausblendung eines Bereichs B' in der Aperturebene äquivalent einer nachträglichen Filterung durch eine Filterfunktion

$$S'(\vec{h}) = \begin{cases} 0 & \vec{h} \in B', \\ 1 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (192)$$

Daß diese Äquivalenz wirklich besteht wird durch die Diffraktogramme von Aufnahmen demonstriert, die mit Hoppe'schen Zonenplatten (s.u.) in der Aperturebene entstanden: im Diffraktogramm sind die Umrisse der Zonenplatte deutlich zu erkennen⁷⁵.

Eine Phasenvorschiebung um π in einem Bereich B' , etwa mit Hilfe einer phasenschiebenden Platte, ist entsprechend äquivalent einer Filterung

$$S'(\vec{h}) = \begin{cases} -1 & \vec{h} \in B', \\ +1 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (193)$$

Die bisher diskutierten Aperturblenden entsprechen folgenden Filterfunktionen:

$$S_1'(\vec{h}) = \begin{cases} 0 & \sin \gamma > 0, \\ 1 & \sin \gamma < 0. \end{cases} \quad (\text{Hoppe'sche Zonenplatte})^4 \quad (194)$$

$$S_2'(\vec{h}) = \begin{cases} 0 & \sin \gamma < 0, \\ 1 & \sin \gamma > 0. \end{cases} \quad (\text{Komplementärplatte}) \quad (195)$$

$$S_3'(\vec{h}) = \begin{cases} -1 & \sin \gamma < 0, \\ +1 & \sin \gamma > 0. \end{cases} \quad (\text{Phasenzonenplatte}) \quad (196)$$

Die Phasenplatten werden hier aufgeführt, da sie neuerdings durch eine neue Technik realisierbar werden^{76,77}. Erste Rechnungen über die Störung durch die inelastische Streuung einer solchen Platte liegen inzwischen vor⁷⁸.

Die Auswirkungen der Zonenplatten S_1' auf das Auflösungsvermögen, die Apodisation der Bildpunkte und auf den Bildkontrast im Hellfeld und Dunkelfeld wurden bereits^{5,6,7} ausführlich theoretisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß Auflösungsvermögen und Bildkontrast deutlich verbessert werden können.

Demnach bringt bereits die Ausblendung aller Bereiche mit „falscher“ Kontrastübertragung in der Fouriertransformierten einen Gewinn, freilich nur, wenn man einen gewissen Informationsverlust in Kauf nimmt.

Ein deutlicher Unterschied zeigt sich zwischen dem Blendeneingriff und der nachträglichen Filterung des Bildes, wenn wir das Rauschen betrachten: Halten wir die Bildintensität konstant, d.h. haben wir gleiche Elektronenstatistik in beiden Fällen, so wirkt sich eine Filterung in der Aperturebene überhaupt nicht aus auf die statistischen Eigenschaften der Rauschverteilung. Das bedeutet aber, daß jetzt Ortsfrequenzbereiche existieren, die nur Rauschbeiträge zum Bild liefern.

Eine nachträgliche Filterung mit den Blendenfunktionen S_1' oder S_2' scheint demgegenüber auf den ersten Blick einen sicheren Gewinn zu bringen: jede Ausblendung führt zu

$$\frac{1}{B} \iint_B S'^2(\vec{h}) d\vec{h} < 1, \quad (197)$$

d.h. nach (181) ist $\sigma_{n'} < \sigma_n$.

Wir müssen jedoch berücksichtigen, daß wir das Signalspektrum ebenfalls beschnitten haben, so daß auch $\sigma_{b'} < \sigma_b$. Tatsächlich zeigt die Anwendung von (186), daß sich in diesem Fall das Signal/Rausch-Verhältnis ebensogut verkleinern wie vergrößern kann:

$$= \frac{\frac{1}{B} \iint_{B''} \sin^2 \gamma d\vec{h}}{\frac{1}{B} \iint_B \sin^2 \gamma dh \cdot \frac{B''}{B}} = \frac{\frac{1}{B''} \iint_{B''} \sin^2 \gamma d\vec{h}}{\frac{1}{B} \iint_B \sin^2 \gamma d\vec{h}}. \quad (198)$$

B'' deutet dabei an, daß die Integration nur über die durchlässigen Blendenbereiche zu führen ist.

τ reduziert sich also hier auf den Quotienten der Linfoot - Integrale, einmal erstreckt über die durchlässige Teilfläche B'' , das andere Mal über die gesamte Apertur.

Ob $\tau > 1$ oder $\tau < 1$, hängt ganz davon ab, wie sich der Mittelwert von $\sin^2 \gamma$ über der Teilfläche zum Mittelwert über der Apertur verhält. Daß wir durch ein geeignetes reelles Filter eine bessere Trennung von Signal und Rauschanteil erhalten können, ist schon in Abschn. 3.1. als Ergebnis der Untersuchungen von Wiener besprochen worden. Wir erhalten hier unter Umständen einen ähnlichen, wenn auch nicht optimalen⁾ Effekt, wenn wir nur Ortsfrequenzbereiche mit hohem Signalanteil (d.h. im Falle eines weißen Rauschspektrums relativ hohen Signal/Rausch-Beitrag) ausfiltern. Die Wahl der Filterfunktion bzw. Blendenfunktion richtet sich jedoch im allgemeinen nach anderen Gesichtspunkten als nach der Größe (198); bei der nachträglichen Zonenfilterung gemäß den Vorschriften (194, 195) ist deshalb $\tau > 1$ nur ein günstiger Zufall.

In Abschn. 7.4. wird sich zeigen, daß auch kontinuierliche Filterfunktionen mit der Eigenschaft $\tau > 1$ konstruiert werden können.

⁾ im Sinne des Ähnlichkeitskriteriums

7.3. Gesichtspunkte für die Wahl einer Filterfunktion

Wir wollen im Folgenden nur noch kontinuierliche Filterfunktionen behandeln.

Bisher haben wir integrale Kriterien formuliert, die es gestatten, das Signal/Rauschverhältnis zu verfolgen.

Wir müssen zusätzlich fordern, daß auch ein einzelner Beitrag $S'^2(\vec{h}) = \frac{g^2(\vec{h})}{s^2(\vec{h})}$ im Integral (181) eine gewisse Grenze nicht überschreitet, da die lokale Überhöhung des Rauschspektrums eine Scheinstruktur erzeugen könnte⁶⁹.

$$\frac{g^2(\vec{h})}{\sin^2 \gamma} \leq C. \quad (199)$$

Ein weiterer Aspekt ist der durch die Filterung erreichte „Ähnlichkeitsgewinn“ zwischen Objekt und Bild. Er läßt sich diskutieren anhand der Linfootschen Bildgüteintegrale^{56,79}, von denen bisher schon eines erwähnt wurde. Wir übernehmen die Integrale in der Notation von Röhler^{29f}:

Linfoot führte für die Bestandteile des normierten „Ähnlichkeitsintegrals“ (vgl. Abschn. 3.1.)

$$\Gamma = \frac{1}{R} \iint_{B_0} \{o(\vec{r}) - b(\vec{r})\}^2 d\vec{r}, \quad (200)$$

$$R \stackrel{\text{def}}{=} \iint_{B_0} o^2(\vec{r}) d\vec{r},$$

B_0 Integrationsfläche im Ortsraum

folgende Namen ein:

$$\Psi = \frac{1}{R} \iint_{B_0} o(\vec{r})b(\vec{r})d\vec{r} \quad \text{„Korrelationsmaß“,} \quad (201)$$

$$\Xi = \frac{1}{R} \iint_{B_0} b^2(\vec{r})d\vec{r} \quad \text{„relativer Strukturgehalt“,} \quad (202)$$

$$\Phi = 1 - \Gamma = 2\Psi - \varepsilon \quad \text{„Abbildungstreue“} \quad (203)$$

Diese Größen können auch durch Integrale über Funktionen der Ortsfrequenzebene ausgedrückt werden.

Eine weitere Vereinfachung ergibt sich durch die Annahme, das Objekt könne durch ein „weißes“ Wienerspektrum charakterisiert werden. Dies ist keine Einschränkung für die spätere Anwendung, sondern kann verstanden werden als Beschreibung einer statistischen Gesamtheit von Objektverteilungen, in der jede spezielle Realisation enthalten ist (vgl. Linfoot⁸⁰). Mit einer von O’Neill⁸¹ eingeführten Normierung ergibt sich schließlich

$$\Psi_r = \frac{\iint_B S(\vec{h}) d\vec{h}}{\iint_B S_o(\vec{h}) d\vec{h}}, \quad (204)$$

$$\varepsilon_r = \frac{\iint_B S(\vec{h})^2 d\vec{h}}{\iint_B S_o(\vec{h})^2 d\vec{h}}, \quad (205)$$

$$\Phi_r = \frac{\iint_B [2S(\vec{h}) - S(\vec{h})^2] d\vec{h}}{\iint_B [2S_o(\vec{h}) - S_o(\vec{h})^2] d\vec{h}}, \quad (206)$$

B Aperturfläche.

Dabei ist $S_o(\vec{h})$ die Übertragungsfunktion eines bis auf eine Blendenbegrenzung aberrationsfreien Systems.

Sinngemäß auf unser System übertragen, müssen wir $S_o(\vec{h}) = \begin{cases} 1 & \vec{h} \in B, \\ 0 & \vec{h} \notin B \end{cases}$ definieren. Gehen

wir auf die physikalische Bedeutung der Phasenkontrastübertragungsfunktion zurück, so ist dies gerade der (nicht realisierbare) Fall einer einheitlichen Phasenverschiebung um $\pi/2$ in der Aperturebene bei unverändertem Primärstrahl. Die Normierung der Integrale (204, 205, 206) ist damit einfach gegeben durch die Integrationsfläche B .

Die Integrale lassen sich sehr bequem berechnen für $\Delta f_A = 0$, das genügt zumindest für eine Diskussion der Abhängigkeit der Größen $\Psi_r, \varepsilon_r, \Phi_r$ von der Apertur und von der Defokussierung.

$$\Psi_r = \frac{2}{\vartheta_{Ap}^2} \int_0^{\vartheta_{Ap}} \sin \gamma(\vartheta) \vartheta d\vartheta, \quad (207)$$

$$\Xi_r = \frac{2}{\vartheta_{Ap}^2} \int_0^{\vartheta_{Ap}} \sin^2 \gamma(\vartheta) \vartheta d\vartheta, \quad (208)$$

$$\Phi_r = 2\Psi_r - \Xi_r. \quad (209)$$

Diese Größen wurden für verschiedene Defokussierungen in Abhängigkeit von der Apertur ϑ_{Ap} berechnet.

Sie werden in Abschn. 7.4. zusammen mit den entsprechenden Ausdrücken nach Anwendung einer Rekonstruktion behandelt.

Um den durch die Filterung entstandenen Gewinn zu beurteilen, müssen nun die entsprechenden Ausdrücke (204, 205, 206) für die effektive Übertragungsfunktion des Systems (Abbildung + Rekonstruktion) gebildet werden, die hier zum Vergleich auch rotations-symmetrisch angenommen wird:

$$\Psi_r = \frac{2}{\vartheta_{Ap}^2} \int_0^{\vartheta_{Ap}} g(\vartheta) \vartheta d\vartheta, \quad (210)$$

$$\Xi_r = \frac{2}{\vartheta_{Ap}^2} \int_0^{\vartheta_{Ap}} g^2(\vartheta) \vartheta d\vartheta, \quad (211)$$

$$\Phi_r = 2\Psi_r - \Xi_r. \quad (212)$$

Eine andere Möglichkeit für die Beurteilung der Filtereigenschaften bietet die Betrachtung des Bildpunkts. Wir können zum Beispiel ausgehen von einem einzelnen „gaußförmigen“ Phasenobjekt und die Gestalt seines Bildes nach der fehlerhaften Abbildung und nach der Rekonstruktion miteinander vergleichen.

Dieses Vorgehen ist jedoch unzweckmäßig, da sich die einzelnen Bildpunkte in sehr unübersichtlicher Weise im Bild superponieren. Wir können deshalb vom Verhalten des einzelnen Bildpunkts keine allgemeinen Schlüsse ziehen auf die Wiedergabe einer ganzen Objektverteilung (vgl. ⁸²).

7.4. Der Auflösungsgewinn im Scherzer-Gebiet

Wie Scherzer¹² zeigte, kann man die Phasenkontrastübertragung durch die Wahl von Δf „optimalisieren“. Ist die Beziehung $\Delta f = \sqrt{2C_0\lambda}$ erfüllt, so existiert innerhalb der Apertur $\vartheta_{Ap} = \left(\frac{8\lambda}{C_0}\right)^{1/4}$ ein größerer Bereich einheitlicher Kontrastübertragung. Um abzuschätzen, welchen Gewinn das Rekonstruktionsverfahren gegenüber einer direkten Bildinterpretation haben kann, sollten wir von diesen günstigsten experimentellen Bedingungen ausgehen. Die Übertragungsfunktion ist in Abb. 24a für $C_0 = 3,9$ mm dargestellt. Die Zone mit einheitlichem Phasenkontrast endet bei $\vartheta = 9,3 \cdot 10^{-3}$ entsprechend einer Auflösung von 4 \AA .

Infolge der langsamen Anfangssteigung der Übertragungsfunktion in Abb. 24a trägt ein Bereich kleiner Ortsfrequenzen nur ungenügend zur Bildentstehung bei. Außerdem fehlt ein mittlerer Übertragungsbereich um $\vartheta = 7,5 \cdot 10^{-3}$. Die Anwendung eines Rekonstruktionsverfahrens kann diese Verfälschung wieder rückgängig machen; für die Erhöhung der Auflösung ist sie jedoch von geringerer Bedeutung. Dagegen interessiert die Größe des übertragenen Ortsfrequenzbereichs, der außerhalb des Scherzerschen Gebiets liegt. Wir können offenbar die Beiträge dieses Bereichs durch geeignete Phasenumkehr und Gewichtung für eine Erhöhung der Auflösung ausnutzen.

Nach Abschn. 5.7. ließ sich bei dem jetzigen Betriebszustand des Elektronenmikroskops eine Übertragungsgrenze nachweisen, die einer Auflösung von $3,6 \text{ \AA}$ entspricht.

Setzen wir also voraus, daß die genaue Einstellung des Scherzer-Gebiets apparativ möglich ist, so ergibt sich durch die Rekonstruktion eine Auflösungsverbesserung von 4 \AA auf $3,6 \text{ \AA}$. In der Praxis ist eine so genaue Einstellung eines Defokus-Werts und eine vollständige Korrektur des Astigmatismus nicht möglich, deshalb ist die experimentell erreichbare Auflösung grundsätzlich schlechter als die theoretisch erreichbare.

Bei Geräten hoher Stabilität mit geringen sekundären Fehlern³¹ sollte der gesamte Übertragungsbereich und damit auch der durch Rekonstruktionsverfahren erzielbare Auflösungsgewinn noch größer sein. Einen entsprechenden nachträglichen Gewinn können wir erwarten, wenn das Scherzer-Gebiet durch eine bessere Korrektur des Öffnungsfehlers weiter ausgedehnt werden kann³.

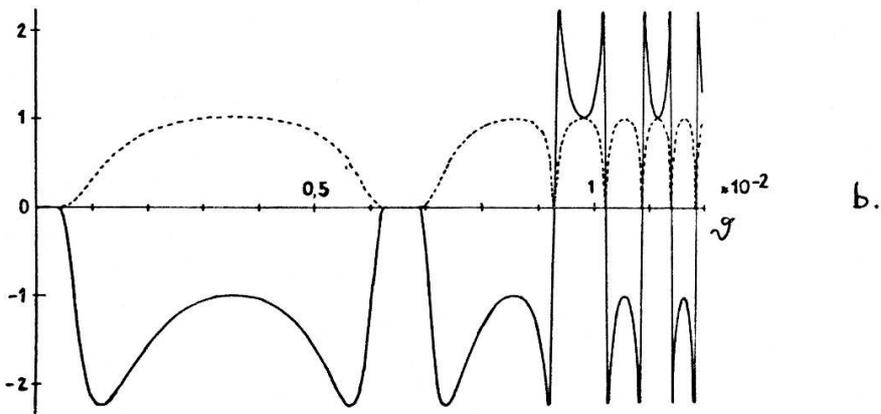
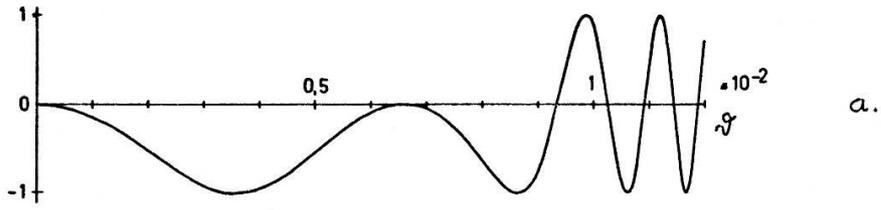


Abbildung 24: Scherzer-Fokus $\Delta f = 1\,700 \text{ \AA}$ für $C_0 = 3,9 \text{ mm}$; $U = 100 \text{ kV}$.
 a) Übertragungsfunktion
 b) Filterfunktion (ausgezogen) und Gewichtsfunktion (gestrichelt)

7.5. Eigenschaften des verwendeten Filters

Als Gewichtsfunktion wurde die Funktion

$$g(\vec{h}) = \exp \left[a \left\{ 1 - \frac{1}{|\sin \gamma(\vec{h})|^N} \right\} \right] \quad (213)$$

benutzt und damit die Filterfunktion $S'(\vec{h}) = \frac{g(\vec{h})}{\sin \gamma}$.

Die Filterfunktion besitzt folgende Eigenschaften (s. Abb. 24b, für den Scherzer-Fokus $\Delta f = 1700 \text{ \AA}$).

1. $S'(\vec{h}) = 0$ für $\sin \gamma(\vec{h}) = 0$
2. $S'(\vec{h}) = 1$ für $\sin \gamma(\vec{h}) = 1$
3. An den Unstetigkeitsstellen von $1/\sin \gamma$ sorgt die Gewichtsfunktion dafür, daß die Filterfunktion nur bis zu den Werten $\pm \frac{\exp[a - \frac{1}{N}]}{N/aN}$ ansteigt bzw. abfällt. (214)

Diese Extrema liegen an den Stellen $|\sin \gamma| = \sqrt[N]{aN}$ (215)

Mit Hilfe von a und N können wir somit die lokale Rauscherhöhung kontrollieren. Wegen (214) gilt

$$S'^2(\vec{h}) \leq \frac{\exp \left[2 \left(a - \frac{1}{N} \right) \right]}{N a^2 N^2} = C \quad (216)$$

(vgl. (199))

4. Für $N > 1$ entstehen um die Nullstellen herum kleine „undurchlässige“ Bereiche $S'(\vec{h}) \approx 0$, deren Ausdehnung mit wachsendem N zunimmt. Damit hat man die Möglichkeit, die Unsicherheit in der Bestimmung der Nullstellen zu berücksichtigen. Auf die Methode der Nullstellenbestimmung kommen wir im nächsten Abschnitt zu sprechen. Man kann N zwischen 1 und 2 im Aperturgebiet linear wachsen lassen und so der Tatsache Rechnung tragen, daß die Nullstellen um zentralen Bereich am besten bekannt sind.

Zunächst sollen die Rauschübertragungseigenschaften anhand der in Abschnitt 7.2. eingeführten Kriterien untersucht werden.

Die zuletzt betrachtete Konstante N wurde für die folgenden Rechnungen = 1 gewählt.

Welcher Wert des Filterparameters a geeignet ist, ergibt sich aus dem Verlauf des Signal/Rausch-Verstärkungsfaktors τ .

Er wurde für $\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$ und drei verschiedene Werte dieses Parameters berechnet (Abb. 25).

Es stellt sich heraus, daß τ je nach Wahl von a größer oder kleiner als 1 ausfallen kann. D.h. es ist durchaus möglich, das Signal/Rauschverhältnis bei der Filterung noch zu verbessern. Freilich verringert sich gleichzeitig mit wachsendem a der Gewinn in der Bildähnlichkeit, vgl. unten die Erörterung der Linfoot-Kriterien.

Wie $\tau > 1$ zustande kommt, zeigt sich bei der Berechnung der beiden einzelnen Verstärkungsfaktoren V_s und V_n (Abb. 26 a,b) für die Defokussierungswerte $\Delta f = 1\,700 \text{ \AA}$, $\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$ und für $a = 0,2$. Die Rauschverstärkung wird jeweils von einer noch größeren Signalverstärkung übertroffen.

τ ist im üblichen Aperturbereich für beide Defokussierungen praktisch konstant. Die später beschriebenen Rekonstruktionen wurden mit $a = 0,2$ ausgeführt; d.h. das Signal/Rauschverhältnis müßte ungefähr gleich bleiben.

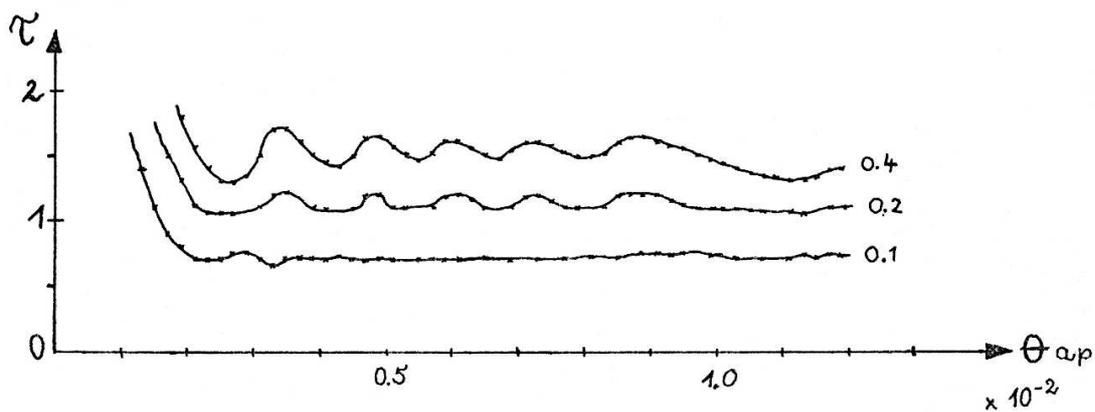


Abbildung 25: Verstärkung des Signal/Rauschverhältnisses, τ in Abhängigkeit vom Aperturwinkel für verschiedene Parameter a .

Für die Anwendung der theoretischen Ergebnisse auf eine konkrete Auswertung müssen noch folgende Punkte beachtet werden:

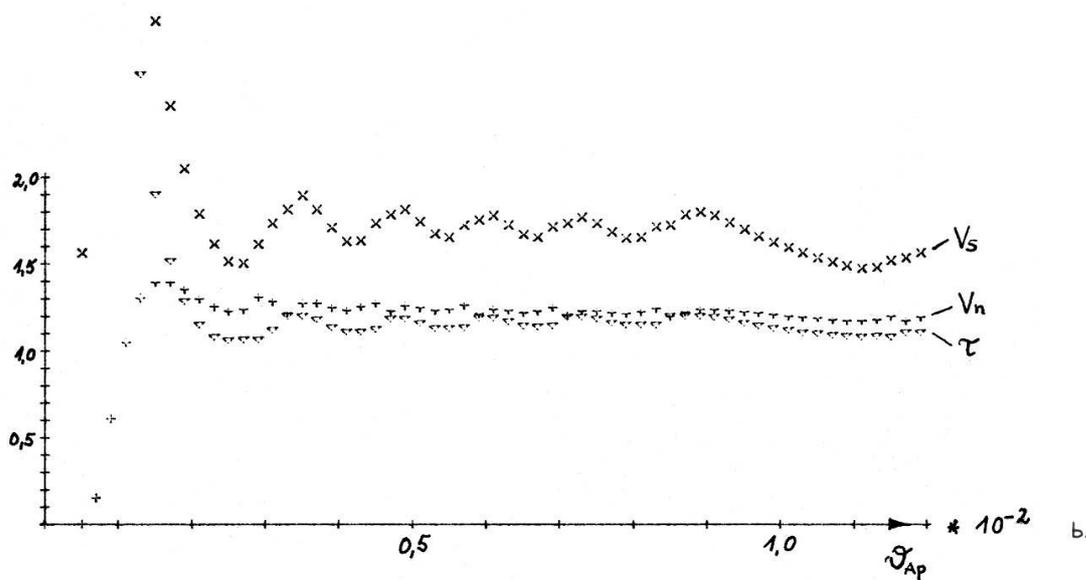
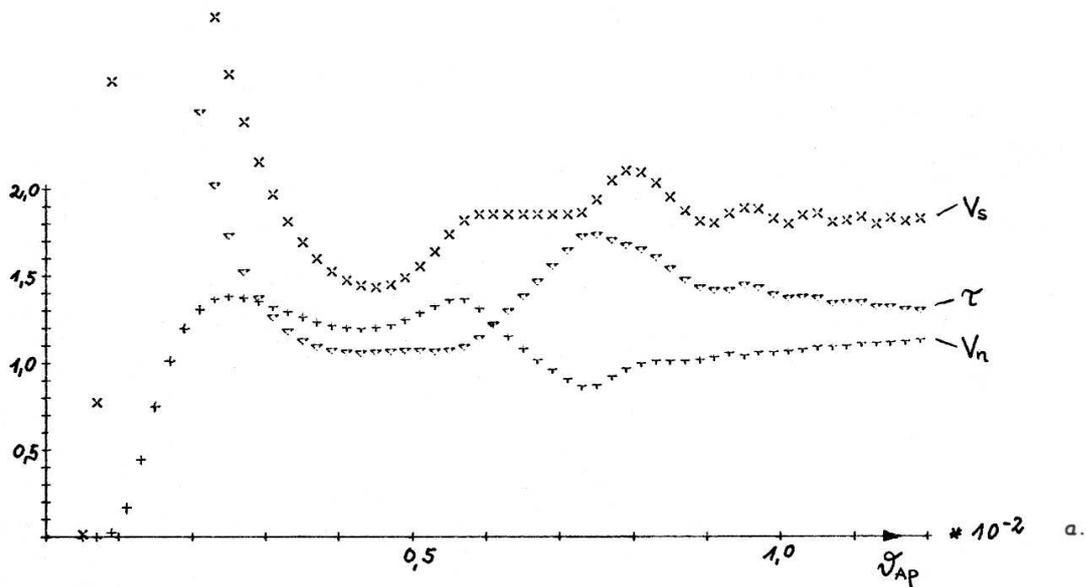


Abbildung 26: Rauschverstärkung V_n , Signalverstärkung V_s und Verstärkung des Signal/Rausch-Verhältnisses τ in Abhängigkeit vom Aperturwinkel für $a = 0,2$:
 a) $\Delta f = 1\,700 \text{ \AA}$
 b) $\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$

a) Die Möglichkeit, $\tau > 1$ zu erzielen, darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß es - je nach Defokussierung - Stellen im Ortsfrequenzbereich geben kann, an denen das Rauschspektrum stärker angehoben wird als das Signalspektrum.

b) Es wurde in der ganzen Diskussion angenommen, daß die Übertragungsfunktion und damit ihre Nullstellen exakt bekannt sind. Die Unsicherheit in der Kenntnis der Nullstellenlage kann im einzelnen Fall zu starken Abweichungen von den theoretischen Ergebnissen führen. Eine pauschale Berücksichtigung dieser Unbestimmtheit kann, wie schon erwähnt, durch einen Wert $N > 1$ erzielt werden.

