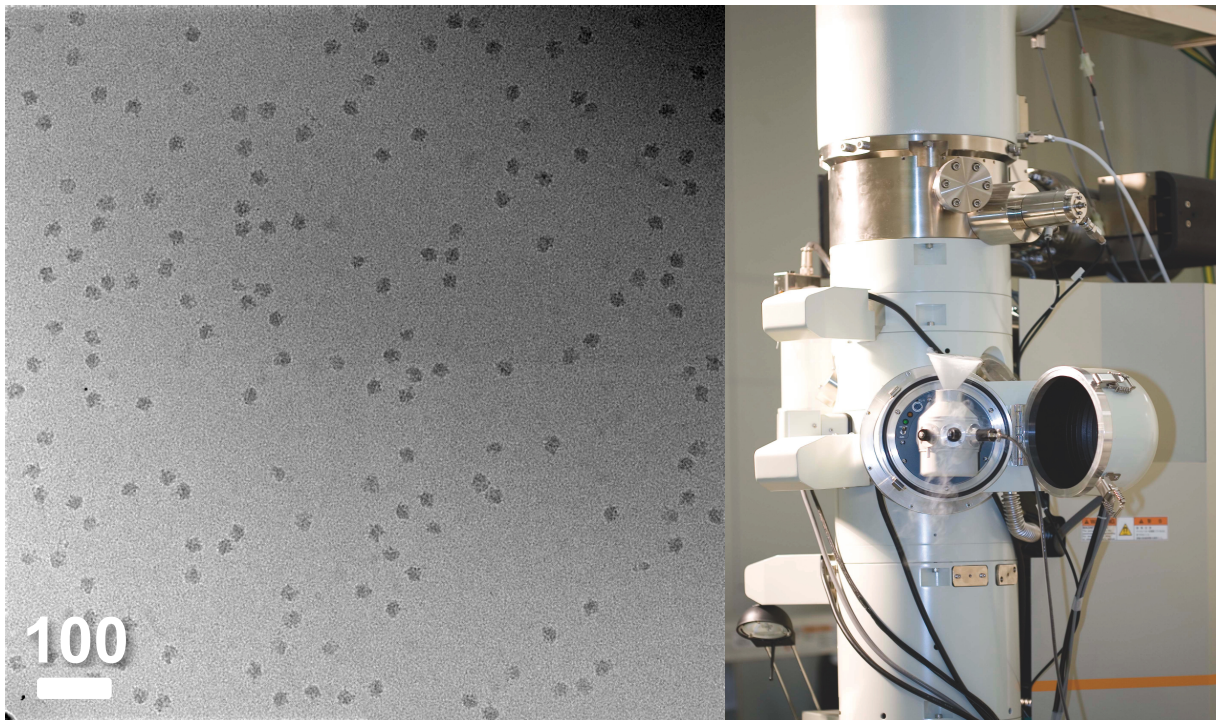


Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea
Departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática



Tesis Doctoral

**Automatización de la adquisición y
procesamiento de datos en microscopía
electrónica tridimensional**

Memoria presentada por David Gil Cartón para optar al grado de
Doctor por la Universidad del País Vasco dentro del programa de
Comunicaciones, Electrónica y Control

Trabajo dirigido por: Dr. Aitor Josu Garrido, Dra. Izaskun Garrido y
Dr. Mikel Valle

Bilbao 2015

Agradecimientos

Quiero dedicar esta tesis a mi mujer Aitziber y a mi hija Martina por haberme dado la fuerza necesaria para terminarla y espero poder compensarles el tiempo que no les he podido dedicar. “Nacemos para vivir, por eso el capital más importante que tenemos es el tiempo, es tan corto nuestro paso por este planeta que es una pésima idea no gozar cada paso y cada instante, con el favor de una mente que no tiene límites y un corazón que puede amar mucho más de lo que suponemos”—Facundo Cabral. De manera especial, también quiero dedicárselo a mis padres, Ángel y Paquita, quienes sin duda son siempre coautores de cada uno de los éxitos de sus hijos, y a mis herman@s Soraya, Angel y Vanesa con quienes comparto memorias de infancia y sueños de adulto. Sin duda los mayores éxitos de sus hijos están formados por células eucariotas y se tiran pedos provocados por células procariotas, y son mis queridos sobrinos Aitor, Angel, Eneko, mi hija Martina y los que están por venir.

Este trabajo de tesis se ha realizado gracias a la experiencia adquirida durante los últimos años en el Centro de Investigación Cooperativa en biociencias (CIC bioGUNE) en colaboración con el Grupo de Control Automático de la UPV/EHU. Le agradezco al CIC bioGUNE el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis y quiero agradecer el apoyo de tod@s mis compañer@s de la unidad de biología estructural del CIC bioGUNE, en particular a uno de mis directores de tesis, el Dr. Mikel Valle, quién confió en mi potencial para trabajar en la plataforma de microscopía electrónica en Noviembre de 2006. Quiero destacar a Melisa Lázaro con quién he compartido el proceso de aprendizaje en cryo-EM, a Patricia Julián quién realizó la tesis en 2012 sobre la estructura de ribosomas, al Dr. Gorka Lasso experto bioinformático y gran apasionado de las maracas, a Sandra Delgado con quién he compartido la actividad de la plataforma durante más de cuatro años y a Miguel Zamora, estudiante de doctorado en el grupo del Dr. Valle, siendo él quién ha validado el método neuro-di-

fuso de identificación de partículas desarrollado en esta tesis, utilizando para ello una muestra de *Drosophila* que forma parte de su proyecto sobre el estudio de polisomas. Quiero agradecer también la ayuda recibida de mano del investigador Dr. Xabier Agirrezabala, experto en la técnica cryo-EM aplicada a ribosomas y a diferentes tipos de virus, quién ha realizado una corrección exhaustiva de esta tesis y espero poder devolverle científicamente el favor. “Para obrar, el que da debe olvidar pronto, y el que recibe, nunca” —Séneca.