Im nächsten Abschnitt wird zwar ein Weg angegeben, der zur Bestimmung der Übertragungsfunktion führt. Da diese Auswertung aber nach einem verwickelten Least-Square-Programm abläuft, ist eine systematische Fehlerabschätzung für die Nullstellenlage der Übertragungsfunktion ausgeschlossen.

Die Linfootschen Ausdrücke (210, 211, 212) wurden für die Gewichtsfunktion bei zwei verschiedenen Defokussierungen ($\Delta f = 1\,700\text{ \AA}$, $\Delta f = 4\,000\text{ \AA}$) berechnet und können nun verglichen werden mit denen der nicht korrigierten Übertragungsfunktion (Abb. 27, 28). Da positiver und negativer Kontrast für die Beurteilung der Abbildungstreue nicht unterschieden werden soll, wurde abweichend von der Definition (212) $\phi_r = 2|\psi_r| - \varepsilon$ gesetzt. Alle drei Kriterien zeigen, daß die neue resultierende Übertragungsfunktion Eigenschaften besitzt, die einer idealen Übertragung wesentlich näher kommen. Am deutlichsten zeigt sich das anhand der Korrelationsqualität ψ_r , die nun keinen negativen Wert mehr annimmt. Eine der wichtigsten Leistungen der Filterung besteht ja gerade in der Phasenumkehr „falscher“ Kontrastbereiche.

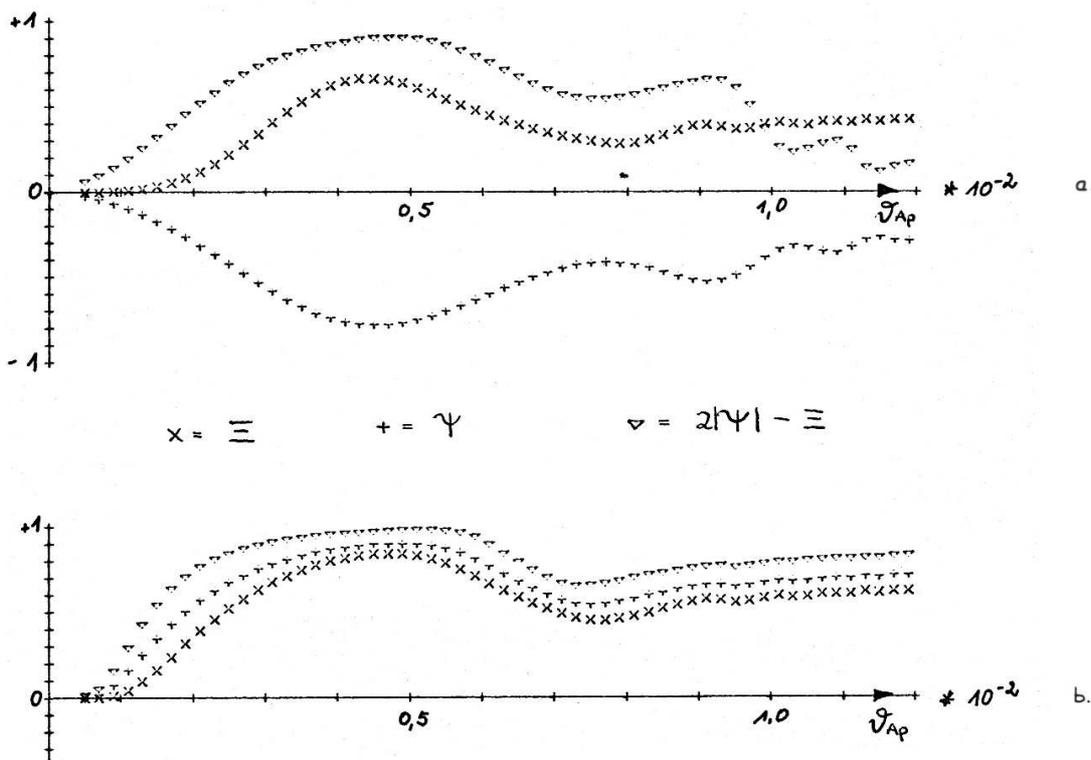


Abbildung 27: Linfootsche Bildgütekriterien vor (a) und nach (b) der Rekonstruktion; $\Delta f = 1\,700\text{ \AA}$.

Im ersten Beispiel (Abb. 27) wurde der für die grundsätzliche Diskussion (vgl. Abschn. 7.4.) wichtige Scherzer-Fokus angenommen.

Die Funktionen haben vor und nach der Rekonstruktion einen sehr ähnlichen Verlauf, abgesehen von der Vorzeichenumkehr der Korrelationsqualität. Im Gebiet $\vartheta_{Ap} < 4 \cdot 10^{-3}$ ist eine Verbesserung bemerkbar. Wie nach dem Verlauf der Übertragungsfunktion (s. Abb. 24) zu erwarten, wird der Gewinn der Rekonstruktion vor allem im Ortsfrequenzbereich $\vartheta > 9 \cdot 10^{-3}$ sichtbar.

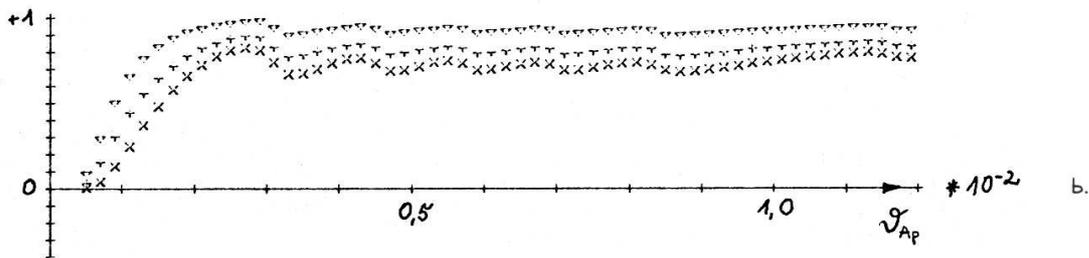
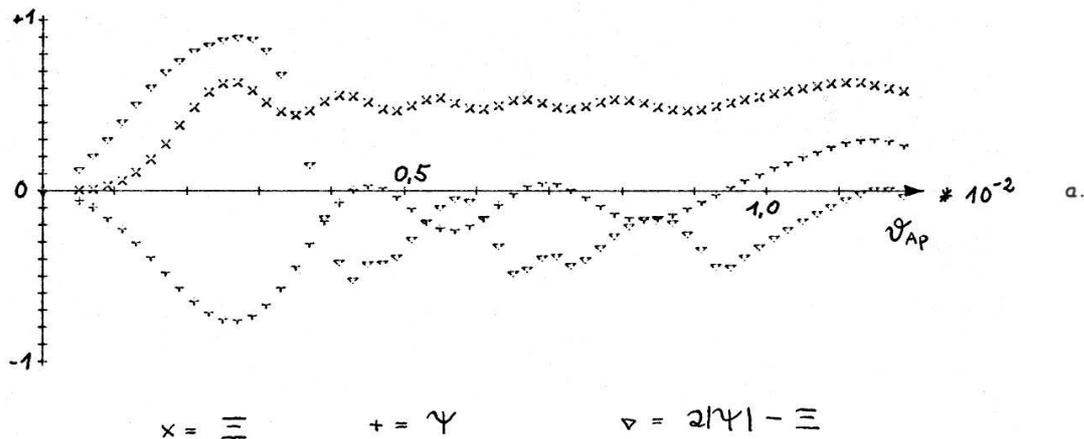


Abbildung 28: Linfoot'sche Bildgütekriterien vor (a) und nach (b) der Rekonstruktion; $\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$.

Während Korrelationsqualität und Abbildungstreue beim ursprünglichen Bild von dieser Grenze an stark abnehmen, bleiben sie beim rekonstruierten praktisch konstant. Dagegen ändert sich der Strukturgehalt wie beim nächsten Beispiel nicht wesentlich.

Im zweiten Beispiel wurde der ungünstige Fall $\Delta f = 4\,000 \text{ \AA}$ angenommen (Abb. 28). Korrelationsqualität und Abbildungstreue schwanken zunächst stark bei einer Änderung der Apertur und haben nur bei sehr engen Aperturen von $2,5 \cdot 10^{-3}$ einen hohen Wert. Nach der Rekonstruktion sind diese Funktionen praktisch konstant bei der Öffnung der Apertur und haben Werte nahe 1.

Der Vergleich mit der Rechnung im Scherzer-Gebiet zeigt, daß sich im üblichen Aperturbereich ($\vartheta_{Ap} = 1,0 \cdot 10^{-2}$) kein Unterschied in der Beurteilung der resultierenden Bilder ergibt. Nur bei Verwendung von $\vartheta_{Ap} = 0,75 \cdot 10^{-2}$ ist es günstiger, vom stärker defokussierten Bild auszugehen.

7.6. Bestimmung der Übertragungsfunktion

Die Bestimmung von $\sin \gamma$ für die auszuwertende Aufnahme ist die wichtigste Voraussetzung für eine Durchführung des Rekonstruktionsverfahrens. Da mit der Phasenkontrastübertragungsfunktion auch die Pupillenfunktion selbst bekannt ist, hat ein Verfahren zur genauen Ermittlung von $\sin(\gamma)$ eine grundsätzliche Bedeutung für alle Rekonstruktionsverfahren, die neben der Phasen- auch die Amplitudenstruktur des Objekts bestimmen^{49,51,83}.

Der prinzipielle Weg ist durch die Experimente von Thon¹⁹ schon vorgezeichnet. Die Intensität im Diffraktogramm der Aufnahme eines amorphen Phasenobjekts ist proportional $\sin^2 \gamma$ (s. Abschn. 1.4.), und aus der Lage der Maxima und Minima kann diese Funktion bzw. die elektronenoptischen Parameter bestimmt werden.

Da wir den Bildausschnitt digital repräsentiert vorliegen haben, liegt es nahe, die Fouriertransformierte einer Kohlefolienaufnahme direkt auszuwerten.

Abb. 29 zeigt, daß $|B(\vec{h})|$ bzw. $|B(\vec{h})|^2$ dasselbe Aussehen zeigt wie ein Diffraktogramm des abgetasteten Bereichs. Wir gehen nun einen Schritt weiter und versuchen, den Verlauf im ganzen mit der Funktion $\sin \gamma$ anzupassen. Ein entsprechendes Programm zur Anpassung der Parameter mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate wurde von Bußler in unserem Institut entwickelt. Das Verfahren wird im Folgenden kurz skizziert.

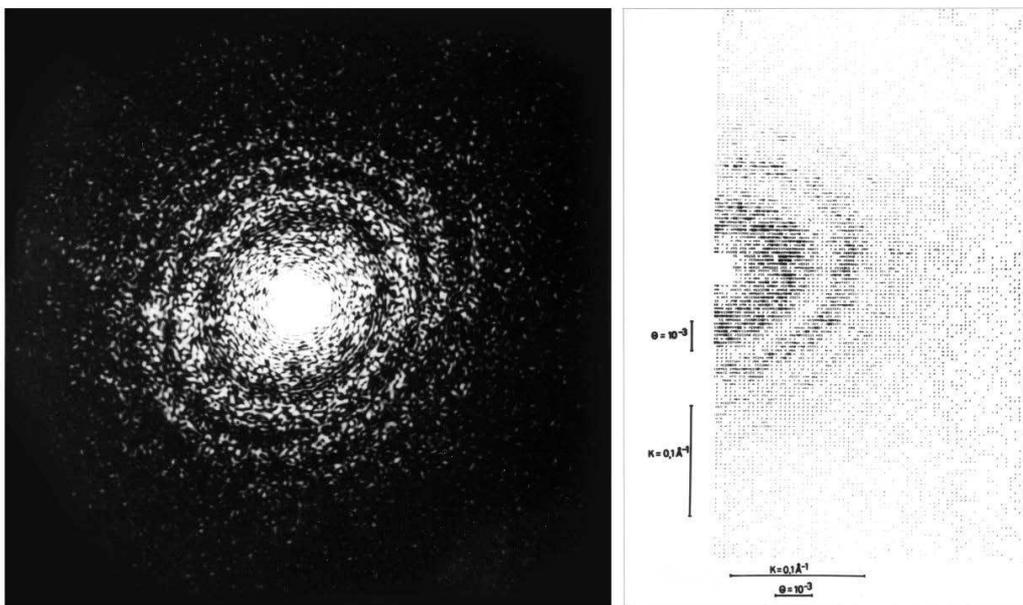


Abbildung 29

Die Fehlersumme

$$\Delta = \frac{1}{2} \sum_i^M [v(\vartheta_i) |\sin \gamma(\vartheta_i, \varphi_i; \lambda, C_0, V_{elopt}; \Delta f, \Delta f_A, \varphi_o)| - |B(\vartheta_i, \varphi_i)|]^2 \quad (217)$$

über M Beiträge aus einem zentralen Bereich des Ortsfrequenzspektrums wird minimalisiert durch

$$d\Delta = 0. \quad (218)$$

$v(\vartheta)$ beschreibt dabei zusätzlich die Normierung und eine radiale Abhängigkeit. Es hat sich herausgestellt, daß der Ansatz $v(\vartheta) = \frac{A}{\vartheta}$ mit einer zu bestimmenden Konstanten A die besten Ergebnisse liefert. Das ist genau im Einklang mit der Intensitätsausmessung im lichtoptischen Diffraktogramm von Kohlefolienaufnahmen durch Reimer et al.⁸⁴, die einen radialen Abfall mit $\frac{1}{\vartheta^2}$ festgestellt haben.

Die Gleichung (218) führt folgende Bestimmungsgleichung für die einzelnen Parameter $p_n (= \Delta f, \Delta f_A, \varphi_o)$:

$$\sum_i^M \frac{A}{\vartheta} \frac{\partial |\sin \gamma|}{\partial p_n} [] = 0; \quad n = 1, 2, 3; \quad (219)$$

$$\sum_i^M |\sin \gamma| \frac{1}{\vartheta^2} [] = 0. \quad (220)$$

[] soll den Klammerausdruck in (217) symbolisieren. In den Gleichungen (219) kommen die Parameter nicht-linear vor, deshalb müssen die Nullstellen jeweils nach dem Newtonschen Näherungsverfahren bestimmt werden. Dagegen ist Gleichung (220) für A sofort mit Matrizenmethoden lösbar.

Das Verfahren geht von Startwerten aus und berechnet die Parameter iterativ. Jede Iteration besteht in der Lösung der Gleichungen (219, 220) und liefert einen neuen Parameteransatz.

Es hat sich als nützlich erwiesen, die Verteilung vor der Durchführung der Least-Square-Methode zu glätten:

$$|B_i| = F\{T(\vec{r})F^{-1}\{|B_i|\}\} \quad (221)$$

mit einer „Abschneidefunktion“

$$T(\vec{r}) = \begin{cases} 1 & |\vec{r}| \leq c, \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases}$$

Die auf diese Weise bestimmten Werte $(\Delta f, \Delta f_A, \varphi_o)$ sind in weiten Grenzen unabhängig von den vorgegebenen Startwerten. Der Defokuswert liegt stets in dem Bereich, der von der Linseinstellung her erwartet wird.

Die Tatsache, daß sich die berechneten Parameterwerte nur wenig ändern bei Variation der Startwerte, bedeutet noch nicht, daß wir damit tatsächlich die genauen, elektronenoptisch definierten Werte $(\Delta f, \Delta f_A, \varphi_o)$ gefunden haben. Eine Vielzahl von systematischen Fehlern sind denkbar, die eine solche Festlegung ausschließen, u.a. die Liste der Voraussetzungen für die lineare reine Phasenkontrastübertragung (s. Abschn. 1.1.). Außerdem wurden die Parameter λ , C_{δ} und V_{elopt} als vorgegeben betrachtet, da ihre gleichzeitige Bestimmung auf einige Schwierigkeiten führt. C_{δ} und V_{elopt} sind aber bekanntlich mit den heutigen Methoden nur bis auf ca. 5% festlegbar.

Andererseits liefert aber das Least-Square-Verfahren eine bestmögliche Darstellung für den Verlauf der Funktion $\sin \gamma$, der hier allein interessiert und für die Berechnung der Filterfunktion benötigt wird. Da die interessierenden elektronenmikroskopischen Objekte in der Regel auf Trägerfolie aufgebracht sind, die einen amorphen Aufbau haben, ist auf dem photometrierten Bildausschnitt stets ein Teilbereich vorhanden, der sich für die Bestimmung der Übertragungsfunktion eignet.

Ein gewisser Test des Verfahrens ist der Vergleich der Ergebnisse für zwei Aufnahmen derselben Defokussierung (Abschn. 8.2.2.):

Δf und Δf_A unterscheiden sich nur jeweils um 50 Å.

7.7. Beschreibung des Rechenprogramms

Zur Durchführung des beschriebenen Bildrekonstruktionsverfahrens wurde ein FORTRAN - Programmsystem entwickelt. Ein Blockdiagramm zeigt schematisch den Aufbau (Abb. 30). Das von Bußler entwickelte Programmsystem zur Bestimmung der Phasenkontrastübertragungsfunktion EMLSQ wurde miteingezeichnet.

In FOUR wird zunächst die Fouriertransformierte der Schwärzungswerte berechnet.

Der Betrag der Koeffizienten in einem zentralen Ortsfrequenzbereich ($\vartheta \leq 4 \cdot 10^{-3}$) wird von EMLSQ zur Bestimmung der Parameter $(\Delta f, \Delta f_A, \varphi_o)$ benutzt. Enthält das Objekt periodische Anteile, so können die Reflexe u. U. bei der Kleinste-Quadrate - Methode stören. In diesem Fall müßte (gemäß einer Eingabe-Option oder automatisch) vor der Fouriertransformation eine Abtrennung des Objekts von der amorphen Umgebung stattfinden.

Als Ausgangswert für die Defokussierung genügt die Kenntnis der Feinrastereinstellung relativ zum Gauß'schen Fokus, für den Astigmatismus und den Bezugswinkel reicht eine grobe Schätzung aus. Außerdem müssen die Festwerte λ, V_{elopt}, C_0 angegeben werden.

FILT berechnet die Filterfunktion $S'(\vec{h}) = \frac{g(\vec{h})}{\sin \gamma}$ gemäß (213) und (rück-)modifiziert die Fourierkoeffizienten nach

$$B'(\vec{h}) = B(\vec{h}) \cdot S'(\vec{h}). \quad (222)$$

Statt der Gewichtsfunktion (213) können auch wahlweise die Zonenblenden - bzw. Phasenblendenfunktionen (194 - 196) berechnet werden. Anschließend wird (222) rücktransformiert

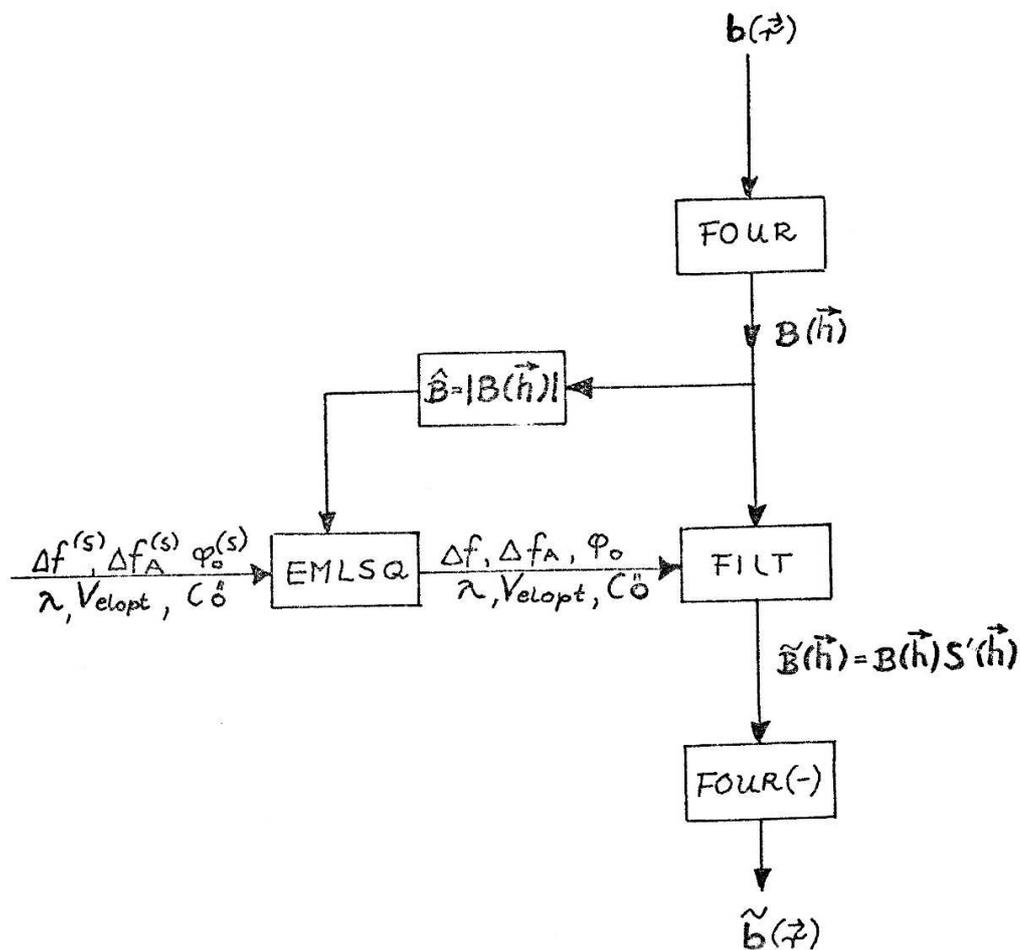


Abbildung 30: Blockschema des Programmsystems für die Rekonstruktion.

durch FOUR (-). Die Routinen zur Darstellung der Ausgangs-Verteilung und des rekonstruier-

ten Bildes wurden bereits in Abschn. 2.5. beschrieben. Für einen Vergleich der Schwärzungsausdrücke durch WRSYMB ist es notwendig, eines der beiden Bilder mit umgekehrtem Kontrast auszudrucken. Der allgemeine visuelle Eindruck des Bildes wird nämlich bestimmt durch einen Bereich niedriger Ortsfrequenzen, die im Unterfokus ($\Delta f > 0$) mit negativem Kontrast übertragen werden.

Kapitel 8

Ergebnisse

Sämtliche Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Elektronenmikroskops vom Typ Siemens Elmiskop IA angefertigt. Es wurde eine Objektraumkühlung nach Heide⁴⁷ benutzt, als Kühlmittel diente flüssiger Stickstoff. Das Vakuum betrug etwa $5 \cdot 10^{-6}$ Torr.

Bei der Rekonstruktion wurden als Parameter der Filterfunktion (213, 214) die Werte $a = 0,2; N = 1$ benutzt. Nach (216) ist damit die lokale quadratische Rauschverstärkung auf $\exp[2(0,2 - 1)] / 0,04 = 5$ begrenzt. Das Signal/Rauschverhältnis wird nach Abschn. 7.4. durch die Filterung kaum geändert ($\tau \approx 1,1$), die Varianz der Signalverteilung wird etwa verstärkt um 1,6; die der Rauschverteilung um 1,2.

Für den Öffnungsfehler wurde der Wert $C_0 = 3,9$ mm angenommen.

8.1. Rekonstruktion

8.1.1. Murein-Sacculus von *Spirillum serpens* (Daten s. Tab. 2)

Es handelt sich um ein Präparat der Stützmembran eines gramnegativen Bakteriums, die nach chemischen Untersuchungen aus Polysaccharidketten mit einer Quervernetzung durch Polypeptidketten aufgebaut ist. Die Membran liegt frei über ein Kohlefolieloch gespannt und hat eine Dicke von etwa 20 Å. Über die selektive Kontrastierung des Präparats mit einem Quecksilberderivat und erste Auswertungen der hier untersuchten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde bereits berichtet^{85,86}.

Nur auf dieser Aufnahme innerhalb der Defokus-Serie ist eine Periodizität schwach zu erkennen (Perioden ≈ 9 Å, bzw. ≈ 12 Å); im Lichtdiffraktometer erhält man nur bei Verwendung einer Bereichsblende von umgerechnet 60 Å die zugehörigen Reflexe. Orientierung und gegenseitige Lage dieser Reflexe schwanken je nach Position der Blende; diese Beobachtung läßt auf einen netzartigen Aufbau mit gegenseitiger Verscherung angrenzender Bereiche schließen.

Tabelle 2: Daten der Aufnahme von Murein-Sacculus

Strahlspannung	80 kV
Strahlstrom	2-4 μ A
Vakuum	10^{-5} Torr
V_{elopt}	80 000
Kondensorapertur	200 μ m = $8 \cdot 10^{-4}$ rad
Objektivapertur	50 μ m = $9,6 \cdot 10^{-3}$ rad
Belichtungszeit	3 sec
Fotomaterial	Agfa GEVAERT Scie. 23 D 56
Entw. Zeit	6 min

Parameter (aus den Nachbaraufnahmen der Defokussierungs-Serie bestimmt):

Δf	1 200 Å
Δf_A	800 Å
φ_0	60°

Wegen der Vorläufigkeit dieser Ergebnisse soll auf die Frage nach der flächenhaften Struktur nicht eingegangen werden, erst die Auswertung mehrerer Aufnahmen einer Defokus-Serie könnte hier weiterführen. Nach Erickson⁸⁷ lassen sich aus den Phasen der Reflexe in der Fouriertransformierten verschieden defokussierter Aufnahmen die „wahren“ Reflexe errechnen; die Anwendung dieser Methode im Höchstauflösungsgebiet steht bisher noch aus und könnte vielleicht bei diesem Problem erfolgreich sein. Die große Kondensoraperturblende (200 µm) beeinträchtigt die Kohärenz in diesem Fall nicht, da die Defokussierung im Scherzer-Gebiet liegt.

Da der Bildkontrast zu einem Teil zumindest durch die Hg-Atome hervorgerufen wird, ist die Aufnahme nicht besonders gut für eine reine Phasenkontrast-Rekonstruktion geeignet. Sie wurde trotzdem als eines der ersten Beispiele zur Demonstration verwendet.

Eine 4-fach vergrößerte Kopie der Aufnahme wurde photometriert (Abb. 2 Anh.). Für die Rekonstruktion wurde ein Bereich von 40 x 40 Å ausgewählt.

Abb. 31 zeigt eine Gegenüberstellung des Diffraktogramms der Aufnahmen mit einer aus den elektronenoptischen Parametern errechneten CONTUR - Darstellung. Danach hat die Übertragungsfunktion ein günstiges Plateau in der einen Richtung ($\Delta f \approx 1\ 600$ Å, Scherzer-Gebiet), senkrecht zu diesem Azimut hingegen erzeugt sie eine schlechte Auflösung infolge der früh (d.h. bei kleinem ϑ) einsetzenden Oszillationen.

In Abb. 32 sind je zwei Schnitte durch die ursprüngliche Übertragungsfunktion und die nach Rekonstruktion resultierende Übertragungsfunktion gegenübergestellt; Schnittrichtung sind die oben betrachteten Azimute.

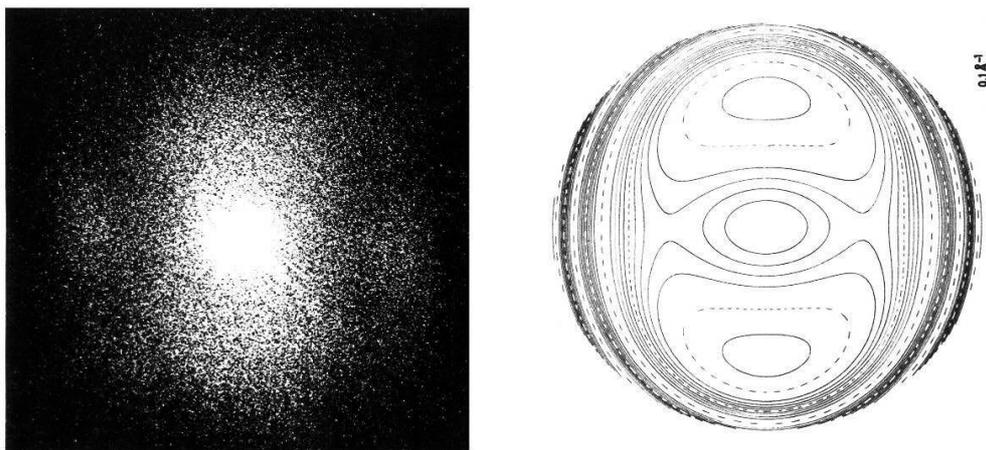


Abbildung 31: a) Diffraktogramm der Aufnahme des Murein-Sacculus. Blende Ø 10 mm
b) CONTUR-Darstellung der Funktion $\sin \gamma$

Infolge der geringen elektronenoptischen Vergrößerung ist das Übertragungsgebiet gegenüber den von Höchstauflosungsaufnahmen reduziert, und man kann - abgesehen von der Aufhebung der erwähnten Auflösungs - Anisotropie - keine Verbesserung der Auflösung erwarten.

Abb. 3 a-c Anh. stellt die ursprüngliche und zwei errechnete Schwärzungsverteilungen gegenüber (Filterfunktion mit $a = 0,2$ und $a = 0,1$). Zum besseren visuellen Vergleich wurden die berechneten Verteilungen mit umgekehrtem Kontrast ausgedruckt.

Der Ausdruck erfolgte in diesem Fall ohne Reduzierung der Auflösung. Im Bild weist ein Pfeil auf den Winkelbereich, in dem eine phasenrichtige Übertragung durch die Rekonstruktion erzielt wird. Bei der Rekonstruktion mit $a = 0,1$ wird das Signal/Rauschverhältnis nach Abschn. 7.4. verkleinert um ca. 20%; und die starke Rauschüberhöhung in der Nähe der Nullstellen (Faktor 16,5) sollte Scheinstrukturen hervorrufen. Man erkennt eine starke Hervorhebung der hohen Ortsfrequenzen in Abb. 3c, Anh.

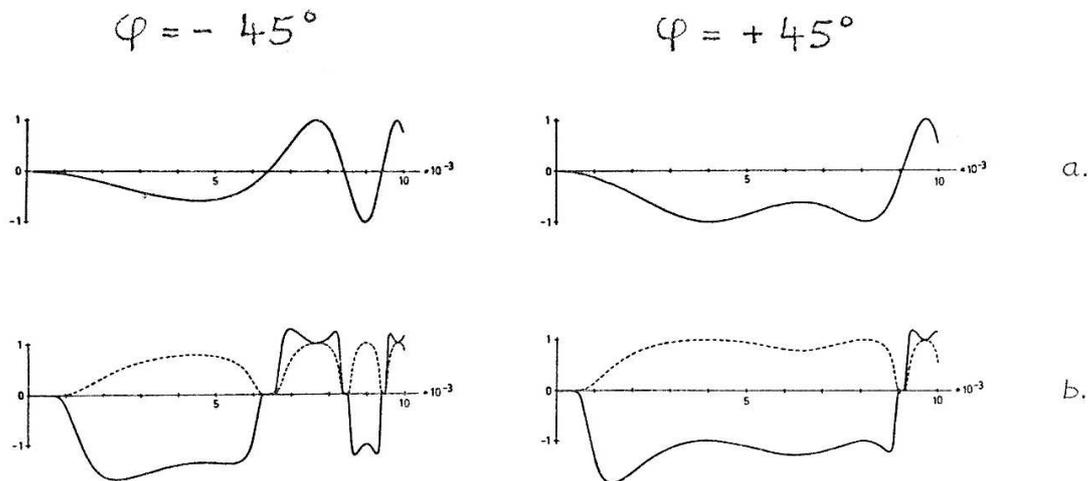


Abbildung 32: Schnitte durch Filter-, Gewichts- und Übertragungsfunktion in den Azimuten $\pm 45^\circ$.
a) Übertragungsfunktion
b) ausgezogen: Filterfunktion $\left[a = 0,2; N = N(\vartheta) = 1 + \frac{\vartheta}{10^{-2}} \right]$
gestrichelt: Gewichtsfunktion

8.2. Bilddifferenzanalyse und Rekonstruktion des Differenzbilds

In Anbetracht der großen Schwierigkeiten, die eine nachfolgende Präparation außerhalb des Mikroskops zusätzlich bereitet - es sei an die in Abschn. 3.3. aufgezählten Punkte erinnert -, werden für einen ersten Test des Verfahrens Aufnahmen von amorphen Kohlefolien und Graphitfolien ausgewertet, die unmittelbar nacheinander entstanden. Die Aufnahmezeit betrug bei dem üblichen Primärstrahlstrom ($5 \dots 10 \mu\text{A}$) und der Schwärzung $d = 1$ etwa 3 sec, der kleinste zeitliche Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Aufnahmen etwa 10 sec. Die in dieser Zeit eingetretenen Veränderungen wurden ausschließlich durch die Restkontamination

und durch Strahlenschäden verursacht. Es wurde jeweils ein Quadrat von 5,2 mm Seitenlänge photometriert, entsprechend einer Objektfläche von 290 x 290 Å.

Da die Aufnahmen nur bei hoher Niveauliniendichte auf der CONTUR - Darstellung identifiziert und untereinander verglichen werden können, wurde jeweils nur ein Teilbereich von 72 x 72 Å bei 3 Å Auflösung ausgezeichnet¹⁾.

Zur Auffindung des Korrelationspeaks wurde dagegen ein Bereich von 144 x 144 Å benutzt. Dieser Gesamtbereich wurde auch als Schwärzungsdarstellung ausgedruckt.

Zur Identifizierung der relativen Extrema der Schwärzungsverteilung dienen Symbollisten, in denen Maxima und Minima ihrer absoluten Größe nach geordnet sind. Weiter sind die Koordinaten in Å angegeben, bezogen auf den linken unteren Eckpunkt der CONTUR -Darstellung. Zur besseren Übersicht wurden nur je 50 höchste relative Maxima bzw. kleinste relative Minima registriert.

Die Zuordnung der Symbole erfolgt für die Maxima in der Reihenfolge A0, A1,... B0, B1 ... E9 nach absteigender Größe, für die Minima in der Reihenfolge V0, V1,...W0, W1 ... Z9 nach ansteigender Größe. Da das Differenzbild in den bisherigen Rechnungen aus $d_1 - d_2$ errechnet wurde, erscheinen z.B. neu im Bild 2 auftauchende Maxima im Differenzbild als Minima.

In der CONTUR - Darstellung des ersten Bildes wird die relative Lage des zweiten Bilds durch einen Rahmen angedeutet.

Der angegebene Verschiebungsvektor gibt die Position des „Nullpunkts“ (linke untere Ecke) des ersten Bilds in Bezug auf den Nullpunkt des zweiten an. Um diesen Vektor ist der Korrelationspeak gegen den Nullpunkt der KKF verschoben, der sich in der Mitte der KKF - CONTUR - Darstellung befindet. Von den Korrelationsfunktionen wird nur jeweils der innere 72 x 72 Å große Bereich dargestellt.

8.2.1. Ein Testversuch ohne Objekt

Auch bei exakter Deckungsgleichheit von zwei Aufnahmen enthält das Differenzbild noch die von der unterschiedlichen Elektronen- und Kornverteilung herrührenden Fluktuationen. Es interessiert nun zunächst, ob die Größenordnung dieser Fluktuationen überhaupt noch eine Unterscheidung der von einer Objektänderung stammenden Bilddetails zuläßt. Dazu wurde eine Serie von Aufnahmen ohne Objekt frei mit Elektronen belichtet. Es wurde eine Platte für die Auswertung ausgewählt, deren Schwärzung bei 0,5 liegt. Von dem photometrierten Bereich wurden zwei Teilbereiche als „Bildverteilungen“ mit Hilfe des Differenz-Programms ausgewertet. Die Auflösung wurde wie bei den folgenden Beispielen auf 3 Å beschnitten.

- 1) Die Eingabe-Verteilungen sind in Abb. 4 a,b Anh. dargestellt. Der gesamte „Schwärzungsbereich“ beträgt in jedem Fall 0,08; nach Wegnahme der 20 relativ höchsten Maxima und der 20 relativ kleinsten Minima 0,04. Man erkennt eine regellose Verteilung, in der keine Details bestimmter Ausdehnung bevorzugt auftreten. Allerdings ist eine Vorzugsrichtung zu erkennen, die wegen der Isotropie der Elektronenbestrahlung

¹⁾ Die Beschränkung ist notwendig, weil der Platz zum Zwischenspeichern des CONTUR -Outputs begrenzt ist.

nur aus Eigenschaften der Emulsion und aus den Entwicklungsbedingungen erklärt werden kann.

- 2) In der Korrelationsfunktion der beiden Verteilungen treten nur Unterschiede von maximal 0,13% auf; ein Korrelationspeak existiert nicht, wie erwartet. (Auf eine Wiedergabe der Korrelationsfunktion wurde verzichtet, da sie nur durch eine dichte regellose Verteilung von CONTUR - Linien dargestellt wird.) Da die Routine LOOKPK den höchsten Wert der KKF zur Bestimmung der Position des Peaks verwendet, wurde trotzdem ein „Verschiebungsvektor“ bestimmt:

$x_D = -480 \mu\text{m}; y_D = -540 \mu\text{m}$ ein Differenzbild der verschobenen Bildverteilungen berechnet.

- 3) Das Differenzbild (Abb. 4c Anh.) besitzt deutlich erhöhte Fluktuationen gegenüber den Einzelbildern. Der gesamte Schwärzungsbereich hat sich auf 0,11 erhöht; nach Wegnahme der Extrema entsprechend 1) bleibt er gleich dem der Einzelbilder (= 0,04).

8.2.2. Kohlefolie (Daten s. Tab. 4)

Als Objekt diente eine etwa 150 Å dicke Kohlefolie, die ein Loch einer Lochfolie überspannt. Die Aufnahmen entstanden unmittelbar nacheinander ($\Delta t \approx 10 \text{ sec}$); in dieser Zeitspanne unterlag das Objekt einer Strahlenbelastung von 800 – 1 100 Elektronen / Å². Die nach dem Verfahren der Kleinsten Quadrate bestimmten Werte für Δf und Δf_A unterscheiden sich bei beiden Aufnahmen jeweils um weniger als 50 Å. Zur Bestimmung der Orientierung und der ungefähren Lage dienten auffällige Marken in der Nähe des Folienlochrands (s. Abb. 5 Anh.).

In Tab. 4 ist der aus der Position des KKF - Peaks bestimmte Verschiebungsvektor aufgeführt. Die Vorjustierung anhand der Marken erweist sich danach als überraschend genau. Ein Vergleich von KKF und AKF (Abb. 6 a,b Anh.) zeigt die große Ähnlichkeit beider Funktionen in einem zentralen Bereich von ca. 30 Å.

Tabelle 4: Daten der Kohlefolien-Aufnahmen

Strahlspannung	100 kV
Strahlstrom	8 μA
Vakuum	$1,5 \cdot 10^{-5}$ Torr
V_{elopt}	178 000
Kondensorapertur	$100 \mu\text{m} = 4 \cdot 10^{-4}$ rad
Objektivapertur	-
Belichtungszeit	3 sec
Zeit zw. den Aufnahmen	10 sec
Fotomaterial	AGFA GEVAERT Scie. 23 D 56
Entw. Zeit	6 min
Parameter nach EMLSQ:	
Δf	4 100 Å
Δf_A	1 400 Å
φ_o	8°

Verschiebungsvektor

x_D	-64 μm	-3,58 \AA
y_D	68 μm	3,78 \AA

Wir kommen nun zur Diskussion der beiden Bildverteilungen (Abb. 7 a,b Anh.) und der errechneten Differenzverteilung (Abb. 7 c Anh.). Die Ähnlichkeit in der Gruppierung der starken Extrema zwischen den Ausgangsbildern ist klar zu sehen. Allerdings haben auch starke Veränderungen stattgefunden, im Einklang mit den Beobachtungen von Dowell⁴³. Die stärkste hier sichtbare Veränderung ist das neue Auftreten des starken Minimums V_0 (rechts unten).

Das Differenzbild besitzt kleinere örtliche Schwankungen als die Ausgangsbilder (der Kürze halber „1“ und „2“ genannt). Das neue Minimum V_0 in 2 taucht als starkes Maximum A1 im Differenzbild auf. Während sich zwei Gruppen von Extrema (links oben und Mitte) praktisch gegenseitig ausgelöscht haben, bleiben im Bereich der dritten Gruppe mehrere starke Extrema stehen. Tatsächlich ergibt eine genaue Nachprüfung, daß eine Deckungsgleichheit in diesem Bereich nur erreicht wird, wenn die Aufnahmen um einen anderen Vektor gegenseitig verschoben werden.

Der Differenzvektor zwischen beiden Verschiebungen beträgt (1,2 \AA , 1,2 \AA). Es hat den Anschein, als habe sich die gesamte Gruppe gegenüber der übrigen Bildverteilung um diesen Vektor bewegt. Daß eine solche Verschiebung stattgefunden hat, wird zum Beispiel durch eine Ausmessung der Distanz zwischen V_2 und A_0 in 1 und der Distanz zwischen den entsprechenden Extrema W_3 , A_1 in 2 bestätigt.

Der Vergleich mit dem Differenzbild des Testversuchs (Abb. 4c Anh.) zeigt, daß die Fluktuationen in den „flauen“ Bereichen des Differenzbildes der C-Folienaufnahmen größer sind, als es den Schwankungen der Elektronenbestrahlung und der Kornhaufenverteilung entsprechen würde.

Beispielweise beträgt der Unterschied zwischen den Extrema Y_3 und B_7 im C-Differenzbild 0,17 gegenüber dem maximalen Unterschied von 0,11 im Test-Differenzbild und einem mittleren Unterschied von ca. 0,04.

Wir haben bisher noch nicht den Fehler in der lokalen lateralen Zuordnung betrachtet, der eine Strukturänderung im Differenzbild vortäuschen kann. Wie sich ein solcher Fehler von $\sqrt{2} \cdot 1,2 \text{\AA}$ für eine kleine Teilfläche bemerkbar macht, wird durch die oben erwähnten Gruppen einander entsprechenden Extrema demonstriert, die bei der Differenzbildung nicht zur Deckung kommen und deshalb im Differenzbild besonders stark hervortreten.

Der über eine größere Fläche errechnete Korrelationspeak ist um einen Vektor verschoben, der nicht für alle Teilflächen genau gleich sein braucht. Neben Deformationen des Objekts gibt es mehrere, bereits schon erwähnte Ursachen für die Abweichungen von der genauen Punkt-für-Punkt-Zuordnung. In unserem Fall könnte man z.B. an eine nicht-ebene Lage eines der beiden Filme in der Kassette denken. Außerdem wurde die Orientierungsordnung nur anhand von Marken vorgenommen und nicht rechnerisch nachgeprüft.

Welche Abweichungen in der Positionsbestimmung möglich sind, wird durch Untersuchung von Nachbarflächen deutlich. Neben der Positionsbestimmung für den betrachteten Bereich

von $144 \times 144 \text{ \AA}$ wurde eine für den gesamten photometrierten Bereich ausgeführt ($290 \times 290 \text{ \AA}$).

Dabei ergaben sich die Werte

	Bild [μm]	Objekt [\AA]
x_D	- 32,5	- 1,81
y_D	+ 66	+ 3,66

Während sich die y-Komponente kaum geändert hat, ist die x-Komponente um $1,8 \text{ \AA}$ kleiner geworden. Zuordnungsfehler in dieser Größenordnung führen im Differenzbild bereits zu Extrem - Paaren mit nahezu anderthalbfacher Schwärzungsdifferenz. Dies soll an einem Modell gezeigt werden:

Zwei Gaußförmige „Bildpunkte“ mit einer Halbwertsbreite von 4 \AA wurden um verschiedene Distanzen gegenseitig verschoben und subtrahiert (Abb. 33). Bei $1,8 \text{ \AA}$ Abstand der Zentren entsteht ein Extrempaar mit einer Wertdifferenz von $1,36$. Um die durch Positionsabweichung entstehenden Fehler in der Differenzbildung unterhalb von 20% zu halten, ist eine Zuordnungsgenauigkeit von $0,2 \text{ \AA}$ erforderlich, unterhalb 40% immer noch eine von $0,5 \text{ \AA}$. Eine erhöhte Genauigkeit in der lokalen Positionszuordnung könnte vielleicht durch eine Erweiterung des Programmsystems um eine Routine erreicht werden, die die Korrelationsfunktionen von sehr kleinen Flächen bildet und untereinander vergleicht. Auf diese Weise könnte es gelingen, zwischen einer echten Verschiebung von Objektdetails und einer nachträglichen Störung der gegenseitigen isoplanatischen Zuordnung der beiden Bilder zu unterscheiden. Im ersten Fall sollte sich der Verschiebungsvektor sprunghaft in einem Teilbereich, im andern Fall kontinuierlich für alle Teilbereiche ändern.

Wir können in unserem Beispiel der Kohlefolie feststellen, daß die für den Gesamtbereich errechnete Position (abgesehen von der „verschobenen Gruppe“) auch lokal eine recht gute Deckungsgleichheit erzeugt: Die Niveauliniendichte wird in den Gebieten mit starken Schwärzungsunterschieden etwa halbiert.

Ob der gegenüber dem Testbild verbleibende Unterschied durch Strukturänderungen, ungenügende Skalierung oder durch ungenaue laterale Zuordnung zustande kommt, können erst weitere Untersuchungen zeigen, in denen systematisch die Verschiebung und die Skalierung geändert werden.

Das Differenzbild wurde anschließend mit Hilfe des Rekonstruktionsprogramms umgerechnet; als Parameter dienten die eingangs erwähnten Werte der Einzelbilder (Abb. 7d Anh.).

Es entspricht der allgemeinen Erfahrung beim visuellen Vergleich von Aufnahmen mit großer Defokussierungsdifferenz, daß das rekonstruierte Bild keine Ähnlichkeit mehr mit dem Differenzbild besitzt. Die große laterale Ausdehnung der gestörten Bildpunkte hat zur Folge, daß Hauptmaxima durch Überlagerung von Nebenmaxima vorgetäuscht werden, und daß die

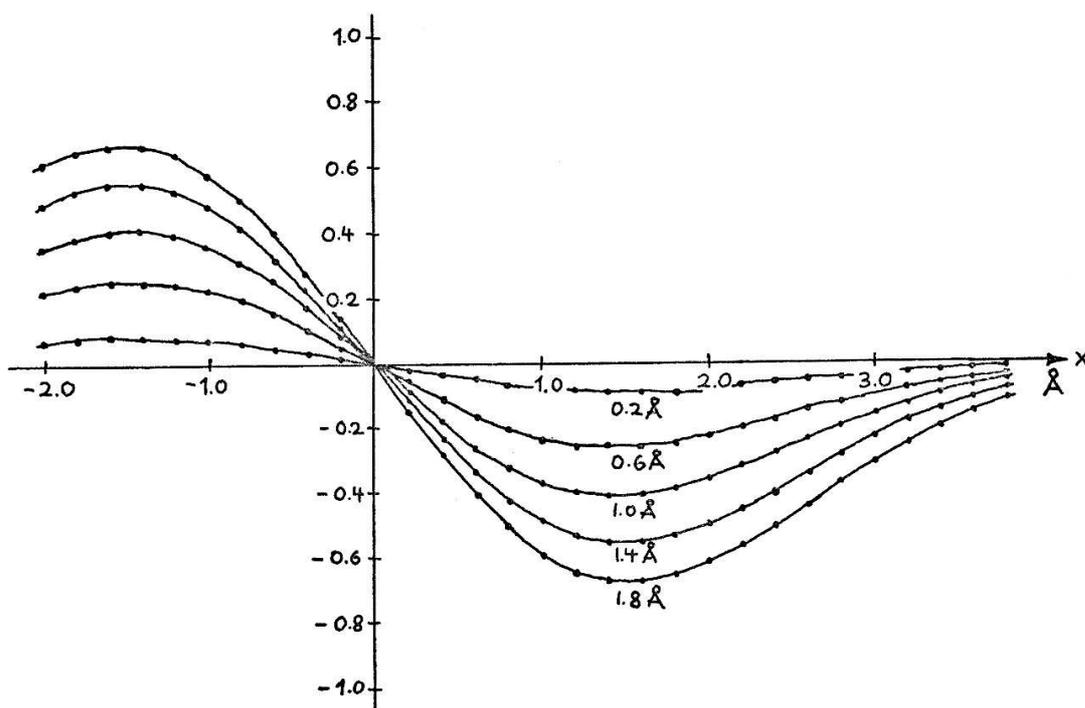


Abbildung 33: Differenz von zwei Gaußförmigen „Bildpunkten“ mit einer Halbwertsbreite von 2 \AA , deren Zentren um ξ gegenseitig verschoben sind.

Position der Bildpunktzentren nicht auffindbar ist. Wir haben hier eine Komplikation, die das Ergebnis der Rekonstruktion sehr fraglich macht: Die Hauptbeiträge zum Differenzbild kommen von einer Gruppe von Extrema, denen keine physikalische Realität entspricht, da sie offensichtlich durch „falsche“ Positionszuordnung entstanden ist. Deshalb soll diese Verteilung nicht näher diskutiert werden. In Abb. 8 a,b Anh. sind Schwärzungsausdrücke des Differenzbilds und es rekonstruierten Differenzbilds dargestellt; der in 8b eingezeichnete Rahmen soll etwa die Reichweite des Bildpunkts angeben und damit den Randbereich abgrenzen, in dem wegen der Bildbereichsbegrenzung (s. Abschn. 2.4.) eine Interpretation ausgeschlossen ist.