Por último quiero agradecer el apoyo prestado por mis directores de tesis del departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática de la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial de Bilbao, a la Dra. Izaskun Garrido y al Dr. Aitor Josu Garrido que siempre han estado en los momentos complicados ofreciéndome sus consejos y en ningún momento han dudado de mi capacidad para terminarla. Durante mi corta etapa de profesor sustituto en la EUITI de Bilbao, Aitor e Izaskun se empeñaron en ayudarme para poder enfrentarme a la tarea de profesor y después me han guiado y dirigido hasta llegar a la conclusión de esta tesis. Siempre les estaré agradecido por la confianza que han tenido en todo momento y su apoyo incondicional, por su valiosa dirección y paciencia en los momentos de duda. Sin ellos esto hubiese sido simplemente un sueño de Domingo de resaca.

INDICE GENERAL

1	Capítulo 1. Motivación y Objetivos	1
1.1	Estado del arte de los TEM	2
1.2	Características del TEM instalado en el CIC bioGUNE	6
1.3	Componentes del TEM instalado en el CIC bioGUNE	8
1.4	Objetivos de la tesis	27
1.5	Estructura de la tesis	29
2	Capítulo 2. Antecedentes: TEM en biología estructural	31
2.1	Descripción de la técnica cryo-TEM	32
2.1.1	Preparación de muestras para cryo-TEM	33
2.1.2	Formación de imagen en un TEM	39
2.2	Análisis de Partículas Individuales (cryo-EM)	46
2.2.1	Método de reconstrucción 3D por cryo-EM	48
2.2.2	Límite de resolución en una reconstrucción 3D	56
2.3	Estado del arte de cryo-EM	60
2.4	Estado del arte de los sistemas de automatización	63
2.4.1	Automatización de la adquisición de imágenes	64
2.4.2	Automatización de la selección de partículas	66
2.5	Muestras biológicas consideradas en esta tesis	67
2.5.1	Origen de la heterogeneidad	67
2.5.2	La estructura del ribosoma	69
2.5.3	La estructura de los virus icosaédricos	71
3	Capítulo 3. Sistema experto utilizado para control: sistemas neuro-difusos y visión artificial	75
3.1	Introducción a los sistemas expertos	76
3.1.1	Programación de sistemas expertos	77
3.1.2	Sistemas expertos en aplicaciones de control	78

3.2 Metodologías de soft computing	80
3.2.1 Algoritmos basados en redes neuronales	81
3.2.2 Introducción a la búsqueda Tabú	89
3.2.3 Algoritmos basados en lógica difusa	93
3.2.4 Sistemas de inferencia difusa	97
3.2.5 Sistemas de inferencia neuro-difuso adaptativo	100
3.3 Introducción a la visión artificial	106
3.3.1 Preprocesamiento digital de imagen	107
3.3.2 Algoritmos de segmentación de imagen	112
3.3.3 Operaciones morfológicas	118
4 Capítulo 4. Nuevo esquema de control inteligente para cryo-TEM	121
4.1 Esquema de control inteligente para la adquisición automática de imágenes en sesiones para cryo-EM	122
4.1.1 Módulo de adquisición en mínima dosis	122
4.1.2 Arquitectura de las comunicaciones entre cliente y servidor	126
4.1.3 Monitorización y control remoto	127
4.1.4 Calibraciones preliminares al modo automático	129
4.1.5 Diseño del nuevo esquema de control	131
4.2 Sistema experto para la toma de decisiones	135
4.2.1 Definición de las variables del FIS	136
4.2.2 Registro de información durante una sesión supervisada por el sistema experto	139
4.2.3 Definición de las funciones de membresía y reglas	140
4.2.4 Lista de toma de decisiones	141
4.2.5 Salidas del esquema de control	141
4.3 Diferentes componentes del TEM a controlar durante una sesión en modo automático	142
4.3.1 Control del goniómetro para mover la rejilla a lo largo del haz de electrones fijo	142

4.3.2	Control automático del sub-enfoque y astigmatismo	143
4.3.3	Control del filtro de energía	146
4.4	Nuevo sistema de identificación de partículas	150
4.4.1	Preprocesamiento de imagen	153
4.4.2	Segmentación de la imagen	153
4.4.3	Optimización del proceso de segmentación	156
4.4.4	Medición de las características discriminatorias de los objetos	157
4.4.5	Modelo ANFIS para la identificación del tipo de partícula	160
5	Capítulo 5. Resultados experimentales	163
5.1	Resultados experimentales del nuevo esquema de control inteligente	163
5.1.1	Validación del sistema experto para la toma de decisiones	165
5.1.2	Validación de los diferentes módulos del esquema de control	166
5.2	Resultados experimentales para la identificación del tipo de partícula	169
5.2.1	Resultados para el estudio de una muestra homogénea	169
5.2.2	Resultados para el estudio de una muestra heterogénea	173
5.2.3	Validación del sistema de identificación de partículas	179
6	Capítulo 6. Conclusiones y Perspectivas	185
6.1	Conclusiones	185
6.2	Perspectivas de futuro	192
7	Publicaciones	195
8	Anexo. Software desarrollado para la implementación del esquema de control inteligente	201
8.1	Software Matlab para la programación de la GUI	201
8.2	Software Matlab para la navegación automática	209
8.3	Software Matlab para la identificación de partículas individuales en imágenes para cryo-EM	226
9	Bibliografía	239

INDICE DE ABREVIATURAS

2D	Two-dimensional
3D	Three-dimensional
3DEM	Three Dimensional Electron Microscopy
ACD	Anti-contamination device
ACE	Automated CTF Estimation
AI	Artificial Intelligence
AFM	Atomic Force Microscopy
ANFIS	Adaptive network based fuzzy inference system
ANN	Artificial neural network
BLOB	Binary Large Object
BOA	Bisector of area
BP	Back propagation
BPGD	Back Propagation Gradient Descent algorithm
CCD	Charged Coupled Device
CCF	Cross-correlation function
CCIG	Cold-cathode ionization gauge
CBED	Convergent Beam Electron Diffraction
CFEG	Cold (cathode) field-emission electron gun
CL	Condenser lens
CLA	Condenser lens aperture
CLAHE	Contrast-limited adaptive histogram equalization
CM	Condenser minilens
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
COG	Centre of gravity
CR	Cryo (polepiece)
CRYO-EM	Cryo-electron microscopy
CRYO-ET	Cryo-electron tomography
CRYO-TEM	Cryogenic transmission electron microscopy
CTF	Contrast transfer function
DAS	Data acquisition system
DNA	Deoxyribonucleic acid

DQE	Detective Quantum Efficiency
DM	Digital Micrograph
EELS	Electron energy loss spectroscopy
EFTEM	Energy filtered transmission electron microscopy
EM	Electron microscopy
ES	Expert system
ET	Electron tomography
FEG	Field emission gun
FIS	Fuzzy inference system
FL	Fuzzy logic
FLC	Fuzzy Logic Controller
FWHM	Full width half maximum
FN	False Negatives
FP	False Positives
GA	Genetic Algorithm
GD	Gradient descent
GUI	Graphical User Interface
HC	High contrast
HCOA	High contrast objective aperture
HM	High Magnification
HR	High-resolution
HT	(Specimen) high-tilt
LBM	Lattice-Boltzmann method
LM	Low Magnification
LMS	Least mean square
LSE	Least squares estimator
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MDS	Minimum dose system
MFP	Mean free path
MLP	Multi layer perceptron
MOM	Mean of maxima
MRC	Medical Research Council
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	Messenger RNA

MSE	Mean Square Error
MTF	Modulation transfer function
NLP	Natural language processing
NMR	Nuclear magnetic resonance
NM	Nanometer
NS	Negative staining
OL	Objective lens
OM	Objective mini lens
PC	Personal computer
PE	Process Element
PET	Positron Emission Tomography
PSD	Power spectrum density
PSF	Point-spread function
RANSAC	Robust estimation of Random Sample Consensus
RMSE	Root mean square error
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
RPM	Revolutions per Minute
SCS	Scattering cross-section
SIP	Sputter ion pumping
SOM	Small of Maximum
SPR	Single-particle reconstruction
SNR	Signal to noise ratio
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TEM	Transmission electron microscope
TN	True Negatives
TOF	Time-Of-Flight
TP	True Positives
tRNA	transfer RNA
TS	Tabu Search
TSK	Takagi-Sugeno-Kang
UHR	Ultrahigh-resolution
ZLI	Zero loss image

INDICE DE TABLAS

Capítulo 1

Tabla 1.1: Especificaciones del TEM de Jeol modelo JEM-2200FS/CR.....7

Capítulo 4

Tabla 4.1: Variables lingüísticas difusas y expresiones difusas para el estado de los parámetros de entrada y salida al FIS.....136

Capítulo 5

Tabla 5.1: Matriz de Confusión del sistema automático basado en ANFIS para la identificación de partículas individuales en imágenes para cryo-EM.....180

INDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1: Esquema de diferentes interacciones y señales generadas por un haz de electrones incidente sobre una muestra en un microscopio de electrones. Imagen adaptada de Williams & Carter, 1996.....	4
Figura 1.2: Componentes visibles y esquema básico de las lentes del TEM JEM-2200-FS/CR.....	9
Figura 1.3: Esquema del sistema de vacío del TEM JEM-2200FS/CR.....	11
Figura 1.4: Descripción del efecto Schottky en un material conductor para la extracción de electrones reduciendo la función de trabajo en un valor $\Delta\Phi$. Imagen de Egerton, 2007.....	12
Figura 1.5: Esquema de la extracción y aceleración de electrones en un FEG.....	13
Figura 1.6: Esquema del sistema de lentes condensadoras de un TEM en modo imagen.....	15
Figura 1.7: Sección transversal de una lente electromagnética en un TEM donde una pieza polar está rodeada por una bobina controlada por una corriente continua. Imagen de Egerton, 2007.....	17
Figura 1.8: Esquema del sistema de lentes de magnificación y proyectoras de un TEM.....	19
Figura 1.9: Esquema de la distribución del campo magnético (electrostático) para (A) un deflector de haz simple o lente de alineamiento realizando una deflexión diagonal y (B) un corrector de astigmatismo o <i>stigmator</i> . El eje óptico es perpendicular al plano de la página.....	21
Figura 1.10: Esquema de la inserción del porta-muestras en la columna de un TEM a través del goniómetro y esquema del mecanismo motorizado de un goniómetro.....	23
Figura 1.11: Esquema del filtro de energía Omega (Ω) en un TEM.....	24

Figura 1.12: Ejemplo de un espectro de energía obtenido gracias a un filtro de energía.....25

Figura 1.13: Gráfica para el cálculo de la dosis total de electrones sobre la muestra en función de la magnificación.....27

Capítulo 2

Figura 2.1: Esquema básico de una rejilla y la preparación de muestras para cryo-TEM. Imagen de Wang & Sigworth, 2006.....35

Figura 2.2: Imagen y esquema del proceso de vitrificación con el Vitrobot del CIC bio-GUNE.....37