Tabelle 4a: Maximale Schwärzungsdifferenzen bei 3 \AA Auflösung. *) ohne die Gruppe der verschobenen Extrema und ohne Maximum A1.

Bild	1	2	Δ	Δ^*	R
Δd	0,40	0,41	0,37	0,31	0,46

In Tab. 4a wird sichtbar, daß die Schwärzungsschwankungen im Differenzbild auch nach Abzug der verschobenen Gruppe und des Einzel-Maximums A1 etwa 75% der Schwankungen der Einzelbilder betragen. Die Erhöhung des Schwärzungsspielraums im rekonstruierten Bild ist eine Folge der Verstärkung der mittleren quadratischen Schwankung um den Faktor $V_n \approx 1,2$ (vgl. Abschn. 7.5.).

8.2.3. Graphitfolie

Graphitlamellen wurden durch ein zweistufiges Spaltverfahren von einem Graphitkristall abgespalten und zwischen zwei Cu - Netze gebracht. Auf der Aufnahme sind die scharf begrenzten Ränder von zwei sich überlappenden Lamellen zu erkennen (Abb. 9 Anh.).

Zur Orientierungs- und Lagebestimmung wurde Kantenrichtung und Kreuzungspunkt verwendet; die photometrierten Bereiche sind in den Abb. 10 a,b Anh. eingezeichnet.

Die Folie ist nahe der Berandung keilförmig aufgebaut; deshalb besitzt die Schwärzungsverteilung einen Gradienten senkrecht zum Folienrand. Dieser Fall ist für die Anwendung der Routine CHKFOU (Abschn. 4.5.) interessant. KKF und AKF zeigen einen „dachähnlichen“ Verlauf (Abb. 11 a,b Anh.); und die Suchroutine LOOKPK findet ein relatives Maximum auf dem „First“, wenn das Wienerspektrum unmodifiziert bleibt. (Dies kann durch einen sehr kleinen Eingabewert σ_{crit} erreicht werden). Bei hoher Niveauliniendichte, wie in Abb. 11b Anh., ist bereits der Peak zu erkennen. Durch den Eingriff von CHKFOU in das Wienerspektrum ändert sich die KKF stark (Abb. 11d Anh.): Es bleibt nur ein kleiner Grat in der Mitte stehen, der von Koeffizienten mit $|\vec{h}| > 0,14 \text{ \AA}^{-1}$ verursacht wird. Der Korrelationspeak hebt sich nun sehr stark aus der Korrelationsfunktion heraus; seine Position kann mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Ähnlich, wenn auch nicht so stark, ist die Veränderung der AKF (Abb. 11c Anh.).

Da als Anhaltspunkt für die Justierung der Platten im Photometer jeweils der Folienrand diente, ist die große Verschiebung senkrecht zum Rand recht überraschend. Obwohl die Kontamination an solchen Randbereichen bekanntlich erhöht ist, ist ein lateraler Zuwachs von 24 \AA in 15 sec bei Objektraumkühlung doch ungewöhnlich groß. Wegen der Ungenauigkeiten bei der Justierung kann erst dann eine sichere Deutung gegeben werden, wenn die Photometrierung den „Vakuumbereich“ mit einschließt.

In den CONTUR- Darstellungen der einzelnen Aufnahmen (Abb.12 a,b Anh.) ist eine Vorzugsrichtung von ca. 60° gegen die x-Richtung zu erkennen. Auffällig ist vor allem in Bild 2 eine gradlinige Aneinanderreihung von Maxima und Minima, die einander abwechseln, z.B. (A8, V2, (Bo, B7), V1, C3, V7, C4). Der Abstand dieser Punkte liegt bei 5 \AA . Diese Strecke entspricht dem Durchmesser der hexagonalen „Zelle“ von Heidenreich⁸⁸, die selbst aus 3 Einheitszellen des Flächengitters zusammengesetzt ist. Vom selben Autor wurden bereits Netzebenen mit dem Abstand von $3,4 \text{ \AA}$ bei einer Graphitpräparation sichtbar gemacht⁸⁹. Da der vorliegende Teilbereich unserer Aufnahmen keine näheren Schlüsse auf die Struktur erlaubt, sollen diese Hinweise genügen.

Tabelle 5: Daten der Graphitfolien-Aufnahme

Strahlspannung	100 kV
Strahlstrom	5 μA
Vakuum	$8 \cdot 10^{-6}$ Torr
V_{elopt}	170 000
Kondensorapertur	$50 \mu\text{m} = 2 \cdot 10^{-4}$ rad
Objektivapertur	$50 \mu\text{m} = 9,6 \cdot 10^{-3}$ rad
Belichtungszeit	4 sec
Zeit zw. den Aufnahmen	15 sec
Fotomaterial	AGFA GAVAERT 23 D 50
Entw. Zeit	6 min
Parameter nach EMLSQ:	

Δf	1 410 Å
Δf_A	300 Å
φ_0	-57°

Verschiebungsvektor (Nach Unterdrückung des Gradienten durch CHKFOU)

x_D	175 µm	9,7 Å
y_D	485 µm	27 Å

Sehr wahrscheinlich hängt aber die in der 2. Aufnahme sichtbare Periodizität mit dem kristallinen Aufbau der Folie zusammen. Die beiden Bildbereiche, die nach Lage des Korrelationspeaks optimal zur Deckung kommen sollten, besitzen keine große Ähnlichkeit. Die erwähnte periodische Gruppierung der Extrema ist in Bild 1 im betrachteten Teilbereich nur andeutungsweise zu sehen; zur Deckung kommen nur vereinzelte Extrema.

Bringt man Bild 2 gegenüber 1 in die richtige Position (Abb. 12c Anh.), so erkennt man, daß sich die periodischen Gruppierungen im oberen Teil von 1 und die von 2 aneinander anschließen. Dies könnte ein Hinweis sein auf eine "transversale Epitaxie", bevorzugtes Richtungswachstum in der Fläche.

Erwartungsgemäß treten im Differenzbild (Abb. 12d Anh.) die in 2 hinzutretenden periodischen Gruppen auf, und der Schwärzungsumfang ist etwa gleich geblieben (s. u.).

Durch die Rekonstruktion (Abb. 12e Anh.) ändert sich - bis auf die Kontrastumkehr - das Bild kaum; dies läßt sich anhand der Lage und Gestalt der einzelnen Extrema nachweisen (Aus den Maxima sind jeweils Minima geworden und umgekehrt). Da die Defokussierung der Aufnahmen in der Nähe des Scherzer-Fokus liegt und der Astigmatismus gering ist, sind auffallende Veränderungen auch kaum zu erwarten. In Tab. 5a werden die Schwärzungsunterschiede der einzelnen Bildverteilungen aufgeführt.

Tabelle 5a: Maximale Schwärzungsdifferenzen bei 3 Å Auflösung

Bild	1	2	Δ	R
Δd	0,43	0,39	0,33	0,5

Die dargestellten Beispiele illustrieren die Anwendung des Bilddifferenzverfahrens für spezielle Fälle. Erst weitere Versuche werden zeigen, ob das Verfahren zu einer Untersuchungsmethode von Strukturänderungen im Elektronenmikroskop ausgebaut werden kann.

Die andere Anwendungsmöglichkeit, die Abtrennung des Objektbilds vom Folienbild sollte die Untersuchungen von biologischen Präparaten außerordentlich erleichtern können. Hier liegen die Schwierigkeiten bisher vor allem auf präparativem Gebiet.

Für die Bildrekonstruktion stand bisher kein geeignetes individuelles Test-Objekt zur Verfügung, das die Voraussetzung in Abschn. 1.1. erfüllt. Entsprechende Versuche mit der Fettsäuresynthetase (s. Abb. 1 Anh) wurden abgebrochen, da infolge der großen Dicke und der starken Kontrastierung die lineare Näherung mit Sicherheit nicht mehr gegeben ist.

Kapitel 9

Zusammenfassung

Für den Fall schwacher Phasenobjekte im kohärenten Hellfeld wird eine Beschreibung der elektronenmikroskopischen Abbildung durch die lineare Übertragungstheorie möglich. Dieser Sachverhalt kann doppelt ausgenutzt werden: im Bilddifferenzverfahren zur Trennung von Objekt und Trägerfolie bzw. zur Ermittlung der zwischen zwei Aufnahmen erfolgenden Objektveränderung, im Bildrekonstruktionsverfahren zu einer nachträglichen Korrektur der Linsenfehler.

Voraussetzung für beide Verfahren ist eine quantitative Erfassung des Bildinhalts durch das Photometer. Um eine Verfälschung der Bildverteilung durch den Meßprozeß zu vermeiden, müssen Raster, Blendengröße und Bildbereichsgröße gewisse Anforderungen erfüllen.

Beim Bilddifferenzverfahren ist die für die Subtraktion der beiden Bildverteilungen notwendige laterale Zuordnung durch die Verwendung von Korrelationsfunktionen zu erreichen. Es wird ein Programmsystem beschrieben, das die Bestimmung des Verschiebungsvektors mit einer Genauigkeit von besser als 1 \AA ausführt und die Bildverteilungen nach einer geeigneten Skalierung voneinander subtrahiert.

Die Differenzanalyse wurde erstmals durchgeführt an je zwei Aufnahmen von einer Kohlefolie und einer Graphitfolie, die bei Objektraumkühlung unmittelbar nacheinander entstanden. Die in der Zwischenzeit auftretenden Veränderungen können durch Restkontamination, durch Oberflächenwanderung oder durch Strukturveränderungen infolge von Strahlenschäden hervorgerufen werden. Im Differenzbild der Kohlefolieaufnahmen zeigt sich, daß ein kleiner Teilbereich (ca. $20 \times 20 \text{ \AA}$) beider Einzelaufnahmen nur dann zur Deckung kommt, wenn ein – gegenüber dem aus der Verschiebung des Korrelationspeaks bestimmten – geänderter Verschiebungsvektor angenommen wird. Ob dies auf eine Verschiebung einer Teilstruktur des Objekts ($|\vec{r}_D|$) oder auf Einflüsse nach der Bildentstehung zurückzuführen ist, kann erst durch weitere Experimente festgestellt werden. Das Differenzbild enthält außerdem größere Bildbereiche mit Schwärzungsunterschieden, die ungefähr denen eines Differenzbilds entsprechen, das in einem Kontrollexperiment aus Aufnahmen ohne Objekt errechnet wurde. Im Fall der Graphitfolie zeigt das Differenzbild eindimensionale periodische Anordnungen von Maxima und Minima mit einem Abstand von ca. 5 \AA , die sich an entsprechende Anordnungen in einem Teilbereich der ersten Aufnahmen anschließen. Zur Deutung dieser Erscheinung wird angenommen, daß die Kontaminationsschicht epitaktisch am Folienrand aufgewachsen ist.

Die Beobachtung der Korrelationsspektren im Diffraktogramm von zwei übereinandergelegten Aufnahmen bietet ebenfalls eine Möglichkeit, die gegenseitige Lage von einander entsprechenden Bildbereichen aufzusuchen. Das bei geringen Verschiebungen im Diffraktogramm beobachtbare Streifenmuster kann auch zur Bestimmung der Übertragungsgrenze des Elektronenmikroskops dienen. Bei Aufnahmen mit dem Elmiskop IA wird auf diese Weise eine Übertragungsgrenze festgestellt die einer Punktauflösung zwischen $3,6 \text{ \AA}$ und 4 \AA entspricht.

Eine solche Angabe setzt voraus, daß im gesamten Übertragungsbereich entweder durch Eingriffe in die Objektivapertur oder durch nachträgliche Rechnung eine phasenrichtige Zuordnung aller Übertragungszonen erfolgt.

Diffraktogramme einzelner Aufnahmen besitzen eine ähnliche periodische Modulation, wie sie aus den Korrelationsexperimenten im Lichtdiffraktometer bekannt ist. Diese Erscheinung wird auf eine sprungartige Drift während der Aufnahme zurückgeführt. Auch die Modifizierung der Fourierquadratverteilung durch gleichmäßige periodische Bildbewegung während der Aufnahme wird berechnet und in Diffraktogrammen einiger Aufnahmen nachgewiesen. Zwischen den beiden letzten Drifterscheinungen ist eine sichere Unterscheidung nicht möglich.

Schließlich wird die Anwendung von Bildrekonstruktionsverfahren zur nachträglichen Korrektur der Linsenfehler besprochen. Die bei der „Filterung“ benötigte Gewichtsfunktion muß, zur Begrenzung der lokalen und integralen Rauschverstärkung, bestimmte Forderungen erfüllen, die hergeleitet und genauer erörtert werden. Voraussetzung für die Rekonstruktion ist die Kenntnis der jeweiligen Übertragungsfunktion. Die Parameter der Übertragungsfunktion können durch ein inzwischen von Bußler entwickeltes Least-Square-Programm direkt aus der Fouriertransformierten des Bildbereichs entnommen werden, wenn dieser einen amorphen Objektbereich repräsentiert. Es wurde ein Programm zur Ausführung einer Bildrekonstruktion entwickelt und in drei Fällen auf Bildverteilungen angewendet. Es handelt sich um die oben erwähnten Differenzbilder und um die Aufnahme einer Bakterienhaut.

Die Beurteilung des durch Bildrekonstruktion erzielbaren Gewinns kann mit Hilfe der Linfotschen Bildgütekriterien erfolgen. Diese Kriterien wurden auf die ursprüngliche und die nach Rekonstruktion resultierende Übertragungsfunktion angewendet. Im letzteren Fall ergibt sich eine wesentliche Verbesserung der Abbildungstreue, der Korrelationsqualität und des relativen Strukturgehalts.

Welche Bedeutung die in der Arbeit besprochenen Methoden für die Auswertung von Höchstauflosungsaufnahmen haben werden, können erst zahlreiche Experimente in der Zukunft zeigen.

Anhang

Anhang I Zu Abschn. 5.9., S.88

Wir betrachten

$$F = S_1^2 + S_2^2 + 2S_1S_2 \cos \psi$$

mit den Definitionen $\psi = 2\pi x^* \xi$;

$$S_1 = \sin \gamma_1; \quad \gamma_1 = -\frac{\pi}{\lambda}(\Delta f_1 + \frac{1}{2}\Delta f_A \sin 2\varphi)\vartheta^2 + \frac{\pi}{2\lambda}C_0\vartheta^4;$$

$$S_2 = \sin \gamma_2; \quad \gamma_2 = \gamma_1 + \frac{\pi}{\lambda}(\Delta f_1 - \Delta f_2)\vartheta^2;$$

$\frac{\partial F}{\partial \varphi} = 0$ führt für $\sin \gamma_1 = 0$ $\vartheta \neq 0$ und $\Delta f_A \neq 0$

$$\text{auf } \cos \left[\frac{\pi}{\lambda}(\Delta f_2 - \Delta f_1)\vartheta^2 \right] + \cos \psi = 0$$

Diese Gleichung hat die Lösungen

$$\frac{\pi}{\lambda}(\Delta f_2 - \Delta f_1)\vartheta^2 = \psi \pm n\pi$$

$$-\frac{\pi}{\lambda}(\Delta f_2 - \Delta f_1)\vartheta^2 = \psi \pm n\pi \quad n = 1, 2, 3 \dots$$

die als Kreisgleichungen

$$(\Delta f_2 - \Delta f_1)(x^{*2} + y^{*2}) - 2x^* \xi \pm n = 0$$

dargestellt werden kann.

Falls $\Delta f_A = 0$, erhält man diese Gleichungen auch aus $\frac{\partial F}{\partial \vartheta} = 0$.

Anhang II
Abbildungen

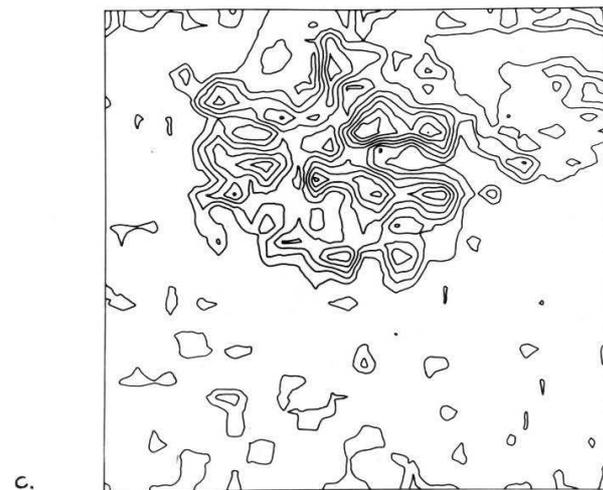
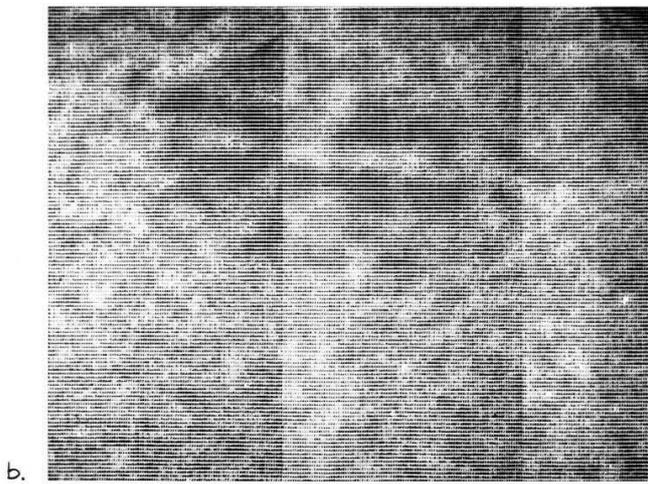
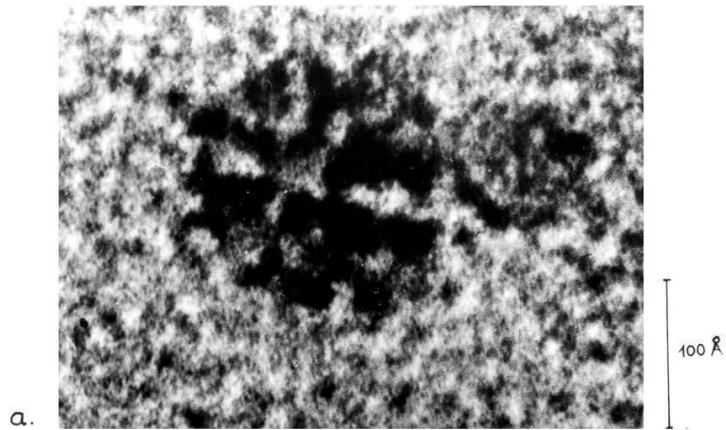
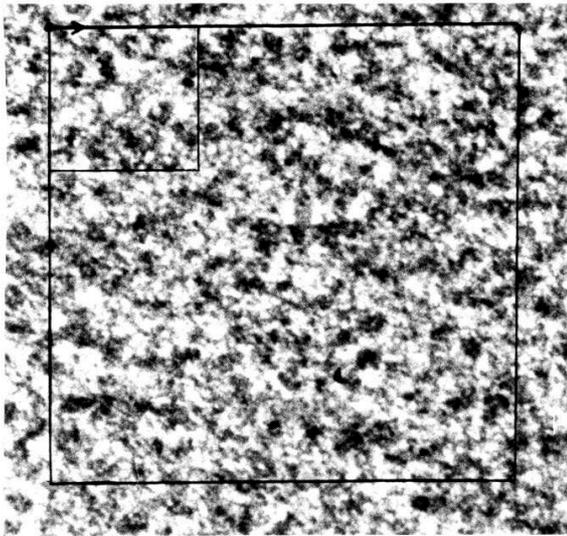


Abbildung 1: *Hefe – Fettsäuresynthetase – Enzymkomplex.*
Vergleich einer fotografischen Vergrößerung (a) mit einer Darstellung durch Schwärzungsausdruck (b) und CONTUR (c)



100 Å

Abbildung 2: Murein-Sacculus von Spirillum Serpens.

Photometrierter Bildbereich.

Startpunkt und Abstrichung der 1. Bildzeile sind markiert.

Der eingezeichnete Teilbereich wurde zur Rekonstruktion verwendet.

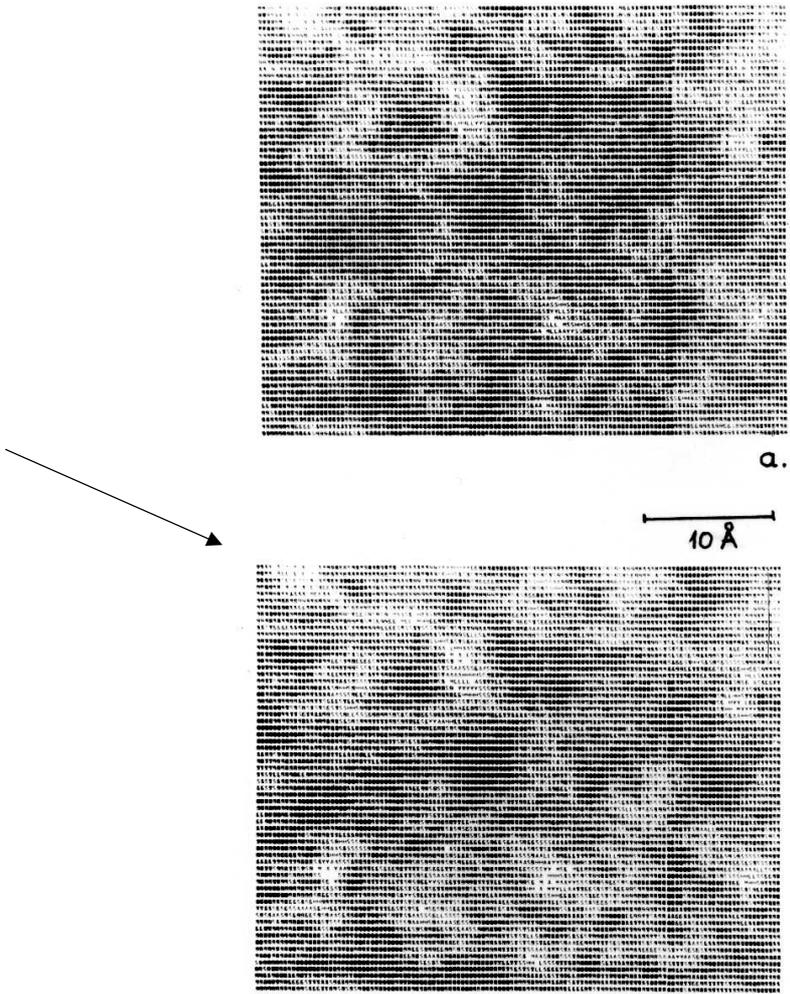


Abbildung 3: Rekonstruktion der Aufnahme von Murein-Sacculus:

- a) Original
- b) Rekonstruiert mit $a = 0,2$
- c) Rekonstruiert mit $a = 0,1$

Photometrierung: 1 Abstandschritt = $0,62 \text{ \AA}$

Schwärzungsdarstellung ohne Reduzierung der Auflösung.

c. Pfeil: Azimut $\varphi = -45^\circ$.