Figura 2.3: Imágenes del proceso de transferencia de una rejilla vitrificada dentro del vacío del TEM utilizando un porta-muestras Gatan con el dewar lleno de nitrógeno líquido.....38

Figura 2.4: Esquema descriptivo del disco de confusión (PSF) producido por la aberración esférica de la OL en un TEM.....42

Figura 2.5: CTF a diferentes sub-enfoques (TEM 200keV, $C_s=2\text{mm}$, $C_c=2.1\text{mm}$, $\Delta E=0.5\text{ eV}$). La simulación de la CTF ha sido realizada utilizando ctfExplorer de Maxim V. Sidorov. (A) Foco de Scherzer, $\Delta f=-75\text{ nm}$. Se obtiene alta intensidad de información a altas frecuencias, pero el contraste es bajo debido a la baja amplitud a bajas frecuencias; (B) Se incrementa el valor del sub-enfoque a $\Delta f=-2000\text{nm}$. Aumenta la amplitud de la información a bajas frecuencias pero degrada la información a altas frecuencias produciendo un efecto de modulación en el espacio de frecuencias de la imagen.....45

Figura 2.6: Esquema de la técnica de reconstrucción 3D cryo-EM en biología estructural.....48

Figura 2.7: Imagen digital adquirida gracias al software DigitalMicrograph y la transformada de Fourier que muestra el efecto de la CTF en función de la frecuencia espacial.....49

Figura 2.8: Ajuste automático de la curva de la CTF experimental utilizando un modelo teórico creado por el software ACE toolbox.....50

Figura 2.9: Gráfico de la distribución angular de las partículas experimentales en todo el espacio.....	56
Figura 2.10: Comparativa del valor DQE en función de la frecuencia de Nyquist de diferentes sensores de detección directa de electrones en comparación con la cámara CCD modelo US4000 de Gatan (Ruskin et al., 2013).....	60
Figura 2.11: A la izquierda, se muestra una imagen de cryo-TEM con proyecciones de ribosomas 80S y debajo una vista del correspondiente mapa 3DEM del ribosomas 80S reconstruido por investigadores del CIC bioGUNE. A la derecha, se muestra una imagen de cryo-TEM conteniendo proyecciones de ribosomas 40S y debajo una vista de un mapa 3DEM de la subunidad ribosomal 40S (EMD-2450).....	70
Figura 2.12 Estructuras 3D representativas de partículas virales con diferentes formas y tamaños. Figura de Prasuhn, 2007.....	73
 Capítulo 3	
Figura 3.1: Diagrama de una Neurona Artificial.....	82
Figura 3.2: Arquitectura de una Red Neuronal Simple.....	83
Figura 3.3: Esquema de un algoritmo básico de búsqueda Tabú.....	92
Figura 3.4: Arquitectura general de un controlador de lógica difusa (FLC).....	97
Figura 3.5: Estructura general de un sistema de inferencia difusa (FIS).....	98
Figura 3.6: Arquitectura general de un modelo ANFIS con dos entradas y una salida.....	101
Figura 3.7: Funciones de membresía. (A) Trapezoidal. (B) Triangular. (C) Gaussiana con centro C_i y ancho σ_i . (D) con forma de Campana.....	103
Figura 3.8: Esquema general de la formación de una imagen no-ideal.....	109
Figura 3.9: Esquema de un filtro de Wiener adaptativo.....	112
Figura 3.10: Relación entre los píxeles vecinos. (A) Vecindad $N_4(p)$; (B) Vecindad $N_D(p)$	119

Capítulo 4

Figura 4.1: Protocolo para la adquisición de imágenes en mínima dosis en sesiones cryo-TEM.....	124
Figura 4.2: Esquema básico para la conexión en remoto al TEM del CIC bioGUNE y esquema de navegación a lo largo de diferentes agujeros en una rejilla Quantifoil R2/1 utilizando la adquisición de imágenes en modo <i>Search</i>	126
Figura 4.3: Consolas de mando del TEM JEM2200FS/CR de JEOL en frente del TEM.....	127
Figura 4.4: Diseño del panel central de la GUI para el control remoto del TEM modelo JEM- 2200FS/CR de JEOL y la cámara CCD modelo UltraScan 4000 de Gatan.....	128
Figura 4.5: Imagen a baja magnificación (<i>low mag</i>) ($150\times$) de una rejilla comercial Quantifoil y encuadre de una región válida para comenzar una sesión cryo-TEM.....	129
Figura 4.6: Imagen de una partícula de contaminación situada en el centro de la imagen en modo <i>Photo</i> (a una magnificación de $50000\times$) y la misma partícula situada en el centro de la imagen en modo <i>Search</i> (a una magnificación de $4000\times$).....	130
Figura 4.7: Representación esquemática de la secuencia seguida para la automatización de la adquisición de datos en una sesión cryo-TEM.....	132
Figura 4.8: Ejemplo del modo gráfico para la programación en Matlab de las funciones de membresía del FIS.....	140
Figura 4.9: Información de salida del algoritmo que estima los parámetros de la CTF gracias a <i>ACE toolbox</i> en Matlab.....	143
Figura 4.10: Apariencia de la sombra producida por un desplazamiento del pico <i>zero-loss</i> fuera del centro de la apertura (<i>slit</i>) del filtro de energía. La imagen central corresponde a una imagen cryo-TEM en modo <i>Photo</i> con la apertura (<i>slit</i>) del filtro de energía correctamente centrada en el pico <i>zero-loss</i> del espectro de energía.....	148
Figura 4.11: Imagen que muestra las integrales y energías involucradas en medir el grosor de la muestra utilizando el método <i>log-ratio</i>	150