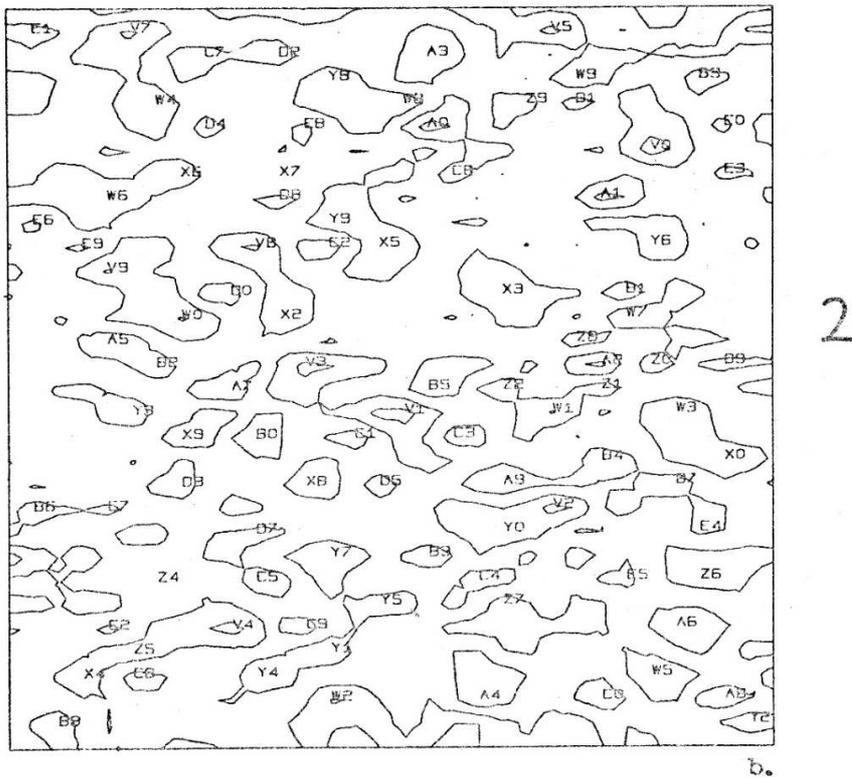
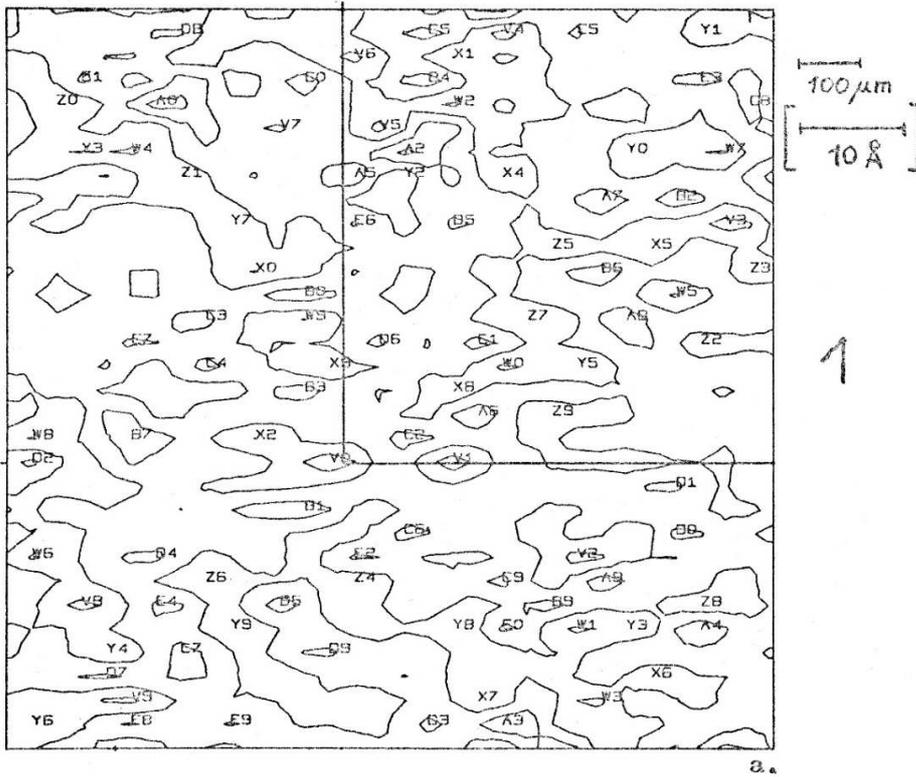
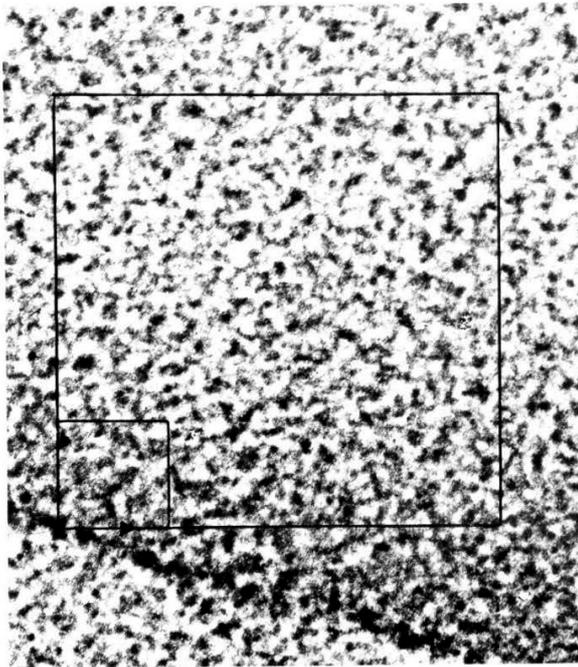
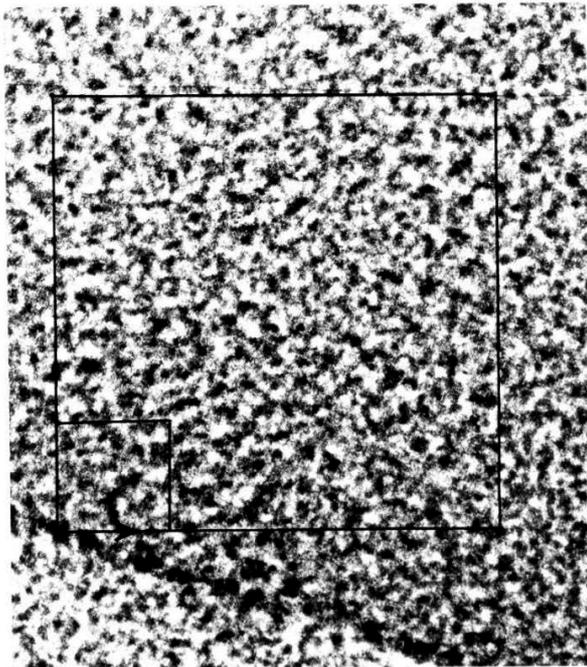


Abbildung 4 a,b: Zwei Bereiche einer frei belichteten Platte.
 Rahmen in 1 gibt die relative Lage von 2 bei der Differenzbildung an. Höhenschichtlinien: Abstand 0,02
 a) von -0,59 bis -0,53 b) von -0,59 bis -0,53



1



2

100 Å

Abbildung 5: Photometrierte Bereiche von zwei Kohlefolien-Aufnahmen; Startpunkt am Lochrand.
 Pfeil: Abtastrichtung der ersten Zeile.
 Meßpunktabstand $20 \mu\text{m} = 1,1 \text{ \AA}$.
 Der eingezeichnete Teilbereich wurde in der Differenzanalyse untersucht.

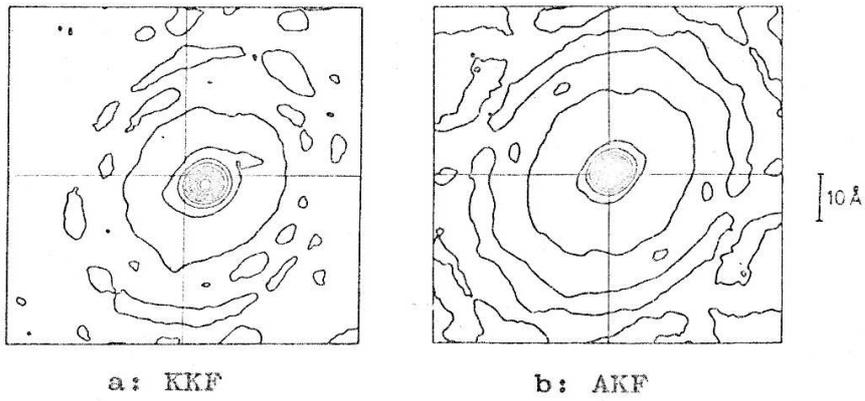


Abbildung 6 a,b: Kohlefolie; Vergleich der Korrelationsfunktionen (Ausschnitte) eines $290 \times 290 \text{ \AA}$ großen Bereichs.

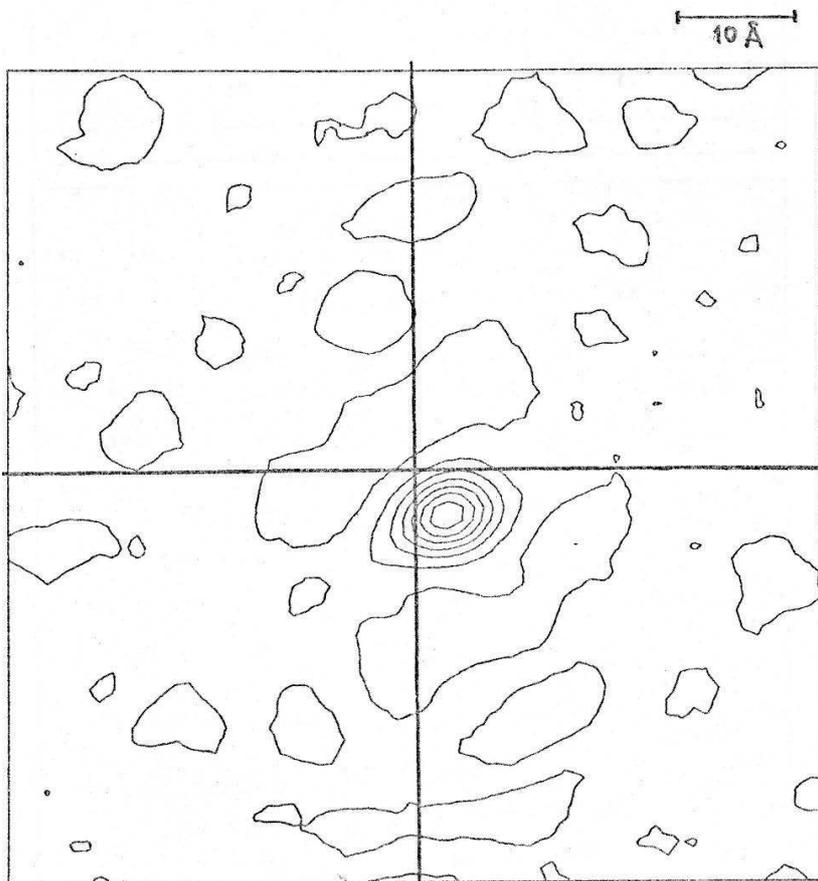
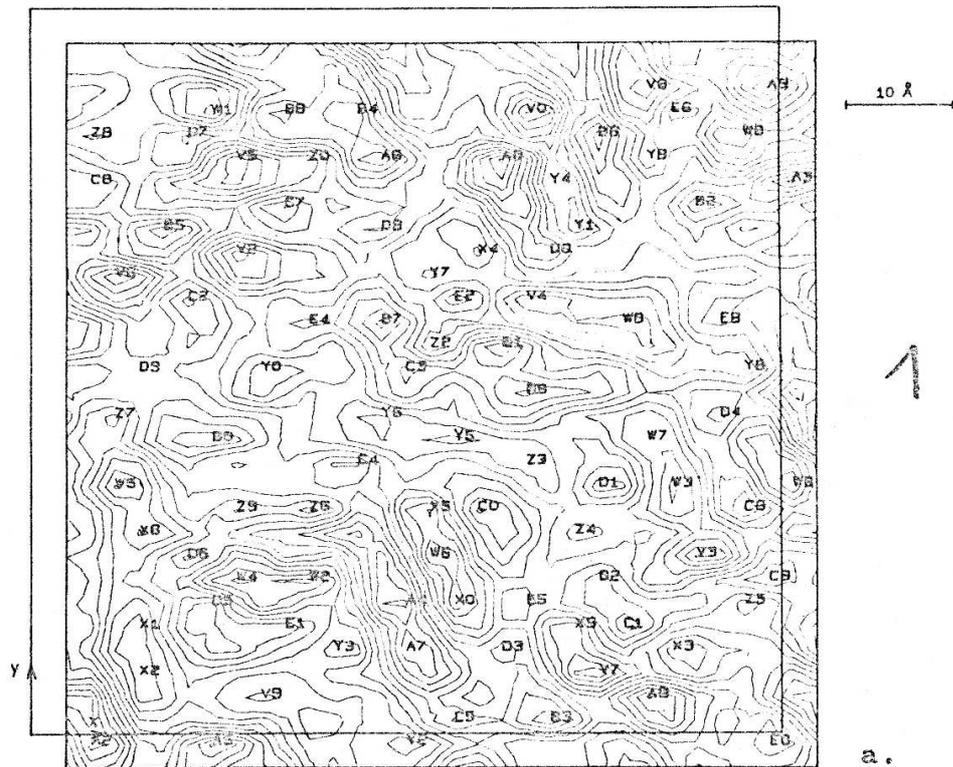
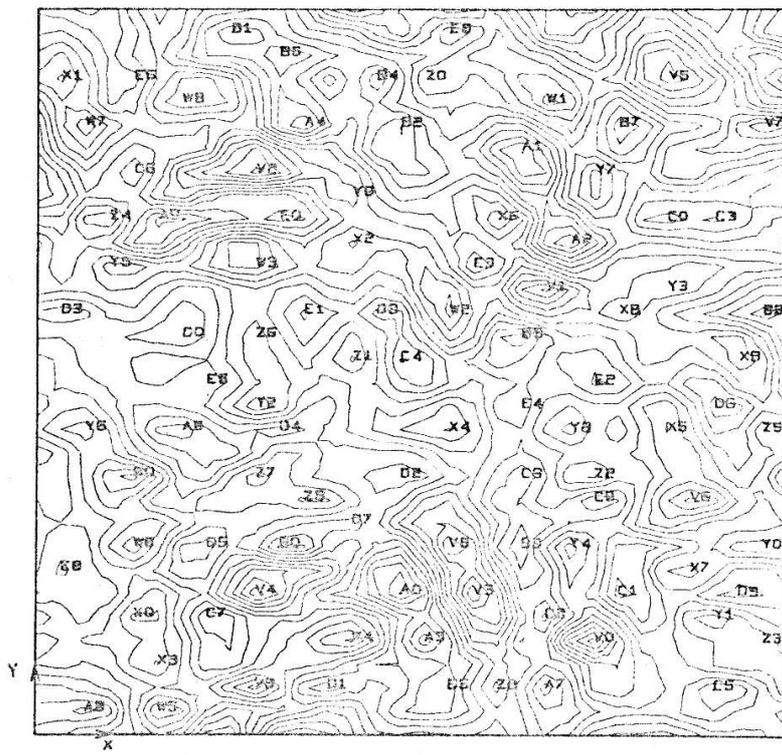


Abbildung 6 c: Kohlefolie; Kreuzkorrelationsfunktion (Ausschnitt) eines $144 \times 144 \text{ \AA}$ großen Bereichs.
Höhenschichtlinien: Abstand 0,002; von 0,250 bis 0266



a.



2

b.

Abbildung 7 a,b: Kohlefolie; Einzelbilder.
 Rahmen in 1 gibt die relative Lage von 2 an.
 Höhengichtlinien: Abstand 0,03
 a) von 0,19 bis 0,58 b) von 0,16 bis 0,55



a.



b.

Abbildung 8: Kohlefolie; Schwärzungsausdruck in 3 Å Auflösung, (144 x 144 Å) in seitenrichtiger Zuordnung zur CONTUR-Darstellung (Abb. 7 c,d).
 CONTUR-Bereich: linkes unteres Viertel
 a) Differenzbild
 b) Rekonstruiertes Differenzbild. Bedeutung des Rahmens siehe Text.

Kohlefolie / Lagen und Werte der relativen Extrema.

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	0.588	A0	19	40.000	27	57.778	0.187	V0	20	42.222	29	62.222
2	0.571	A1	32	68.889	15	31.111	0.199	V1	32	68.889	4	6.667
3	0.563	A2	2	2.222	2	2.222	0.204	V2	8	15.556	23	48.889
4	0.558	A3	31	66.667	26	55.555	0.215	V3	27	57.778	10	20.000
5	0.558	A4	15	31.111	8	15.556	0.221	V4	20	42.222	21	44.444
6	0.557	A5	7	13.333	2	2.222	0.222	V5	8	15.556	27	57.778
7	0.546	A6	14	28.889	27	57.778	0.223	V6	3	4.444	22	46.667
8	0.546	A7	15	31.111	6	11.111	0.225	V7	23	48.889	5	8.889
9	0.525	A8	25	53.333	4	6.667	0.227	V8	25	53.333	30	64.444
10	0.523	A9	30	64.444	30	64.444	0.234	V9	9	17.778	4	6.667
11	0.520	B0	7	13.333	15	31.111	0.237	W0	24	51.111	20	42.222
12	0.518	B1	19	40.000	19	40.000	0.238	W1	7	13.333	29	62.222
13	0.515	B2	27	57.778	25	53.333	0.239	W2	11	22.222	9	17.778
14	0.515	B3	21	44.444	3	4.444	0.242	W3	26	55.555	13	26.667
15	0.513	B4	13	26.667	29	62.222	0.242	W4	8	15.556	9	17.778
16	0.511	B5	5	8.889	24	51.111	0.245	W5	3	4.444	13	26.667
17	0.509	B6	23	48.889	28	60.000	0.251	W6	16	33.333	10	20.000
18	0.501	B7	14	28.889	20	42.222	0.251	W7	25	53.333	15	31.111
19	0.499	B8	10	20.000	29	62.222	0.252	W8	31	66.667	13	26.667
20	0.499	B9	20	42.222	17	35.556	0.254	W9	29	62.222	28	60.000
21	0.497	C0	18	37.778	12	24.444	0.256	X0	17	35.556	8	15.556
22	0.488	C1	24	51.111	7	13.333	0.257	X1	4	6.667	7	13.333
23	0.472	C2	6	11.111	21	44.444	0.257	X2	4	6.667	5	8.889
24	0.471	C3	15	31.111	18	37.778	0.260	X3	26	55.555	6	11.111
25	0.465	C4	13	26.667	14	28.889	0.272	X4	18	37.778	23	48.889
26	0.464	C5	17	35.556	3	4.444	0.276	X5	16	33.333	12	24.444
27	0.463	C6	29	62.222	12	24.444	0.277	X6	4	6.667	11	22.222
28	0.463	C7	10	20.000	25	53.333	0.277	X7	32	68.889	11	22.222
29	0.458	C8	2	2.222	26	55.555	0.285	X8	32	68.889	28	60.000
30	0.456	C9	30	64.444	9	17.778	0.285	X9	22	46.667	7	13.333
31	0.456	D0	21	44.444	23	48.889	0.288	Y0	9	17.778	18	37.778
32	0.452	D1	23	48.889	13	26.667	0.292	Y1	22	46.667	24	51.111
33	0.452	D2	23	48.889	9	17.778	0.293	Y2	15	31.111	2	2.222
34	0.448	D3	19	40.000	6	11.111	0.293	Y3	12	24.444	6	11.111
35	0.445	D4	28	60.000	16	33.333	0.294	Y4	21	44.444	26	55.555
36	0.443	D5	7	13.333	8	15.556	0.297	Y5	17	35.556	15	31.111
37	0.442	D6	6	11.111	10	20.000	0.302	Y6	14	28.889	16	33.333
38	0.435	D7	6	11.111	28	60.000	0.303	Y7	16	33.333	22	46.667
39	0.433	D8	14	28.889	24	51.111	0.309	Y8	29	62.222	18	37.778
40	0.429	D9	4	6.667	18	37.778	0.309	Y9	25	53.333	27	57.778
41	0.427	E0	30	64.444	2	2.222	0.309	Z0	11	22.222	27	57.778
42	0.426	E1	10	20.000	7	13.333	0.310	Z1	32	68.889	21	44.444
43	0.422	E2	17	35.556	21	44.444	0.312	Z2	16	33.333	19	40.000
44	0.409	E3	28	60.000	20	42.222	0.322	Z3	20	42.222	14	28.889
45	0.409	E4	11	22.222	20	42.222	0.325	Z4	22	46.667	11	22.222
46	0.408	E5	20	42.222	8	15.556	0.325	Z5	29	62.222	8	15.556
47	0.378	E6	26	55.555	29	62.222	0.326	Z6	11	22.222	12	24.444
48							0.327	Z7	3	4.444	16	33.333
49							0.335	Z8	2	2.222	28	60.000
50							0.335	Z9	8	15.556	12	24.444

Tabelle 6 zu Bild 1 (Abb. 7a)

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	0.552	A0	16	33.333	7	13.333	0.143	VO	24	51.111	5	8.889
2	0.524	A1	21	44.444	26	55.555	0.151	V1	22	46.667	20	42.222
3	0.520	A2	23	48.889	22	46.667	0.153	V2	10	20.000	25	53.333
4	0.510	A3	17	35.556	5	8.889	0.160	V3	19	40.000	7	13.333
5	0.487	A4	12	24.444	27	57.778	0.171	V4	10	20.000	7	13.333
6	0.487	A5	32	68.889	29	62.222	0.174	V5	27	57.778	29	62.222
7	0.481	A6	7	13.333	14	28.889	0.179	V6	28	60.000	11	22.222
8	0.476	A7	22	46.667	3	4.444	0.192	V7	31	66.667	27	57.778
9	0.473	A8	3	44.444	2	2.222	0.192	V8	18	37.778	9	17.778
10	0.471	A9	6	11.111	23	48.889	0.207	V9	10	20.000	3	4.444
11	0.467	B0	11	22.222	9	17.778	0.208	W0	5	8.889	12	24.444
12	0.461	B1	9	17.778	31	66.667	0.209	W1	22	46.667	28	60.000
13	0.461	B2	16	33.333	27	57.778	0.210	W2	18	37.778	19	40.000
14	0.459	B3	21	44.444	9	17.778	0.211	W3	10	20.000	21	44.444
15	0.454	B4	15	31.111	29	62.222	0.214	W4	14	28.889	5	8.889
16	0.453	B5	18	37.778	3	4.444	0.220	W5	6	11.111	2	2.222
17	0.452	B6	11	22.222	30	64.444	0.226	W6	5	8.889	9	17.778
18	0.452	B7	25	53.333	7	57.778	0.227	W7	3	4.444	27	57.778
19	0.448	B8	21	44.444	18	37.778	0.229	W8	7	13.333	28	60.000
20	0.448	B9	31	66.667	19	40.000	0.243	W9	32	68.889	31	66.667
21	0.445	C0	27	57.778	23	48.889	0.243	X0	5	8.889	6	11.111
22	0.440	C1	25	53.333	7	13.333	0.244	X1	2	2.222	29	62.222
23	0.440	C2	22	46.667	6	11.111	0.245	X2	14	28.889	22	46.667
24	0.435	C3	29	62.222	23	48.889	0.247	X3	6	11.111	4	6.667
25	0.434	C4	16	33.333	17	35.556	0.248	X4	18	37.778	14	28.889
26	0.432	C5	29	62.222	3	4.444	0.249	X5	27	57.778	14	28.889
27	0.429	C6	5	8.889	25	53.332	0.250	X6	20	42.222	23	48.889
28	0.428	C7	8	15.556	6	11.111	0.253	X7	28	60.000	8	15.556
29	0.428	C8	21	44.444	12	24.444	0.258	X8	25	53.333	19	40.000
30	0.428	C9	24	51.111	11	22.222	0.258	X9	30	64.444	17	35.556
31	0.427	D0	7	13.333	18	37.778	0.259	Y0	31	66.667	9	17.778
32	0.425	D1	13	20.667	3	4.444	0.259	Y1	29	62.222	6	11.111
33	0.422	D2	16	33.333	12	24.444	0.259	Y2	10	20.000	15	31.111
34	0.421	D3	2	2.222	19	40.000	0.260	Y3	27	57.778	20	42.222
35	0.420	D4	11	22.222	14	28.889	0.261	Y4	23	48.889	9	17.776
36	0.417	D5	8	15.556	9	17.778	0.263	Y5	4	6.667	21	44.444
37	0.417	D6	29	62.222	15	31.111	0.263	Y6	3	4.444	14	28.889
38	0.416	D7	14	28.889	10	20.000	0.265	Y7	24	51.111	25	53.333
39	0.411	D8	15	31.111	19	40.000	0.267	Y8	23	48.889	14	28.889
40	0.410	D9	30	64.444	7	13.333	0.268	Y9	14	28.889	24	51.111
41	0.409	E0	11	22.222	23	48.889	0.274	Z0	17	35.556	29	62.222
42	0.407	E1	12	24.444	19	40.000	0.276	Z1	14	28.889	17	35.556
43	0.404	E2	24	51.111	16	33.333	0.279	Z2	24	51.111	12	24.444
44	0.399	E3	19	40.000	21	44.444	0.280	Z3	31	66.667	5	8.889
45	0.391	E4	21	44.444	15	31.111	0.283	Z4	4	6.667	23	48.889
46	0.391	E5	8	19.556	16	33.333	0.284	Z5	31	66.667	14	28.889
47	0.384	E6	5	8.889	29	62.222	0.290	Z6	10	20.000	18	37.778
48	0.380	E7	32	68.889	2	2.222	0.292	Z7	10	20.000	12	24.444
49	0.376	E8	2	2.222	8	15.556	0.300	Z8	20	42.222	3	4.444
50	0.373	E9	18	37.778	31	66.667	0.303	Z9	12	24.444	11	22.222

Tabelle 7 zu Bild 2 (Abb. 7b)

Kohlefolie / Lagen und Werte der relativen Extrema.