Figura 4.12: Procedimiento para la detección e identificación automática de partículas.....	152
Figura 4.13: Ejemplo representativo del proceso de segmentación de partículas individuales de diferentes poblaciones de ribosomas (ribosomas bacterianos 70S, subunidades de ribosomas, agregados de ribosomas) y partículas de contaminación de hielo.....	155
Figura 4.14: Ejemplo de 8 características discriminatorias medidas a partir de una sola imagen cryo-EM conteniendo 320 partículas de ribosomas bacterianos 70S.....	159
Figura 4.15: Arquitectura general de un modelo ANFIS que forma parte del sistema de identificación de partículas en imágenes para cryo-EM.....	162

Capítulo 5

Figura 5.1: Secuencia de imágenes representando el modo de trabajo en automático del nuevo esquema de control inteligente.....	164
Figura 5.2: Mapas de superficie representando la relación entre algunas entradas y salidas al FIS. Estas representaciones son utilizadas en el proceso de programación del FIS de tipo Mamdani para tomar las decisiones correctas en tiempo real durante el control automático del TEM.....	165
Figura 5.3: Ilustración roadmap que permite simular el funcionamiento del proceso de inferencia difusa total para la toma de decisiones.....	166
Figura 5.4: Ilustración esquemática de la arquitectura del sistema de identificación automática para una única población homogénea de ribosomas 70S y detección de partículas de contaminación en imágenes cryo-TEM.....	170
Figura 5.5: Ejemplo de la programación de las funciones de membresía de un FIS inicial de tipo Sugeno programado según la experiencia de un experto humano en cryo-EM.....	171
Figura 5.6: Imagen por cryo-TEM de una muestra heterogénea resultado de la purificación de disomas de ribosomas 80S de <i>Drosophila</i>	174

Figura 5.7: Esquema de la arquitectura propuesta basada en cinco modelos ANFIS para la identificación de partículas en el estudio de una muestra heterogénea por cryo-EM.....	176
Figura 5.8: Representación de la simulación realizada por el toolbox fuzzy de Matlab utilizado en la programación de cada FIS de tipo Sugeno.....	176
Figura 5.9: Resultado del proceso de segmentación para cada tipo de partícula presente en el estudio por cryo-EM de una muestra heterogénea de <i>Drosophila</i>	177
Figura 5.10: Imagen que muestra de forma gráfica la matriz de características discriminatorias usadas en el proceso de entrenamiento del sistema de identificación de una muestra heterogénea de <i>Drosophila</i>	178
Figura 5.11: Imágenes resultado de la segmentación y selección del nuevo sistema automático que identifica las partículas en imágenes para cryo-EM de una muestra heterogénea de <i>Drosophila</i>	182
Figura 5.12: Resultado del centrado e identificación de las partículas en una imagen cryo-TEM de la muestra heterogénea de <i>Drosophila</i>	183
Figura 5.13: Ilustración del resultado del proceso de selección automática de partículas usando el método neuro-difuso desarrollado en esta tesis y utilizado para un análisis estructural por cryo-EM. Se muestra el resultado de la clasificación 2D y una vista de la reconstrucción 3D de cada uno de los tres complejos biológicos de mayor interés en una muestra heterogénea (pequeños virus icosaédricos, disomas y ribosomas libres).....	184

Capítulo 1

Motivación y Objetivos

La presente tesis ha sido realizada en la unidad de biología estructural del Centro de Investigación Cooperativa en biociencias (CIC bioGUNE) en colaboración con el Grupo de Control Automático (GCA) del departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática de la Universidad de País Vasco (UPV/EHU). Como se verá en el Capítulo 2, gracias a diferentes avances tecnológicos durante los últimos años, la técnica de reconstrucción tridimensional de complejos biológicos en un estado conformacional muy cercano al fisiológico, conocida como cryo-EM (Frank, 2006), ha revolucionado la biología estructural consiguiendo resoluciones muy cercanas a la atómica (Callaway, 2015; Kühlbrandt, 2014). Esta revolución se ha conseguido gracias al desarrollo de nuevas cámaras que detectan directamente los electrones, y a nuevos procedimientos de procesamiento de vídeo que corrigen la distorsión producida en las imágenes por el movimiento de las macromoléculas, embebidas en el hielo, durante el tiempo de exposición (Bai et al., 2015; Bammes et al., 2012; Campbell et al., 2014; McMullan et al., 2014; Ruskin et al., 2013). Para explotar el potencial de la técnica cryo-EM y obtener resolución atómica es necesario conseguir una gran cantidad de imágenes de la mejor calidad posible en las sesiones en modo imagen con un microscopio electrónico de transmisión (TEM), lo que hace necesario el uso de nuevos equipos cada vez más estables, más automatizados y de alto rendimiento.

Para automatizar la adquisición de datos en un TEM es necesario seguir un esquema de control determinado. En un sistema real tan complejo como es el TEM no se puede utilizar un modelo matemático, luego es necesario construir esquemas de control basados

en el conocimiento de un experto junto con datos de referencia de entrada y salida que permitan modelar el sistema. Esta tesis se centra en el desarrollo de un nuevo esquema de control inteligente utilizando diferentes algoritmos de inteligencia artificial para automatizar la adquisición de datos en un TEM dedicado a experimentos de cryo-EM. Este trabajo ha sido realizado utilizando el equipamiento de la plataforma de microscopía electrónica del CIC bioGUNE, especializada en el análisis de muestras a temperaturas criogénicas (cryo-TEM) con el TEM modelo JEM-2200FS/CR de la compañía Jeol. A continuación se explica el estado del arte de los equipos TEM y se describen las características fundamentales del TEM del CIC bioGUNE junto con cada uno de sus componentes más importantes, para de esta forma comprender mejor los objetivos principales perseguidos en esta tesis.

1.1 Estado del arte de los TEM

El primer microscopio electrónico de transmisión (TEM) fue desarrollado por Max Knoll y Ernst Ruska en 1931 (Ruska, 1987; Ruska & Knoll, 1931) basándose en los mismos principios ópticos que la microscopía convencional. La principal diferencia radica en que en vez de utilizar fotones y lentes de vidrio como un microscopio óptico tradicional, un TEM utiliza electrones y lentes electromagnéticas para formar la imagen (Egerton, 2007).

El criterio de Rayleigh establece que la menor distancia que puede ser medida en un microscopio (i.e. la resolución máxima δ) está limitada por la longitud de onda de la forma,

$$\delta = \frac{0.61 \cdot \lambda}{\mu \cdot \sin(\beta)} \quad (1.1.1)$$

donde λ es la longitud de onda de una señal monocromática incidente, μ es el índice de refracción del medio, y β es el semi-ángulo de las lentes de magnificación que viene determinado por la elección de la apertura numérica de las lentes de objetivo y condensadora (Williams & Carter, 2009). Dado que $\mu \cdot \sin(\beta)$ se puede aproximar a uno en un microscopio óptico, la máxima resolución puede ser medida como $0.61 \cdot \lambda$. Para luz visible, la longitud de onda más corta es de $\lambda \simeq 4000 \text{ \AA}$, luego el límite de resolución de un microscopio óptico es de $\delta \simeq 200 \text{ nm}$. El TEM utiliza electrones para analizar la

muestra y dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz, pueden medir distancias mucho más pequeñas.

A comienzos del siglo XX, Louis de Broglie sugirió que los electrones tenían características de onda, con una longitud de onda (λ , nm) relacionada con su energía (E , eV) de la forma,

$$\lambda = \frac{1.22}{E^{1/2}} \quad (1.1.2)$$

Por ejemplo, los electrones de un haz monocromático acelerados con una energía de 200 keV tienen una longitud de onda de $\lambda = 0.0025 \text{ nm}$, la cual es menor que el diámetro de un átomo ($\sim 1 \text{ \AA}$). Por tanto, la menor distancia teórica que podría resolverse por un microscopio de electrones ideal sería,

$$\delta = \frac{1.22 \cdot \lambda}{\beta} \quad (1.1.3)$$

Si tenemos en cuenta solamente la aberración esférica producida en la lente de objetivo (OL) del TEM el cálculo de la resolución sería de la forma,

$$\delta = 0.67 (C_s \cdot \lambda^3)^{1/4} \quad (1.1.4)$$

Teóricamente por tanto, es posible medir distancias en una escala inferior a la atómica (en el rango de sub-angstrom) mediante un TEM. No obstante, en la práctica, la resolución real obtenida está limitada por otros muchos factores como describiremos a lo largo de este capítulo. Entre ellos destacan el tipo de muestra en estudio, la función de envoltente producida por la dispersión de energía del haz (junto con la aberración cromática de la lente OL) o diferentes factores de inestabilidad a lo largo de la columna del TEM.

Entre los diferentes tipos de interacciones y diferentes señales de salida que pueden ser utilizadas para obtener información complementaria sobre la muestra (ver figura 1.1), en este trabajo nos centraremos en el modo imagen (*TEM mode*), en el cual se utiliza un haz de electrones paralelo que incide sobre la muestra. De esta manera, la imagen es formada por la interacción entre los electrones dispersados y no dispersados que atravie-

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

san la muestra. Para ello, la muestra tiene que ser lo suficientemente fina para que un número suficiente de electrones la atraviesen.

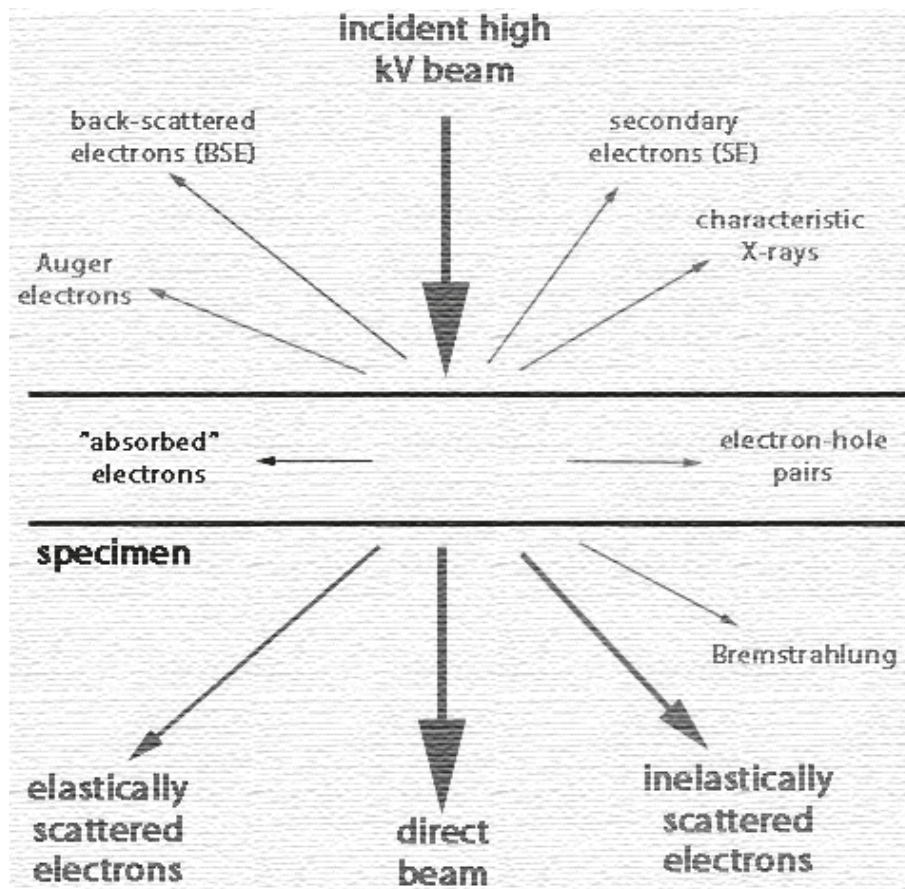


Figura 1.1: Esquema de diferentes interacciones y señales generadas por un haz de electrones incidente sobre una muestra en un microscopio de electrones. Imagen adaptada de Williams & Carter, 1996