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	0.153	A0	20	42.222	25	53.333	-0.220	V0	21	44.444	27	57.778
2	0.148	A1	25	53.333	5	8.889	-0.186	V1	23	48.889	22	46.667
3	0.147	A2	28	60.000	30	64.444	-0.177	V2	22	46.667	25	53.333
4	0.145	A3	18	37.778	19	40.000	-0.167	V3	16	33.333	30	64.444
5	0.143	A4	21	44.444	23	48.889	-0.142	V4	26	55.555	28	60.000
6	0.133	A5	30	64.444	11	22.222	-0.138	V5	16	33.333	27	57.778
7	0.124	A6	14	28.889	25	53.333	-0.138	V6	19	40.000	21	44.444
8	0.124	A7	14	28.889	27	57.778	-0.134	V7	23	48.889	3	4.444
9	0.123	A8	25	53.333	24	51.111	-0.132	V8	13	26.667	7	13.333
10	0.118	A9	14	28.889	22	46.667	-0.125	V9	28	60.000	4	6.667
11	0.111	B0	19	40.000	10	20.000	-0.116	W0	21	44.444	12	24.444
12	0.110	B1	17	35.556	4	6.667	-0.116	W1	5	8.889	20	42.222
13	0.110	B2	13	26.667	29	62.222	-0.114	W2	29	62.222	9	17.778
14	0.105	B3	23	48.889	29	62.222	-0.109	W3	9	17.778	24	51.111
15	0.105	B4	22	46.667	15	31.111	-0.107	W4	22	46.667	6	11.111
16	0.104	B5	22	46.667	20	42.222	-0.107	W5	12	24.444	3	4.444
17	0.103	B6	20	42.222	31	66.667	-0.104	W6	21	44.444	19	40.000
18	0.103	B7	7	13.333	22	46.667	-0.101	W7	24	51.111	18	37.778
19	0.101	B8	16	33.333	6	11.111	-0.099	W8	7	13.333	9	17.778
20	0.099	B9	11	22.222	26	55.555	-0.094	W9	6	11.111	18	37.778
21	0.098	C0	28	60.000	25	53.333	-0.094	X0	26	55.555	8	15.556
22	0.098	C1	20	42.222	6	11.111	-0.092	X1	16	33.333	12	24.444
23	0.096	C2	32	68.889	27	57.778	-0.089	X2	15	31.111	2	2.222
24	0.094	C3	15	31.111	10	20.000	-0.086	X3	9	17.778	8	15.556
25	0.092	C4	29	62.222	21	44.444	-0.084	X4	17	35.556	8	15.556
26	0.090	C5	20	42.222	4	6.667	-0.083	X5	6	11.111	11	22.222
27	0.089	C6	3	4.444	5	8.889	-0.078	X6	11	22.222	9	17.778
28	0.087	C7	26	55.555	2	2.222	-0.077	X7	18	37.778	6	11.111
29	0.084	C8	15	31.111	18	37.778	-0.076	X8	5	8.889	25	53.333
30	0.082	C9	25	53.333	12	24.444	-0.076	X9	31	66.667	13	26.667
31	0.074	D0	8	15.556	11	22.222	-0.074	Y0	27	57.778	23	48.889
32	0.071	D1	10	20.000	7	13.333	-0.074	Y1	24	51.111	10	20.000
33	0.070	D2	32	68.889	15	31.111	-0.071	Y2	25	53.333	30	64.444
34	0.069	D3	11	22.222	12	24.444	-0.071	Y3	6	11.111	23	48.889
35	0.067	D4	18	37.778	15	31.111	-0.071	Y4	31	66.667	19	40.000
36	0.067	D5	12	24.444	5	8.889	-0.070	Y5	8	15.556	12	24.444
37	0.066	D6	14	28.889	12	24.444	-0.069	Y6	7	13.333	3	4.444
38	0.065	D7	20	42.222	17	35.556	-0.066	Y7	12	24.444	17	35.556
39	0.065	D8	3	4.444	15	31.111	-0.066	Y8	26	55.555	14	28.889
40	0.065	D9	9	17.778	14	28.889	-0.064	Y9	17	35.556	25	53.333
41	0.065	E0	25	53.333	21	44.444	-0.063	Z0	5	8.889	15	31.111
42	0.064	E1	21	44.444	2	2.222	-0.061	Z1	30	64.444	25	53.333
43	0.064	E2	32	68.889	24	51.111	-0.060	Z2	22	46.667	8	15.556
44	0.063	E3	4	6.667	2	2.222	-0.058	Z3	8	15.556	27	57.778
45	0.062	E4	29	62.222	6	11.111	-0.058	Z4	17	35.556	17	35.556
46	0.062	E5	29	62.222	18	37.778	-0.057	Z5	12	24.444	14	28.889
47	0.061	E6	32	68.889	21	44.444	-0.056	Z6	29	62.222	27	57.778
48	0.061	E7	3	4.444	24	51.111	-0.056	Z7	9	17.778	2	2.222
49	0.060	E8	7	13.333	26	55.555	-0.055	Z8	10	20.000	20	42.222
50	0.060	E9	3	4.444	18	37.778	-0.055	Z9	5	8.889	5	8.889

Tabelle 8 zum Differenzbild (Abb. 7c)

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	0.235	A0	18	37.778	27	57.778	-0.227	VO	32	68.889	8	15.556
2	0.209	A1	19	40.000	25	53.333	-0.221	V1	14	28.889	25	53.333
3	0.196	A2	25	53.333	26	55.555	-0.193	V2	8	15.556	15	31.111
4	0.187	A3	6	11.111	16	33.333	-0.190	V3	31	66.667	28	60.000
5	0.185	A4	25	53.333	11	22.222	-0.163	V4	27	57.778	27	57.778
6	0.179	A5	7	13.333	13	26.667	-0.161	V5	16	33.333	18	37.778
7	0.166	A6	10	20.000	9	17.778	-0.157	V6	31	66.667	25	53.333
8	0.166	A7	24	51.111	3	4.444	-0.157	V7	17	35.555	23	48.889
9	0.165	A8	29	62.222	8	15.556	-0.149	V8	14	28.889	21	44.444
10	0.162	A9	22	46.667	20	42.222	-0.147	V9	31	66.667	20	42.222
11	0.159	B0	26	60.000	16	33.333	-0.146	W0	18	37.778	3	4.444
12	0.156	B1	15	31.111	31	66.667	-0.144	W1	25	53.333	31	66.667
13	0.155	B2	30	64.444	6	11.111	-0.141	W2	20	42.222	6	11.111
14	0.153	B3	23	48.889	29	62.222	-0.139	W3	20	42.222	16	37.778
15	0.147	B4	26	55.555	18	37.778	-0.138	W4	30	64.444	30	64.444
16	0.140	B5	15	31.111	4	6.667	-0.132	W5	20	42.222	31	66.667
17	0.136	B6	17	35.556	20	42.222	-0.131	W6	12	24.444	30	64.444
18	0.129	B7	6	11.111	22	46.667	-0.126	W7	31	66.667	10	20.000
19	0.128	B8	7	13.333	5	8.889	-0.122	W8	21	44.444	4	6.667
20	0.128	B9	10	20.000	17	35.556	-0.120	W9	21	44.444	27	57.778
21	0.125	C0	4	6.667	27	57.778	-0.117	X0	3	4.444	25	53.333
22	0.123	C1	10	20.000	25	53.333	-0.115	X1	27	57.778	13	26.667
23	0.123	C2	25	53.333	20	42.222	-0.115	X2	9	17.778	7	13.333
24	0.123	C3	25	53.333	7	13.333	-0.113	X3	14	28.889	3	4.444
25	0.119	C4	11	22.222	7	13.333	-0.113	X4	3	4.444	30	64.444
26	0.112	C5	13	26.667	17	35.556	-0.112	X5	9	17.778	29	62.222
27	0.112	C6	14	28.889	14	28.889	-0.111	X6	9	17.778	29	48.889
28	0.106	C7	11	22.222	31	66.667	-0.111	X7	14	28.889	13	26.667
29	0.103	C8	23	48.889	15	31.111	-0.110	X8	12	24.444	8	15.556
30	0.101	C9	20	42.222	2	2.222	-0.108	X9	13	26.667	28	60.000
31	0.099	D0	6	15.556	21	44.444	-0.105	Y0	11	22.222	12	24.444
32	0.097	D1	29	62.222	3	4.444	-0.101	Y1	7	13.333	24	51.111
33	0.095	D2	18	37.778	30	64.444	-0.100	Y2	19	40.000	8	15.556
34	0.093	D3	14	28.889	10	20.000	-0.099	Y3	27	57.778	22	46.667
35	0.088	D4	5	8.889	24	51.111	-0.097	Y4	32	68.889	18	37.778
36	0.079	D5	12	24.444	19	40.000	-0.095	Y5	4	6.667	14	28.889
37	0.076	D6	11	22.222	23	48.889	-0.094	Y6	22	46.667	14	28.889
38	0.075	D7	28	60.000	29	62.222	-0.092	Y7	6	11.111	29	62.222
39	0.075	D8	19	40.000	4	6.667	-0.092	Y8	31	66.667	12	24.444
40	0.071	D9	2	2.222	28	60.000	-0.090	Y9	7	13.333	19	40.000
41	0.071	E0	29	62.222	26	55.555	-0.089	Z0	23	48.889	9	17.778
42	0.069	E1	32	68.889	30	64.444	-0.087	Z1	2	2.222	8	15.556
43	0.068	E2	23	48.889	18	37.778	-0.086	Z2	16	33.333	11	22.222
44	0.067	E3	18	37.778	6	11.111	-0.086	Z3	2	2.222	16	33.333
45	0.066	E4	29	62.222	23	48.889	-0.083	Z4	27	57.778	2	2.222
46	0.066	E5	23	48.889	6	11.111	-0.082	Z5	17	35.556	7	13.333
47	0.064	E6	4	6.667	3	4.444	-0.076	Z6	28	60.000	25	53.333
48	0.064	E7	6	11.111	7	13.333	-0.073	Z7	4	6.667	12	24.444
49	0.062	E8	15	31.111	22	48.667	-0.064	Z8	5	8.889	31	66.667
50	0.062	E9	2	2.222	23	46.889	-0.062	Z9	9	17.778	3	4.444

Tabelle 9 zum rekonstruierten Differenzbild (Abb. 7d)

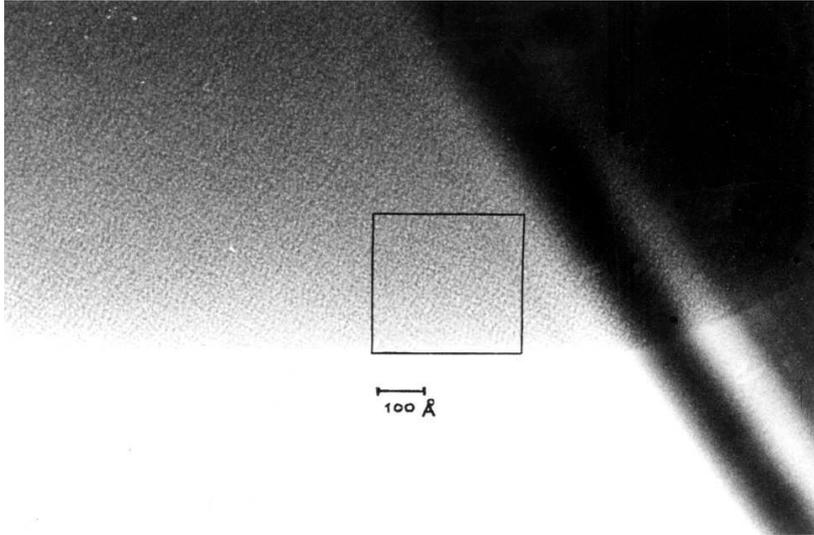
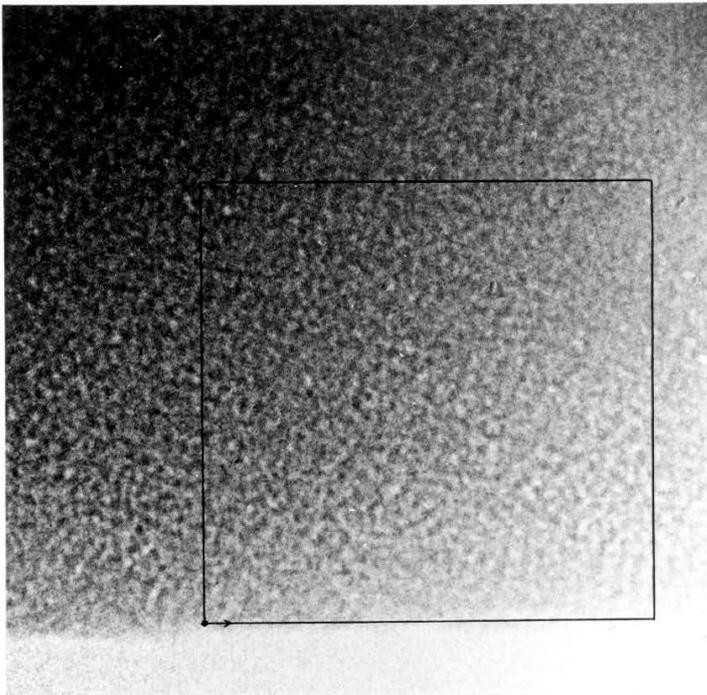


Abbildung 9: Aufnahme einer Graphitlamelle;
Lage des photometrierten Randbereichs.
Startpunkt links unten
Vergrößerte Darstellung s. Abb. 10, A15

1



100 Å

2

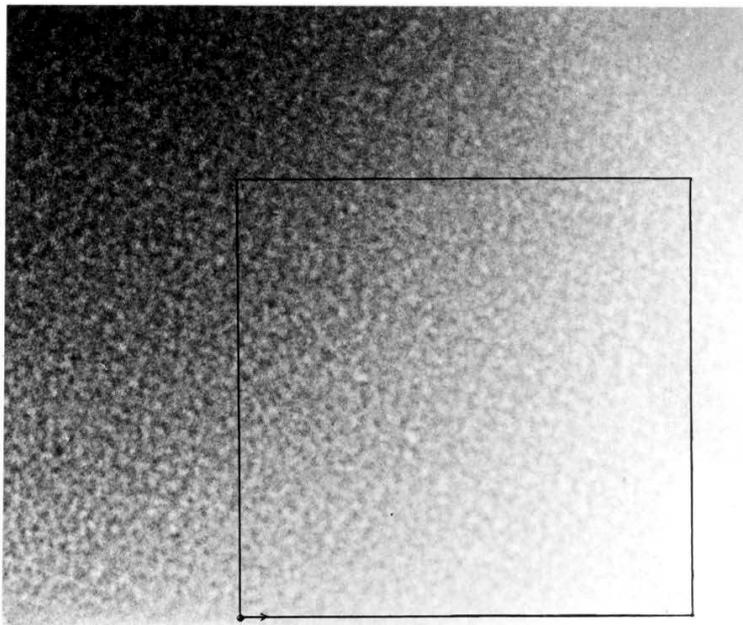


Abbildung 10: Graphitfolie, photometrierter Bereich von zwei Aufnahmen. Startpunkt und Abtastrichtung der 1. Zeile sind eingezeichnet. Meßpunktabstand $20 \mu\text{m} = 1,1 \text{ \AA}$. Differenzanalyse: $72 \times 72 \text{ \AA}$ großer Teilbereich links unten.

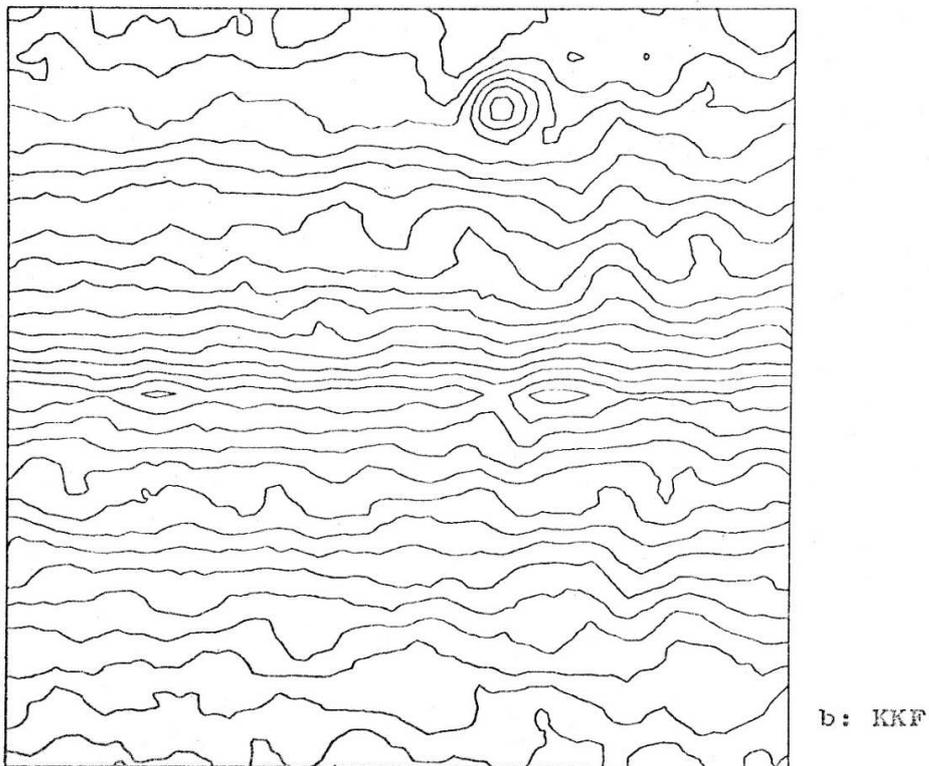
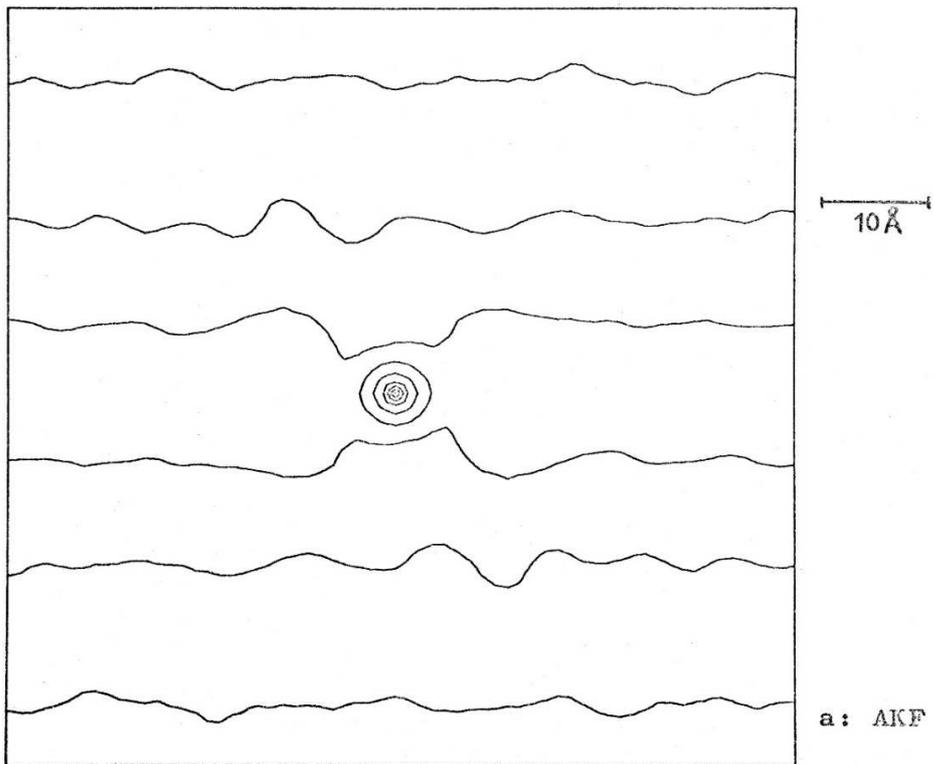


Abbildung 11 a,b: Graphitfolie; Korrelationsfunktionen ($72 \times 72 \text{ \AA}$ großer Teilbereich).
 Höhenschichtlinien:
 a) Abstand $0,006$, von $0,0$ bis $0,03$
 b) Abstand $0,001$, von $0,147$ bis $0,166$

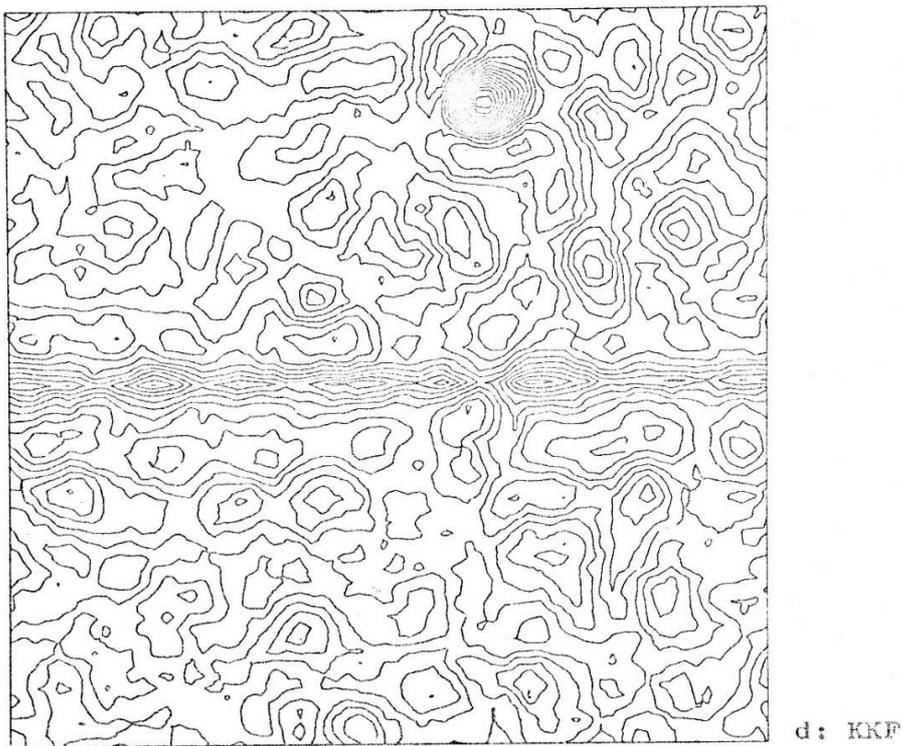
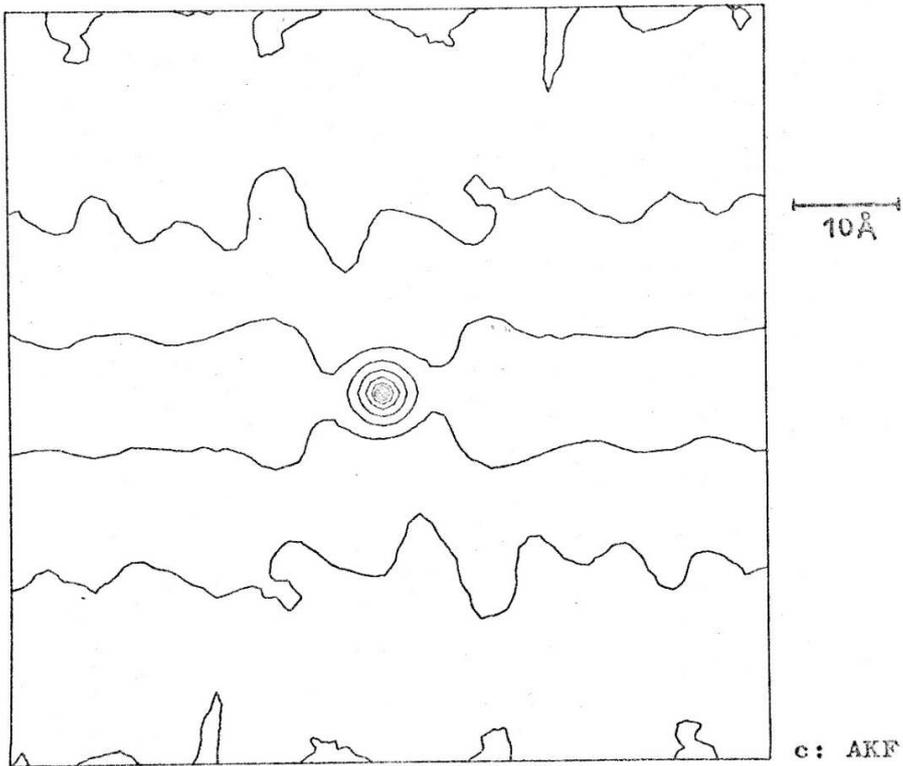


Abbildung 11 c,d: Graphitfolie; Korrelationsfunktion
 (Ausschnitte) nach Modifizierung der Korrelationsspektren.
 Höhenschichtlinien:
 c) Abstand 0,003, von -0,001 bis 0,026
 d) Abstand 0,0003, von 0,1519 bis 0,1570

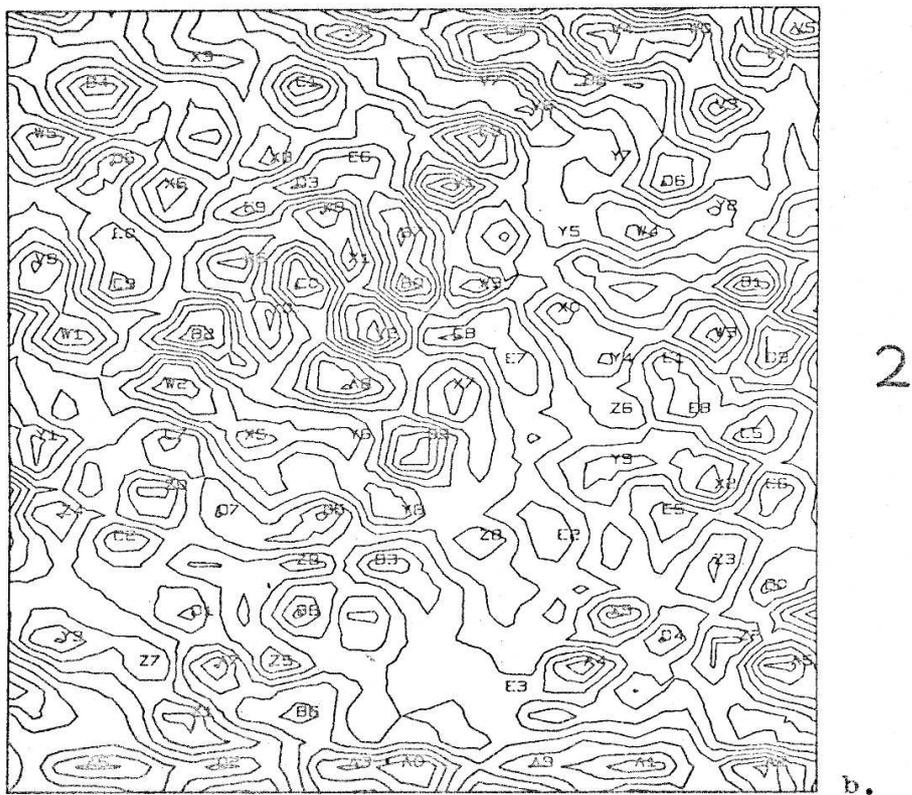
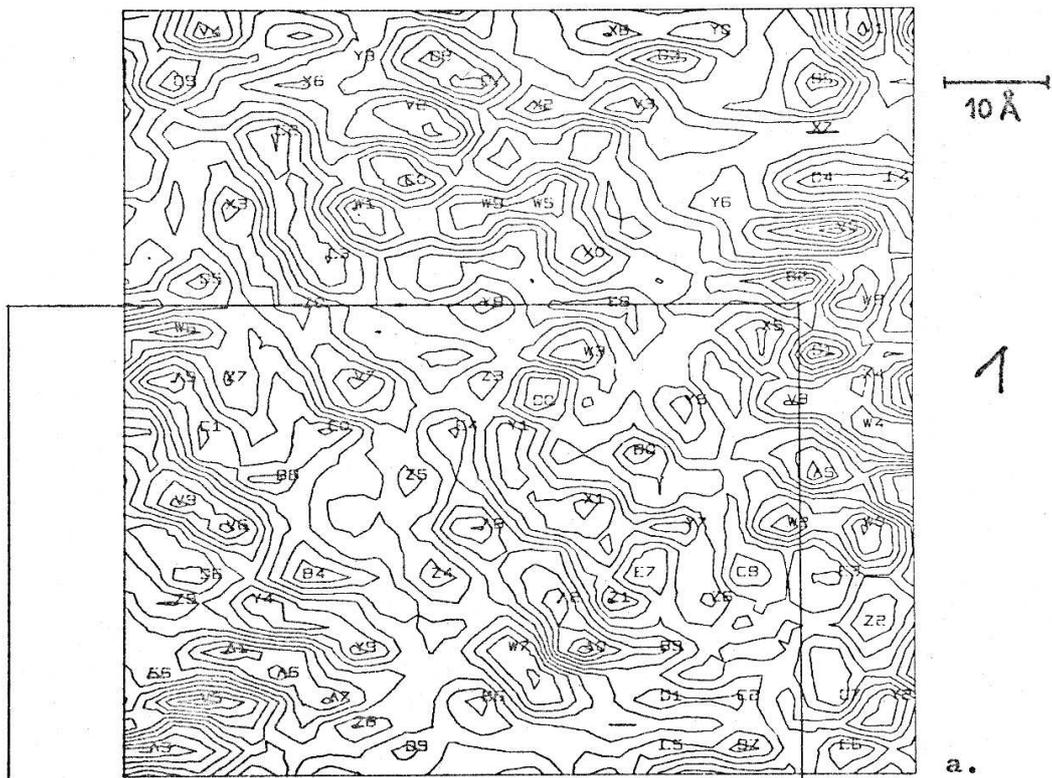


Abbildung 12 a,b: Graphitfolie; Einzelbilder.
 Rahmen in 1 gibt die relative Lage von 2 an.
 Höhenschichtlinien: Abstand 0,03
 a) von -0,49 bis -0,04 b) von -0,43 bis -0,07

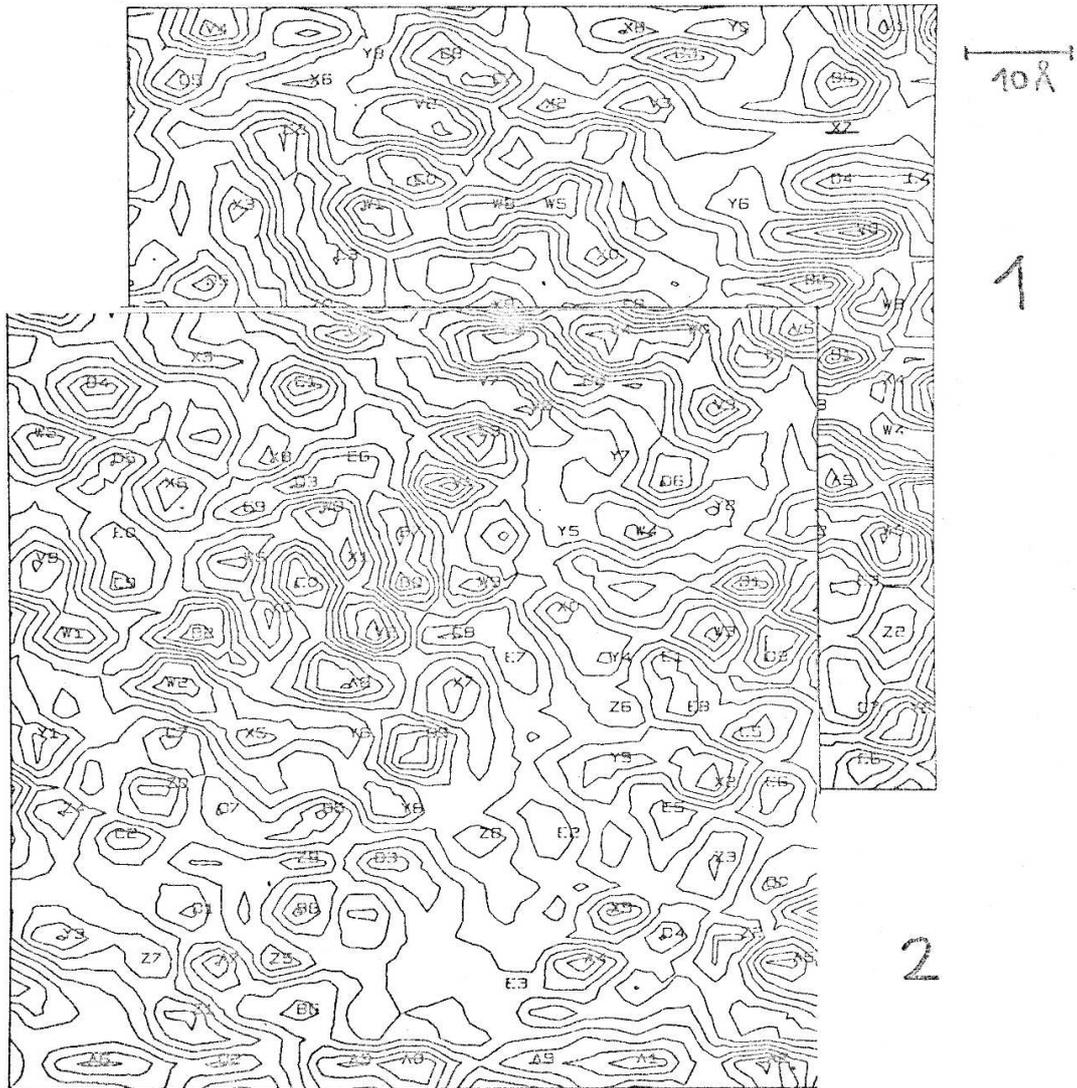
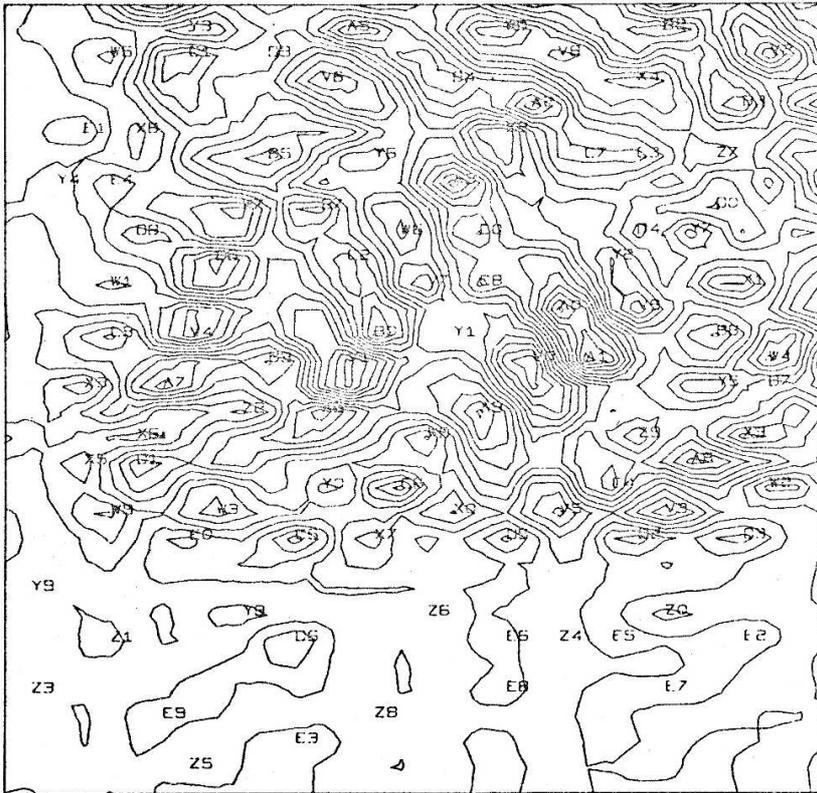


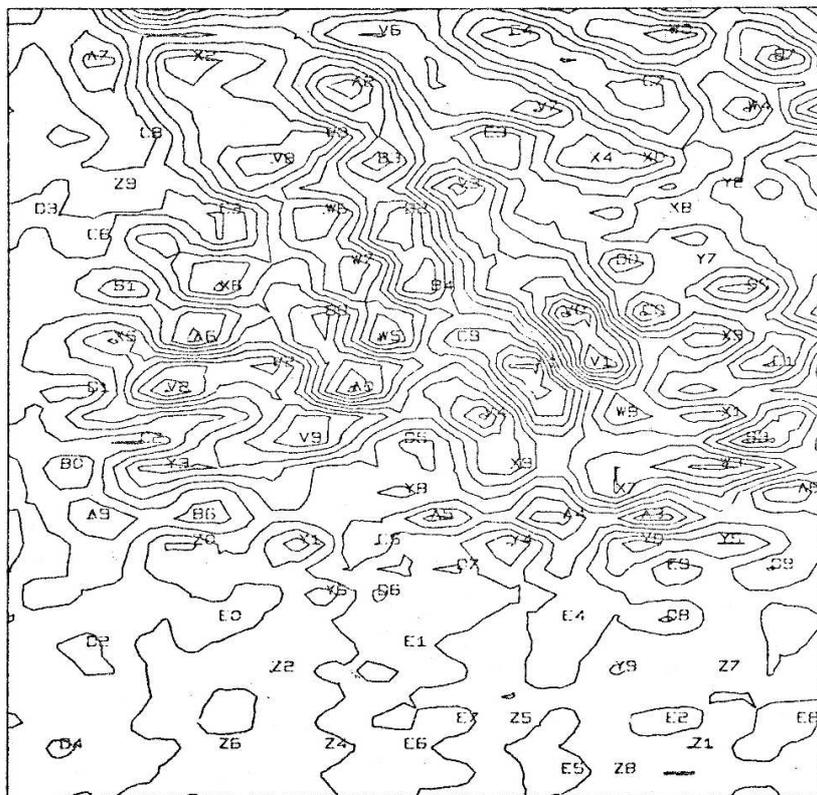
Abbildung 12 c: Graphitfolie;
 Bild 2 in richtiger Lage zu Bild 1.
 Höhengichtlinien wie in 12 a,b.



10 Å



d.



R

e.

Abbildung 12 d,e: Graphitfolie;
 Differenzbild (Δ) und rekonstruiertes Differenzbild (R)
 Höhenschichtlinien:
 d) Abstand 0,03, von -0,13 bis 0,26
 e) Abstand 0,04, von -0,01 bis 0,47

Graphitfolie / Lagen und Werte der relativen Extrema

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	-0.051	A0	19	40.000	6	11.111	-0.482	V0	29	62.222	23	48.889
2	-0.093	A1	5	8.889	6	11.111	-0.444	V1	30	64.444	31	60.667
3	-0.098	A2	18	37.778	8	15.556	-0.417	V2	12	24.444	28	60.000
4	-0.098	A3	2	2.222	2	2.222	-0.394	V3	21	44.444	28	60.000
5	-0.104	A4	32	68.889	12	24.444	-0.390	V4	4	6.667	31	66.667
6	-0.112	A5	28	60.000	13	26.667	-0.388	V5	4	6.667	4	6.667
7	-0.118	A6	7	13.333	5	8.889	-0.386	V6	5	8.889	11	22.222
8	-0.121	A7	9	17.778	4	6.667	-0.383	V7	10	20.000	17	35.556
9	-0.126	A8	15	31.111	11	22.222	-0.382	V8	27	57.776	16	33.333
10	-0.127	A9	3	4.444	17	35.556	-0.381	V9	3	4.444	12	24.444
11	-0.131	B0	21	44.444	14	28.889	-0.378	W0	3	64.444	11	22.222
12	-0.132	B1	28	60.000	18	37.778	-0.374	W1	10	20.000	24	51.111
13	-0.133	B2	27	57.778	21	44.444	-0.371	W2	27	57.778	11	22.222
14	-0.133	B3	32	68.889	5	8.889	-0.369	W3	19	40.000	18	37.778
15	-0.138	B4	8	15.556	9	17.778	-0.369	W4	30	64.444	15	31.111
16	-0.146	B5	28	60.000	29	62.222	-0.368	W5	17	35.556	24	51.111
17	-0.146	B6	15	31.111	4	6.667	-0.365	W6	3	4.444	19	40.000
18	-0.147	B7	25	53.333	2	2.222	-0.364	W7	16	33.333	6	11.111
19	-0.149	B8	7	13.333	13	26.667	-0.363	W8	30	64.444	20	42.222
20	-0.149	B9	22	46.667	6	11.111	-0.360	W9	15	31.111	24	51.111
21	-0.151	C0	9	17.778	15	31.111	-0.357	X0	19	40.000	22	46.667
22	-0.153	C1	4	6.667	15	31.111	-0.355	X1	19	40.000	12	24.444
23	-0.155	C2	7	13.333	27	57.778	-0.354	X2	17	35.556	28	50.000
24	-0.156	C3	9	17.778	22	46.667	-0.352	X3	5	8.889	24	51.111
25	-0.158	C4	31	66.667	25	53.333	-0.352	X4	30	64.444	17	35.556
26	-0.158	C5	22	46.667	2	2.222	-0.349	X5	26	55.555	19	40.000
27	-0.159	C6	29	62.222	2	2.222	-0.349	X6	8	15.556	29	62.222
28	-0.160	C7	29	62.222	4	6.667	-0.345	X7	28	60.000	27	57.778
29	-0.163	C8	25	53.333	9	17.778	-0.344	X8	20	42.222	31	66.667
30	-0.164	C9	3	4.444	29	62.222	-0.344	X9	32	68.889	29	62.222
31	-0.165	D0	17	35.556	16	33.333	-0.340	Y0	24	51.111	31	66.667
32	-0.165	D1	22	46.667	4	6.667	-0.339	Y1	16	33.333	15	31.111
33	-0.166	D2	32	68.889	17	35.556	-0.336	Y2	31	66.667	4	6.667
34	-0.167	D3	22	46.667	30	64.444	-0.335	Y3	10	20.000	30	64.444
35	-0.168	D4	28	60.000	25	53.333	-0.335	Y4	6	11.111	8	15.556
36	-0.171	D5	4	6.667	21	44.444	-0.334	Y5	23	48.889	15	33.333
37	-0.171	D6	4	6.667	9	17.778	-0.330	Y6	24	51.111	24	51.111
38	-0.172	D7	15	31.111	29	62.222	-0.329	Y7	23	48.889	11	22.222
39	-0.176	D8	13	26.667	30	64.444	-0.323	Y8	15	31.111	20	42.222
40	-0.176	D9	12	24.444	2	2.222	-0.322	Y9	10	20.000	6	11.111
41	-0.177	E0	12	24.444	25	53.333	-0.320	Z0	8	15.556	20	42.222
42	-0.178	E1	32	68.889	31	66.667	-0.317	Z1	20	42.222	8	15.556
43	-0.178	E2	25	53.333	4	6.667	-0.311	Z2	30	64.444	7	13.333
44	-0.182	E3	29	62.222	9	17.778	-0.308	Z3	15	31.111	17	35.556
45	-0.182	E4	14	28.889	15	31.111	-0.302	Z4	13	26.667	9	17.778
46	-0.183	E5	32	68.889	20	42.222	-0.294	Z5	12	24.444	13	26.667
47	-0.187	E6	2	2.222	5	8.889	-0.290	Z6	24	51.111	8	15.556
48	-0.190	E7	21	44.444	9	17.778	-0.285	Z7	5	8.889	17	35.556
49	-0.190	E8	20	42.222	20	42.222	-0.285	Z8	10	20.000	3	4.444
50	-0.191	E9	32	68.889	9	17.778	-0.284	Z9	3	4.444	8	15.556

Tabelle 10 zu Bild 1 (Abb. 12 a)

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	-0.041	A0	16	33.333	2	2.222	-0.434	V0	14	28.889	31	66.667
2	-0.043	A1	25	53.333	2	2.222	-0.422	V1	18	37.778	25	53.333
3	-0.061	A2	30	64.444	2	2.222	-0.398	V2	15	31.111	19	40.000
4	-0.062	A3	14	28.889	2	2.222	-0.395	V3	28	60.000	28	60.000
5	-0.070	A4	23	48.889	6	11.111	-0.385	V4	24	51.111	31	66.667
6	-0.086	A5	31	66.667	6	11.111	-0.381	V5	31	66.667	31	66.667
7	-0.092	A6	4	6.667	2	2.222	-0.380	V6	21	44.444	28	60.000
8	-0.093	A7	9	17.778	6	11.111	-0.378	V7	19	40.000	29	62.222
9	-0.093	A8	14	28.889	17	35.556	-0.377	V8	2	2.222	22	46.667
10	-0.098	A9	21	44.444	2	2.222	-0.373	V9	32	68.889	24	51.111
11	-0.105	B0	16	33.333	21	44.444	-0.368	W0	27	57.778	31	66.667
12	-0.106	B1	29	62.222	21	44.444	-0.362	W1	3	4.444	19	40.000
13	-0.109	B2	8	15.556	19	40.000	-0.361	W2	7	13.333	17	35.556
14	-0.109	B3	15	31.111	10	20.000	-0.358	W3	28	60.000	19	40.000
15	-0.115	B4	4	6.667	29	62.222	-0.357	W4	25	53.333	23	35.556
16	-0.117	B5	13	26.667	12	24.444	-0.355	W5	2	2.222	27	40.000
17	-0.118	B6	12	24.444	4	6.667	-0.353	W6	10	20.000	22	46.667
18	-0.119	B7	16	33.333	23	48.889	-0.346	W7	32	68.889	20	42.222
19	-0.120	B8	12	24.444	8	15.556	-0.345	W8	13	26.667	24	51.111
20	-0.122	B9	17	35.556	15	31.111	-0.340	W9	19	40.000	21	44.444
21	-0.126	C0	12	24.444	21	44.444	-0.340	X0	22	46.667	20	42.222
22	-0.131	C1	12	24.444	29	62.222	-0.335	X1	14	28.889	22	46.667
23	-0.134	C2	5	8.889	11	22.222	-0.333	X2	28	60.000	13	26.667
24	-0.136	C3	19	40.000	27	57.778	-0.332	X3	8	15.556	30	64.444
25	-0.140	C4	20	42.222	31	66.667	-0.331	X4	32	68.889	8	15.556
26	-0.141	C5	29	62.222	15	31.111	-0.330	X5	10	20.000	15	31.111
27	-0.143	C6	30	64.444	13	26.667	-0.328	X6	7	13.333	25	53.333
28	-0.148	C7	7	13.333	5	31.111	-0.327	X7	18	37.778	17	35.556
29	-0.149	C8	18	37.778	19	40.000	-0.324	X8	11	22.222	26	55.555
30	-0.149	C9	5	8.889	21	44.444	-0.323	X9	24	51.111	8	15.556
31	-0.149	D0	30	64.444	9	17.776	-0.322	Y0	11	22.222	20	42.222
32	-0.150	D1	8	15.556	8	15.556	-0.321	Y1	2	2.222	15	31.111
33	-0.150	D2	9	17.778	2	2.222	-0.321	Y2	28	60.000	24	51.111
34	-0.152	D3	12	24.444	25	53.333	-0.315	Y3	3	4.444	7	13.333
35	-0.154	D4	26	55.555	7	13.333	-0.315	Y4	24	51.111	18	37.778
36	-0.154	D5	5	8.889	26	55.555	-0.309	Y5	22	46.667	23	48.889
37	-0.156	D6	26	55.555	25	53.333	-0.305	Y6	14	28.889	15	31.111
38	-0.156	D7	9	17.778	12	24.444	-0.302	Y7	24	51.111	26	55.555
39	-0.157	D8	23	48.889	29	62.222	-0.301	Y8	16	33.333	12	24.444
40	-0.158	D9	30	64.444	18	37.778	-0.298	Y9	24	51.111	14	28.889
41	-0.160	E0	5	8.889	23	48.889	-0.290	Z0	7	13.333	13	26.667
42	-0.160	E1	26	55.555	28	37.778	-0.289	Z1	8	15.556	4	6.667
43	-0.160	E2	22	46.667	11	22.222	-0.289	Z2	29	62.222	7	13.333
44	-0.162	E3	20	42.222	5	8.889	-0.288	Z3	28	60.000	10	20.000
45	-0.167	E4	30	64.444	30	64.444	-0.284	Z4	3	4.444	12	24.444
46	-0.169	E5	26	55.555	12	24.444	-0.283	Z5	11	22.222	6	11.111
47	-0.170	E6	14	28.889	26	55.555	-0.280	Z6	24	51.111	16	33.333
48	-0.171	E7	20	42.222	18	37.778	-0.279	Z7	6	11.111	6	11.111
49	-0.172	E8	27	57.778	16	53.333	-0.278	Z8	19	40.000	11	22.222
50	-0.173	E9	10	20.000	24	51.111	-0.274	Z9	12	24.444	10	20.000

Tabelle 11 zu Bild 2 (Abb. 12 b)

Graphitfolie / Lagen und Werte der relativen Extrema

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	0.272	A0	22	46.667	20	42.222	-0.155	V0	21	44.444	18	37.778
2	0.270	A1	23	48.889	18	37.778	-0.142	V1	14	28.889	18	37.778
3	0.225	A2	21	44.444	28	60.000	-0.128	V2	30	64.444	30	64.444
4	0.220	A3	16	37.778	25	53.333	-0.127	V3	26	55.555	12	24.444
5	0.207	A4	32	68.889	25	53.333	-0.115	V4	8	15.556	19	40.000
6	0.199	A5	14	28.889	31	66.667	-0.110	V5	22	46.667	12	24.444
7	0.192	A6	13	26.667	16	33.333	-0.100	V6	13	26.667	29	62.222
8	0.185	A7	7	13.333	17	35.556	-0.099	V7	17	35.556	21	44.444
9	0.183	A8	27	57.778	14	28.889	-0.098	V8	22	46.667	30	64.444
10	0.178	A9	19	40.000	16	33.333	-0.096	V9	25	53.333	20	42.222
11	0.176	B0	15	31.111	19	40.000	-0.096	W0	20	42.222	31	66.667
12	0.171	B1	32	68.889	20	42.222	-0.085	W1	5	8.889	21	44.444
13	0.170	B2	26	55.555	31	66.667	-0.084	W2	30	64.444	13	28.667
14	0.169	B3	29	62.222	28	60.000	-0.082	W3	9	17.778	12	24.444
15	0.166	B4	18	37.776	29	62.222	-0.080	W4	30	64.444	18	37.778
16	0.157	B5	11	22.222	26	55.555	-0.080	W5	5	8.889	30	64.444
17	0.154	B6	9	17.776	22	46.667	-0.080	W6	16	33.333	23	48.889
18	0.151	B7	13	26.667	24	51.111	-0.079	W7	10	20.000	24	51.111
19	0.147	B8	28	60.000	19	40.000	-0.076	W8	17	35.556	15	31.111
20	0.145	B9	11	22.222	18	37.778	-0.075	W9	5	8.889	12	24.444
21	0.144	C0	19	40.000	23	40.000	-0.074	X0	18	37.778	12	24.444
22	0.138	C1	8	15.556	30	64.444	-0.074	X1	29	62.222	21	44.444
23	0.129	C2	14	28.889	22	46.667	-0.068	X2	20	42.222	27	57.778
24	0.128	C3	25	53.333	26	55.555	-0.063	X3	4	6.667	17	35.556
25	0.128	C4	24	91.111	13	26.667	-0.058	X4	25	42.222	29	62.222
26	0.126	C5	12	24.444	11	22.222	-0.058	X5	4	6.667	14	28.889
27	0.123	C6	16	33.333	13	26.667	-0.055	X6	6	11.111	15	31.111
28	0.122	C7	23	48.889	26	55.555	-0.055	X7	15	31.111	11	22.222
29	0.119	C8	19	40.000	21	44.444	-0.055	X8	6	11.111	27	57.778
30	0.119	C9	5	8.889	19	40.000	-0.054	X9	29	62.222	15	31.111
31	0.114	D0	28	60.000	24	51.111	-0.049	Y0	13	26.667	13	26.667
32	0.104	D1	6	11.111	14	28.889	-0.046	Y1	18	37.778	19	40.000
33	0.096	D2	25	53.333	11	22.222	-0.043	Y2	24	51.111	22	46.667
34	0.094	D3	29	62.222	11	22.222	-0.041	Y3	8	15.556	31	66.667
35	0.091	D4	25	53.333	23	48.889	-0.039	Y4	3	4.444	25	53.333
36	0.090	D5	20	42.222	11	22.222	-0.038	Y5	28	60.000	17	35.556
37	0.080	D6	12	24.444	7	13.333	-0.034	Y6	15	31.111	26	55.555
38	0.080	D7	30	64.444	17	35.556	-0.026	Y7	27	57.778	23	48.889
39	0.072	D8	6	11.111	23	48.889	-0.021	Y8	10	20.000	8	15.556
40	0.069	D9	11	22.222	30	64.444	-0.020	Y9	2	2.222	9	13.333
41	0.059	E0	8	15.556	11	22.222	-0.020	Z0	26	55.555	8	33.333
42	0.050	E1	4	6.667	27	57.776	-0.020	Z1	5	8.889	7	8.889
43	0.048	E2	29	62.222	7	13.333	-0.017	Z2	10	20.000	16	33.333
44	0.045	E3	12	24.444	3	4.444	-0.017	Z3	2	2.222	5	8.889
45	0.045	E4	5	8.889	25	53.333	-0.009	Z4	22	46.667	7	13.333
46	0.037	E5	24	51.111	7	13.333	-0.009	Z5	8	15.556	2	2.222
47	0.037	E6	20	42.222	7	13.333	-0.009	Z6	17	35.556	8	15.556
48	0.037	E7	26	55.555	5	8.889	-0.009	Z7	28	60.000	26	55.555
49	0.036	E8	20	42.222	5	8.889	-0.008	Z8	15	31.111	4	6.667
50	0.036	E9	7	13.333	4	6.667	-0.007	Z9	25	53.333	15	31.111