En la actualidad el TEM es aplicado en diferentes áreas de la ciencia. Por ejemplo, se utiliza en ciencias de materiales para estudiar la estructura atómica de la interacción entre diferentes materiales cristalinos o como herramienta de control de calidad en la producción de semiconductores o nano-partículas. En ciencias de la vida el TEM destaca principalmente en tres campos diferentes: cristalografía de electrones, tomografía, y análisis de partículas individuales (cryo-EM) para el estudio de la estructura 3D de complejos biológicos. En este capítulo se hará una introducción del estado del arte de los TEM y se analizarán cada uno de los principales componentes a controlar. A continuación se detallarán los aspectos más importantes a tener en cuenta en un TEM dedicado a experimentos cryo-TEM en biología estructural como es el mecanismo de formación de imagen y los diferentes protocolos más habituales utilizados en este tipo de experimen-

tos. Finalmente se presentarán las especificaciones del TEM utilizado en este trabajo de modo que los componentes a controlar descritos son exactamente los utilizados por el TEM del CIC bioGUNE.

Desde la invención del primer microscopio electrónico se ha invertido un gran esfuerzo en la mejora de cada uno de sus componentes. En particular hay que destacar los grandes avances en dispositivos dedicados a corregir las diferentes aberraciones (principalmente la cromática y esférica) que se producen en el sistema de lentes de un microscopio convencional, el blindaje dedicado a evitar la inestabilidad producida por diferentes factores externos y finalmente, el gran avance realizado en los detectores de electrones (Li et al., 2013; McMullan et al., 2009; Ruskin et al. 2013). Hoy en día, la mayoría de los TEM de última generación tienen instalado un cañón de emisión de campo (FEG) o emisión Schottky, el cual genera un haz de electrones de mayor coherencia espacial que una fuente de electrones termoiónica (Zhou & Chiu, 1993). Estos microscopios tienen un voltaje de aceleración de entre 200 kV y 300 kV y pueden alcanzar resoluciones próximas a los ~ 2 Å. En nuestro caso, un TEM configurado con una pieza polar ferromagnética diseñada para experimentos de cryo-TEM, la resolución máxima punto a punto es de ~ 2.8 Å.

En la actualidad también existen dispositivos que corrigen la aberración esférica del TEM. Los correctores de aberraciones generalmente están formados por lentes en forma de hexapolo adicionales que introducen simetría no-rotacional a la trayectoria de los electrones. En un TEM que trabaje en modo imagen (*TEM mode*) son necesarios dos grupos de lentes correctoras antes y después de la muestra. La aberración cromática se puede reducir utilizando fuentes de electrones con una mínima dispersión de energía. En ciencias de materiales, donde no hay límite de dosis sobre la muestra, los correctores de aberración esférica han resultado fundamentales para alcanzar resolución atómica de forma rutinaria. Actualmente, es posible resolver 0.08 nm con un TEM operado a 200 kV. Un ejemplo de este tipo de instrumento es el microscopio JEM-ARM200F (Jeol, Japan), que incluye un corrector de aberración esférica en forma de doble hexapolo, un cañón de emisión de campo de cátodo frío (CFEG) mejorado (el cual genera un haz de electrones monocromático con muy poca dispersión de energía) y una columna totalmente blindada que protege a las lentes de interferencias ambientales (lo cual ofrece una estabilidad mecánica y eléctrica total). Sin embargo existen estudios que demuestran

que para las muestras biológicas, la corrección de aberración esférica no mejora la calidad de las imágenes significativamente (Ziegler et al, 2009).

Como se ha introducido anteriormente, el límite de resolución teórico de un TEM a 200 kV es menor a 1Å (ver ecuación 1.1.4). En los TEM actuales, con correctores de aberraciones y dedicados a materiales no sensibles a la radiación es posible llegar a resolución atómica. En cryo-TEM de muestras biológicas por el contrario, existen factores adicionales que limitan la resolución (Chandler & Roberson, 2009). Como veremos a lo largo del Capítulo 2, al realizar experimentos de cryo-TEM hay que tener en cuenta el bajo contraste de amplitud producido por las muestras biológicas, su alta sensibilidad a la radiación, o el movimiento de las macromoléculas biológicas durante el tiempo de exposición entre otros factores.

En ciencias de la vida, el TEM mejor diseñado a día de hoy para experimentos de cryo-TEM es el modelo Titan Krios de la compañía FEI (FEI, The Netherlands). Este microscopio ofrece un rendimiento óptico excelente en experimentos de cryo-TEM gracias a (i) una gran estabilidad térmica y mecánica por el blindaje de su columna (que aísla las lentes del microscopio de factores externos), (ii) su sistema robotizado de carga automática de 12 rejillas vitrificadas libre de contaminación (*Autoloader*), (iii) el sistema de iluminación en paralelo mejorado usando un sistema de tres lentes de condensadora, (iv) el sistema de auto-recarga de nitrógeno líquido, (v) una deriva térmica mínima gracias a una nueva tecnología de lentes (*ConstantPower*) que optimiza el cambio entre baja magnificación (LM) y alta magnificación (HM), (vi) el diseño de lentes con baja histéresis y, (vii) un detector directo de electrones de alta velocidad y sensibilidad entre otras características.