Tabelle 12 zum Differenzbild (Abb. 12 d)

No.	REL.MAX	SYMBOL	K	AE	I	AE	REL.MIN.	SYMBOL	K	AE	I	AE
1	0.483	A0	14	28.889	17	35.556	-0.024	VO	22	46.667	20	42.222
2	0.480	A1	21	44.444	18	37.778	-0.011	V1	23	48.889	18	37.778
3	0.470	A2	14	28.889	29	62.222	0.064	V2	7	13.333	17	35.556
4	0.450	A3	25	53.333	12	24.444	0.088	V3	18	37.778	25	53.333
5	0.450	A4	22	46.667	12	24.444	0.095	V4	19	40.000	16	33.333
6	0.446	A5	17	35.556	12	24.444	0.097	V5	32	68.889	25	53.333
7	0.446	A6	8	15.556	19	40.000	0.100	V6	15	31.111	31	66.667
8	0.443	A7	4	6.667	30	64.444	0.103	V7	21	44.444	28	60.000
9	0.432	A8	31	66.667	13	26.667	0.109	V8	11	22.222	26	55.555
10	0.431	A9	4	6.667	12	24.444	0.118	V9	12	24.444	15	31.111
11	0.430	B0	3	4.444	14	28.889	0.121	W0	26	55.555	31	66.667
12	0.424	B1	5	8.889	21	44.444	0.121	W1	32	68.889	20	42.222
13	0.423	B2	16	33.333	24	51.111	0.132	W2	11	22.222	18	37.778
14	0.419	B3	15	31.111	26	55.555	0.137	W3	28	60.000	14	28.889
15	0.414	B4	17	35.556	21	44.444	0.140	W4	29	62.222	28	60.000
16	0.412	B5	29	62.222	21	44.444	0.146	W5	15	31.111	19	40.000
17	0.410	B6	8	15.556	12	24.444	0.147	W6	13	26.667	24	51.111
18	0.408	B7	30	64.444	30	64.444	0.151	W7	14	28.889	22	46.667
19	0.406	B8	13	26.667	20	42.222	0.152	W8	24	51.111	16	33.333
20	0.404	B9	29	62.222	15	31.111	0.156	W9	13	26.667	27	57.778
21	0.402	C0	25	53.333	20	42.222	0.159	X0	25	53.333	26	55.555
22	0.399	C1	30	64.444	18	37.778	0.161	X1	28	60.000	16	33.333
23	0.397	C2	6	11.111	15	31.111	0.162	X2	8	15.556	30	64.444
24	0.397	C3	9	17.778	24	51.111	0.162	X3	28	60.000	19	40.000
25	0.392	C4	20	42.222	31	66.667	0.166	X4	23	48.889	26	55.555
26	0.391	C5	15	31.111	11	22.222	0.181	X5	5	8.889	19	40.000
27	0.388	C6	4	6.667	23	48.889	0.183	X6	9	17.778	21	44.444
28	0.387	C7	25	53.333	29	62.222	0.188	X7	24	51.111	13	26.667
29	0.385	C8	6	11.111	27	57.778	0.192	X8	26	55.555	24	51.111
30	0.385	C9	18	37.778	19	40.000	0.201	X9	20	42.222	14	28.889
31	0.384	D0	24	51.111	22	46.667	0.201	Y0	25	53.333	11	22.222
32	0.374	D1	4	6.667	17	35.556	0.202	Y1	12	24.444	11	22.222
33	0.365	D2	4	6.667	7	13.333	0.207	Y2	28	60.000	25	53.333
34	0.364	D3	2	2.222	24	51.111	0.210	Y3	7	13.333	14	28.889
35	0.363	D4	3	4.444	3	4.444	0.223	Y4	20	42.222	11	22.222
36	0.360	D5	16	33.333	15	31.111	0.228	Y5	28	60.000	11	22.222
37	0.360	D6	15	31.111	9	17.778	0.245	Y6	13	26.667	9	17.778
38	0.359	D7	18	37.778	10	20.000	0.245	Y7	27	57.778	22	46.667
39	0.358	D8	26	55.555	8	15.556	0.247	Y8	16	33.333	13	26.667
40	0.354	D9	30	64.444	10	20.000	0.264	Y9	24	51.111	6	11.111
41	0.348	E0	9	17.778	8	15.556	0.265	Z0	8	15.556	11	22.222
42	0.348	E1	16	33.333	7	13.333	0.269	Z1	27	57.778	3	4.444
43	0.346	E2	26	55.555	4	6.667	0.269	Z2	11	22.222	6	11.111
44	0.346	E3	19	40.000	27	57.778	0.274	Z3	32	68.889	6	11.111
45	0.346	E4	22	46.667	8	15.556	0.275	Z4	13	26.667	3	4.444
46	0.345	E5	22	46.667	2	2.222	0.278	Z5	20	42.222	4	6.667
47	0.341	E6	16	33.333	3	4.444	0.279	Z6	9	17.778	3	4.444
48	0.341	E7	18	37.778	4	6.667	0.280	Z7	28	60.000	6	11.111
49	0.339	E8	31	66.667	4	6.667	0.280	Z8	24	51.111	2	2.222
50	0.339	E9	26	55.555	10	20.000	0.282	Z9	5	6.889	25	53.333

Tabelle 13 zum rekonstruierten Differenzbild (Abb. 12 e)

Literaturverzeichnis

Abkürzungen zum Literaturverzeichnis

AOEM	Advances in Optical and Electron Microscopy, ed. Barer, Cosslett, Academic Press, London/N.Y.
BBPC	Diskussionstagung "Methoden zur Untersuchung der atomaren Struktur von biogenen Makromolekülen", veranstaltet von der Deutschen Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, Hirschegg, 15. - 17.3.1970, wird veröffentlicht in den Berichten der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, 1970.
GTÖ	Gemeinsame Tagung der Österreichischen Arbeitsgemeinschaft für Ultrastrukturforschung und der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie e.V., Wien 22. - 25.9.1969
IKE	Internationaler Kongress für Elektronenmikroskopie
JOSA	Journal of the Optical Society of America
PIO	Progress in Optics, ed. Wolf, North Holland Publishing Company, Amsterdam/London
PRSL	Discussion Meeting of the Royal Society "Electron Microscopy and its Application in Biology", London, 12. - 14.3.1970, wird veröffentlicht in den Proceedings of the Royal Society of London, 1970.
QPB	"Qualität der Photographischen Bildwiedergabe" Kolloquium der Sektion Forschung der Dt. Gesellschaft für Photographie und der Dt. Gesellschaft für Angewandte Optik. Köln, 20. - 21.3.1958.

-
- 1) D. I. de Rosier, A. Klug, *Nature* 217 (1968) 130
 - 2) A. Klug, PRSL
 - 3) E. Ruska, *Optik* 22 (1965) 319
 - 4) W. Hoppe, *Naturw.* 48 (1961) 736
 - 5) R. Langer, W. Hoppe, *Optik* 24 (1966/67) 470 (I)
 - 6) R. Langer, W. Hoppe, *Optik* 25 (1967) 413 (II)
 - 7) R. Langer, W. Hoppe, *Optik* 25 (1967) 507 (III)
 - 8) J. Frank, P. H. Bußler, R. Langer, W. Hoppe, IKE Grenoble 1970, i. Dr.

-
- 9) J. Frank, P. H. Bußler, R. Langer, W. Hoppe, BBPC
 - 10) W. Hoppe, R. Langer, J. Frank, A. Feltynowski, Naturw. 56 (1969) 267
 - 11) J. Frank, Optik 30 (1969) 171
 - 12) O. Scherzer, J. Appl. Phys. 20 (1949) 20
 - 13) R. Langer, Dissertation TH München (1967)
 - 14) F. Zernicke, Phys. Z. 36 (1935) 848
 - 15) E. Menzel, Optik 15 (1958) 460
 - 16) J. Waser, V. Shoemaker, Rev. Mod. Phys. 25 (1953) 671
 - 17) W. Hoppe, Acta Cryst., i. Dr.
 - 18) K. J. Hanszen, Z. Angew. Phys. 19 (1965) 215
 - 19) F. Thon, Z. Naturforschg. 20a (1965) 154
 - 20) J. Gjønnes, Acta Cryst., 13 (1960) 54
 - 21) F. Thon, Dissertation, Univ. Tübingen
 - 22) R. C. Valentine, AOEM I (1966) 180
 - 23) H. Frieser, E. Klein, Z. Angew. Phys. 10 (1958) 337
 - 24) R. C. Valentine, N. G. Wrigley, Nature 203 (1964) 713
 - 25) R. E. Burge, D. F. Garrard, M. T. Browne, J. Sci. Instruments Ser. 2, 2 (1968) 707
 - 26) R. C. Valentine, J. Phot. Sci. 7 (1959) 66
 - 27) N. Digby, K. Firth, R. J. Hercock, J. Phot. Sci. 1 (1953) 194
 - 28) E. W. H. Selwyn, Phot. J. 75 (1935) 571
 - 29a) R. Röhler, "Informationstheorie in der Optik", Optik und Feinmechanik in Einzeldarstellungen Bd. 6 (1967) ed. N. Günther, Wiss. Verlagsgesellschaft, 171
 - 29b) 152
 - 29c) 175
 - 29d) 109
 - 29e) 184
 - 29f) 196
 - 30) D. Sayre, Acta Cryst. 4 (1951) 362 – 367
 - 31) A. Hirt, R. Langer, W. Hoppe, BBPC
 - 32) W. Hoppe, R. Langer, A. Hirt, J. Frank, IKE Grenoble (1970) i. Dr.
 - 33) W. Hoppe, Optik 29 (1969) 617
 - 34) Cl. Shannon, Bell Syst. Techn. J. 27 (1949) 379, 623
 - 35a) R. Zurmühl, Praktische Mathematik, III Aufl. 1961, Springer, 326
 - 35b) 324
 - 36) F. Lynen, Biochem. J. 102 (1967) 381

-
- 37) H. Wolter, "On Basic Analogies and Principal Differences Between Optical and Electronic Information", PIO, Vol. I (1961) 155 ff.
- 38) N. Wiener, "The Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series." J. Wiley & Sons, New York, 1949, 175
- 39) G. L. Turin, Transact. Inst. Radio Engrs. Information Theory IT-6 (1960) 180
- 40) J. W. Goodman, "Introduction to Fourier Optics", Mc Graw-Hill (1968) 178
- 41) A. J. C. Wilson, Nature 150 (1942) 152
- 42) W. Hoppe, Acta Cryst. 10 (1957) 750
- 43) W. C. T. Dowell, J. L. Farrant, R. C. Williams, VI IKE, Kyoto (1966) 635
- 44) J. R. Breedlove Jr., G. T. Trammell, Phys. Rev. Letters (1970)
- 45) D. Schulte-Frohlinde, BBPC
- 46) H. G. Heide, Z. Angew. Phys. 15 (1963) 116
- 47) H. G. Heide, Z. Angew. Phys. 17 (1964) 70, 73
- 48) A. V. Crewe, J. Wall, J. Mol. Biol. 48 (1970) 375 – 393
A. V. Crewe, PRSL; BBPC
- 49) P. Schiske, 4. Europ. Reg. Konf. El. Mikrosk. Rom 1968, Vol. I, 145
- 50) K. J. Hanszen, 4. Europ. Reg. Konf. El. Mikrosk. Rom 1968, Vol. I, 153
- 51) W. Hoppe, R. Langer, F. Thon, Optik 30 (1970) 538
- 52) D. F. Mix, Random Signal Analysis, Addison-Wesley Publishing Company (1969) 148 ff.
- 53a) M. Fisz, "Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik", VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1958, 78
- 53b) 55
- 54) vgl. J. W. Goodman, "Introduction to Fourier Optics", Mc Graw-Hill (1968)
- 55) J. L. Harris, JOSA 54 (1964) 606
- 56) E. H. Linfoot, JOSA 46 (1956) 740
- 57) siehe z.B. W. Glaser, „Grundlagen der Elektronenoptik“, Springer Verlag Wien (1952) 627 ff.
- 58) G. Toraldo di Francia, JOSA 45 (1955) 497
- 59) L. S. G. Kovasnay, A. Arman, Rev. Sci. Instr. 28 (1957) 793
- 60) J. W. Cooley and J. W. Tukey, Mathematics of Computation 19 (1965) 296
- 61) J. R. Porchet and H. H. Günthard, Journal of Physics E.: Scientific Instruments 3 (1970) 261
- 62) W. B. Davenport, JR., R. A. Johnson and D. Middleton, JOSA 23 (1952) 377
- 63) W. B. Davenport, JR. and Wl. Root, "Random Signals and Noise", Mc Graw-Hill Book Company, Inc. 1958, 76 ff.
- 64) H. Hannes, Optik 26 (1967/68) 363
- 65a) E. L. O'Neill, "Introduction to Statistical Optics", Addison-Wesley Publishing Company, N. Y. (1963) 115
- 65b) 27

-
- 66) H. Höhn, *Optik* 27 (1968) 353
- 67) J. A. Leendertz, *Journal of Physics E.: Scientific Instruments* 3 (1970) 214
- 68) R. Hosemann, S. N. Bagchi, "Direct Analysis of Diffraction by Matter", North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1962, 271, 286
- 69) Jumpei Tsujiuchi, *PIO*, Vol II (1963) Kap. IV, 133 ff.
- 70) J. L. Harris, *JOSA* 56 (1966) 569
- 71) P. Elias, D. S. Grey, D. Z. Robinson, *JOSA* 42 (1952) 127
- 72) A. Marechal, P. Croce, "Problems in Contemporary Optics" (1956) 76, Istituto Nazionale di Ottica, Firenze
- 73) D. H. Kelly, *JOSA* 51 (1961) 1095
- 74) F. Thon, B. M. Siegel, BBPC
- 75) G. Möllenstedt, R. Speidel, W. Hoppe, R. Langer, K. H. Katerbau, F. Thon, 4. Europ. Reg. Konf. El. Mikrosk. Rom 1968, Vol I, 125
- 76) K. H. Müller, *GTÖ* 34
- 77) F. Thon, *GTÖ* 72
- 78) H. G. Badde, L. Reimer, *Z. Naturf. a, i. Dr.*
- 79) E. H. Linfoot, *Optical Image Evaluation*, Focal Press, London, 198, 238
- 80) E. H. Linfoot, QPB 40
- 81) E. L. O'Neill, A. Walther, *Optica Acta* 10 (1963) 33
- 82) A. Lohmann, QPB 8
- 83) J. Weingärtner, W. Mirandé, E. Menzel, *GTÖ* 32; *Optik* 30 (1969)
- 84) L. Reimer, H. G. Heine, R. Ajeian, *Z. Naturf.* 24a (1969) 1846
- 85) R. Langer, S. u. H. Formanek, J. Frank, H. H. Martin, W. Hoppe, *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chemie* 350 (1969) 1173
- 86) S. u. H. Formanek, *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 350
- 87) Erickson, A. Klug, PRSL, BBPC
- 88) R. D. Heidenreich, VI IKE Kyoto 1966, 7
- 89) R. D. Heidenreich, *J. Appl. Cryst.* 1 (1968) 1
- 90) F. Lenz, private Mitteilung

Nachwort von Joachim Frank

Es ist schon ein seltsames Gefühl, seine Doktorarbeit nach nunmehr 50 Jahren wieder aufgelegt zu sehen. Alte Erinnerungen werden dabei geweckt: Erinnerungen an die Gesichter von Freunden und Kollegen von damals, an das Institut in der Schillerstraße, nahe der Theresienwiese, und an die ganze lebendige Atmosphäre von München – einer Stadt, die damals, lange vor der Wende, Deutschlands heimliche Hauptstadt genannt wurde.

Nach so vielen Jahren denke ich heute, wenn der Leser über das Inhaltsverzeichnis hinauskommt und durch die mit Gleichungen und Integralen gespickte Arbeit blättert, kommt ihm oder ihr sicherlich sofort die Frage in den Sinn, in welcher Weise meine damalige Arbeit Früchte trug für die spätere erfolgreiche Entwicklung der Methode, für die ich mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde: die Einzelpartikel-Methode in der Strukturforschung mit dem Elektronenmikroskop.

Für Leser, die diese Entwicklung nicht verfolgten, hier eine kurze Beschreibung: Die Methode beruht auf der Analyse von Tausenden von elektronenmikroskopischen Bildern einzelner Moleküle, deren Orientierung zufallsverteilt ist. Die Orientierung jedes Moleküls wird nachträglich am Computer bestimmt und anschließend wird ein dreidimensionales Bild aus allen Projektionen zusammengesetzt. Dieses dreidimensionale Bild, falls es genügend Auflösung besitzt, kann zur Grundlage für die Konstruktion eines atomaren Modells dienen. Einen wesentlichen Fortschritt in dieser Methode brachte die Erfindung der Kryo-Präparierungsmethode durch Jacques Dubochet Anfang der 1980er Jahre. Die Beziehung zwischen meiner Dissertation und meinem späteren Schaffen ist wirklich nicht sofort ersichtlich, denn weder dreidimensionale Rekonstruktion noch Mittelungsmethoden werden in der Arbeit behandelt. Sie befasst sich vielmehr mit grundsätzlichen Fragen, die bei der Verarbeitung von elektronenmikroskopischen (EM) Bildern auftreten: In welcher Weise gibt das Bild das Objekt wieder, welche Fehler treten dabei auf, wie kann man diese Fehler minimieren, und welchen Einfluss hat dabei das Rauschen? Die digitale Aufbereitung von EM-Bildern steckte damals noch in den Kinderschuhen. Später gesellte sich dazu die Idee, wie man verschiedene Bilder desselben Objekts genau deckungsgleich macht. Hier liegt der Anknüpfungspunkt zu meiner späteren Forschung.

Diese Idee als auch die Experimente und Konzepte, die aus ihr folgten, ging auf einen Vorfall zurück, der unwahrscheinlich klingt, aber die Bedeutung von Zufällen in der Forschung von Neuem ins Licht

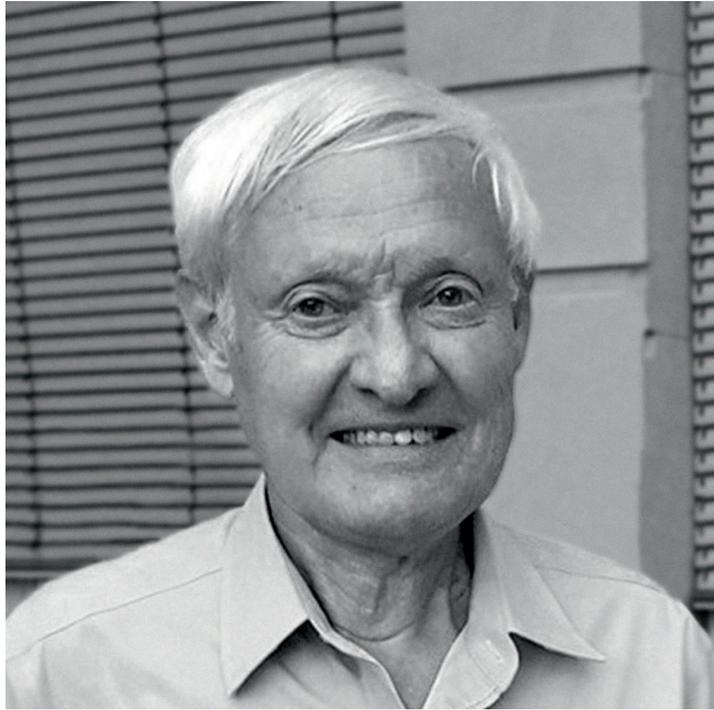
rückt: Professor Walter Hoppe, mein Doktorvater, hatte einem aus seiner Heimat vertriebenen, polnischen Elektronenmikroskopiker, Dr. Antoni Feltinowski, zeitweise Unterschlupf in seinem Institut geboten. Dieser Mann war sehr temperamentvoll, im Gespräch wie auch bei der Ausführung von Experimenten. Dies schlug sich in der Qualität der Bilder nieder: Sie waren oft verwackelt und unscharf, wahrscheinlich als Resultat von Schwingungen der EM-Säule, die er in seiner Eile angestoßen hatte. Zu dieser Zeit war es in Mode gekommen, EM-Bilder mit dem lichtoptischen Diffraktometer zu untersuchen. Das ist ein einfaches Gerät, das mit Laserlicht arbeitet und Diffraktogramme, Fourier-Transformierten einer photographischen Aufnahme, produziert. Fritz Thon hatte ein paar Jahre zuvor seine Diffraktogramme von EM-Bildern von Kohlefolien veröffentlicht, die die Signaturen der Phasenkontrastübertragungsfunktion widerspiegeln: die ringförmigen Patterns, die als Thon-Ringe nach ihm benannt sind. Für mich war es deshalb damals so etwas wie ein Reflex, ungewöhnliche EM-Aufnahmen ins Diffraktometer zu stecken. Dabei machte ich eine verblüffende Entdeckung: Dr. Feltinowskis Bilder produzierten Streifenmuster, die die eigentlichen Thon-Ringe überlagerten.

In der theoretischen Untersuchung stellte sich heraus, dass die Streifen-Modulation mit einer sprunghaften Bewegung des Objekts während der Aufnahme erklärt werden konnte, die eine Doppelbelichtung des Films mit verschobenen Bildern verursachte. Das war hochinteressant, denn es zeigte sich, dass zwei verrauschte Bilder desselben Objekts mit großer Genauigkeit zur Deckung gebracht werden können. Zudem ergab die Ausdehnung der Streifen ein Maß für die Auflösung. Weiter zeigte die Theorie, dass die Modulierung in engem Zusammenhang mit der zweidimensionalen Kreuzkorrelationsfunktion steht. Damit war also der Keim gesät für die Idee, Molekülprojektionen zu superponieren, um ein rauschfreies Bild des Moleküls zu erhalten.

So kam es, dass mir die experimentellen Fehlleistungen eines Kollegen im Hoppe-Institut entscheidende Anregungen gaben für spätere weitreichende Konzepte zur elektronenmikroskopischen Bildaufbereitung und Strukturforschung. Ich hätte mir aber damals nicht im Traum vorstellen können, dass meine frühen Entwicklungen von Rechenprogrammen in München eines Tages – mit den ausschlaggebenden Beiträgen von Jacques Dubochet, Richard Henderson und anderen Pionieren – der molekularen Strukturforschung eine neue Richtung geben würden.

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Dr. Dieter Typke und Herrn Professor Dr. Robert Huber – beide Kollegen aus der Gründerzeit des Martinsrieder Instituts – ganz herzlich für die Vorworte danken, die sie zu diesem Anlass geschrieben haben und damit meine Arbeit, die nun schon ein halbes Jahrhundert alt ist, in einen lebendigen Kontext setzen. Zudem danke ich Dr. Typke auch für eine sorgfältige Durchsicht der Arbeit und Korrektur von Fehlern im Original.

Joachim Frank, 2019



Joachim Frank

Joachim Frank ist Professor für Biochemie, molekulare Biophysik und Biowissenschaften an der Columbia University in New York. Er forschte für seine Dissertation bei Professor Walter Hoppe am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung (seit 1973 Max-Planck-Institut für Biochemie) und promovierte 1970 an der Technischen Universität München. Ein Harkness Fellowship gab ihm die Gelegenheit zu einem zweijährigen Forschungsaufenthalt in den USA. Nach einer kurzen Rückkehr zum Max-Planck-Institut als Forschungsassistent wurde er ab 1973 Forschungsgruppenleiter bei Vernon Ellis Cosslett am Cavendish Laboratorium in Cambridge.

Im Jahr 1975 nahm Frank eine Stelle als Senior Research Scientist in der Division of Laboratories and Research (später Wadsworth Center), New York State Department of Health in Albany an. Seit 1985 war er auch Professor für Biomedizin an der neugegründeten School of Public Health an der State University of New York at Albany. Von 1998 bis 2017 war Frank als Forscher am Howard Hughes Medical Institute tätig. Seit 2008 hat er seine jetzige Position an der Columbia University inne.

Zwischen 1975 und 1986 entwickelte er die Methoden zur elektronenmikroskopischen Bildverarbeitung, für die er mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Er wies nach, dass Bilder von Einzelmolekülen zur Strukturbestimmung verwendet werden können und trug wesentlich bei zu den Grundlagen der dreidimensionalen Elektronenmikroskopie. Er hat diese Methoden zuerst am Wadsworth Center und später an der Columbia University angewandt, um die strukturelle Basis der Proteinsynthese aufzuklären.

Frank ist Mitglied der National Academy of Sciences und der National Academy of Microbiology. Zudem ist er ein Fellow der National Academy of Arts and Sciences. Im Jahre 2014 wurde er mit der Franklin Medal in Life Science und 2017 mit dem Wiley Prize in Biomedical Sciences ausgezeichnet, 2017 folgte der Nobelpreis für Chemie zusammen mit Jacques Dubochet und Richard Henderson.