1.2 Características del TEM instalado en el CIC bio-GUNE

El TEM instalado en la unidad de biología estructural del CIC bioGUNE es el modelo JEM-2200FS/CR de la compañía JEOL (JEOL Inc., Tokyo, Japan). Este microscopio está equipado con un cañón FEG de tipo Schottky, con un cátodo formado por ZrO/W(100) en la punta del filamento, y acelera los electrones con una energía de 200 keV. En la lente de objetivo del TEM se sitúa la pieza polar modelo CR diseñada para

experimentos cryo-TEM permitiendo alto contraste y altos grados de inclinación. Integrado en la columna del TEM se encuentra el filtro de energía Omega (Tsuno et al., 1999), el cual permite generar imágenes sin pérdida de energía (ZLI) al eliminar los electrones inelásticos utilizando una abertura después del filtro. Esto ofrece imágenes más nítidas y con mejor contraste. El goniómetro de este TEM está controlado por un controlador piezo-eléctrico lo que permite movimientos más suaves para buscar campos de visión a nivel atómico, sobre todo necesario a altas magnificaciones. Las especificaciones de este TEM se encuentran resumidas en la siguiente tabla 1.1.

<i>Configuración de la pieza polar</i>	Cryo - CR
<i>Resolución</i> Point image <input type="checkbox"/> Lattice image	0.27 nm 0.14 nm
<i>Resolución de energía</i>	0.8 eV <input type="checkbox"/> zero-loss FWHM <input type="checkbox"/>
<i>Voltaje de aceleración</i> <input type="checkbox"/> Minimum step size Energy shift	160 kV (Standby mode) <input type="checkbox"/> 200 kV (Working mode) 50 V 3,000 V maximum (in 0.2 V steps)
<i>Fuente de electrones (FEG)</i> Emitter Brightness Vacuum	ZrO/W(100) Schottky emitter > 4×10^8 A/(cm ² sr) $\times 10^{-8}$ Pa
<i>Estabilidad de potencia</i> <input type="checkbox"/> Acc. Voltage OL current Filter lens current	< 2×10^{-6} min < 1×10^{-6} min < 1×10^{-6} min
<i>Lente de Objetivo</i> Focal length Spherical aberration <input type="checkbox"/> Chromatic aberration Minimum step	2.8 mm 2.0 mm 2.1 mm 2.6 nm
<i>Spot Size (diámetro)</i> TEM mode	2 to 5 nm
<i>Magnificación</i> MAG mode LOW MAG mode	$\times 1.5k$ to 1000k $\times 50$ to 1.5k
<i>Dispersión de energía EELS</i> On energy-selection slit On final image plane (film)	1.2 $\mu\text{m}/\text{eV}$ at 200 kV 50 to 400 $\mu\text{m}/\text{eV}$ at 200 kV
<i>Specimen chamber</i> Specimen shift (X, Y / Z) Specimen tilt angle (X)	2 mm <input type="checkbox"/> 0.4 mm $\pm 80^\circ$

Tabla 1.1: Especificaciones del TEM de Jeol modelo JEM-2200FS/CR

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

Los principales componentes del TEM, tales como el sistema óptico, el goniómetro o alguna de las válvulas, son totalmente controlados por PC. Esto permite crear un sistema automático que controle cada uno de los componentes del TEM. Para controlar este TEM desde Matlab se utiliza el software JEM-toolbox (TEMography.com, Japan), el cual dispone de más de 100 funciones dedicadas a controlar cada uno de los componentes del microscopio.

Para poder obtener imágenes digitales, se emplea una cámara CCD de 16 megapíxeles modelo 895 US4000 (4096 x 4096 píxeles) de la compañía GATAN (Gatan, Pleasanton, CA) (Booth et al., 2006). En este tipo de cámaras, los electrones se transforman a luz (fotones) a través de una fina película de emulsión de fósforo y los fotones son guiados a través de fibra óptica a un chip CCD, que los detecta y los vuelve a transformar en electrones. Las imágenes se obtienen trabajando en condiciones de mínima dosis gracias al software DigitalMicrograph™ (Gatan, Pleasanton, CA).

Es importante subrayar que la plataforma de microscopía del CIC bioGUNE dispone de un microscopio que ofrece 2.8 Å de resolución máxima, pero que este poder de resolución no es aprovechado en su totalidad. El sensor CCD instalado tiene una DQE muy ineficiente (sobre todo a altas frecuencias) lo cual limita a ~ 10 Å la resolución final de los mapas de densidad 3D que se pueden obtener utilizando técnicas de procesamiento cryo-EM (ver Capítulo 2). Mas recientemente se han desarrollado cámaras de detección directa de electrones ultra-rápidas (en las cuales no es necesaria la conversión de electrón a fotón) que permiten obtener resoluciones cuasi-atómicas ($\sim 3-4$ Å) de forma rutinaria, que esperamos formen parte del equipamiento de la plataforma en un futuro próximo.

1.3 Componentes del TEM instalado en el CIC bio-GUNE

En la figura 1.2 se muestra un esquema básico de los diferentes componentes que forman el TEM instalado en el CIC bioGUNE. El microscopio se compone básicamente de una fuente de electrones que emite un haz de electrones con la menor dispersión de energía posible. Posteriormente, las lentes de condensadora pre-muestra crean un haz lo más paralelo posible que atraviesa la muestra. La lente de objetivo los enfoca para for-

mar una imagen, la cual es magnificada por las lentes post-muestra y finalmente es proyectada en un detector para crear una imagen digital. Se utilizan lentes electromagnéticas para crear campos magnéticos que dirigen y enfocan el haz de electrones. Todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema detector que registra o muestra en vivo la imagen que se produce en la OL del TEM.

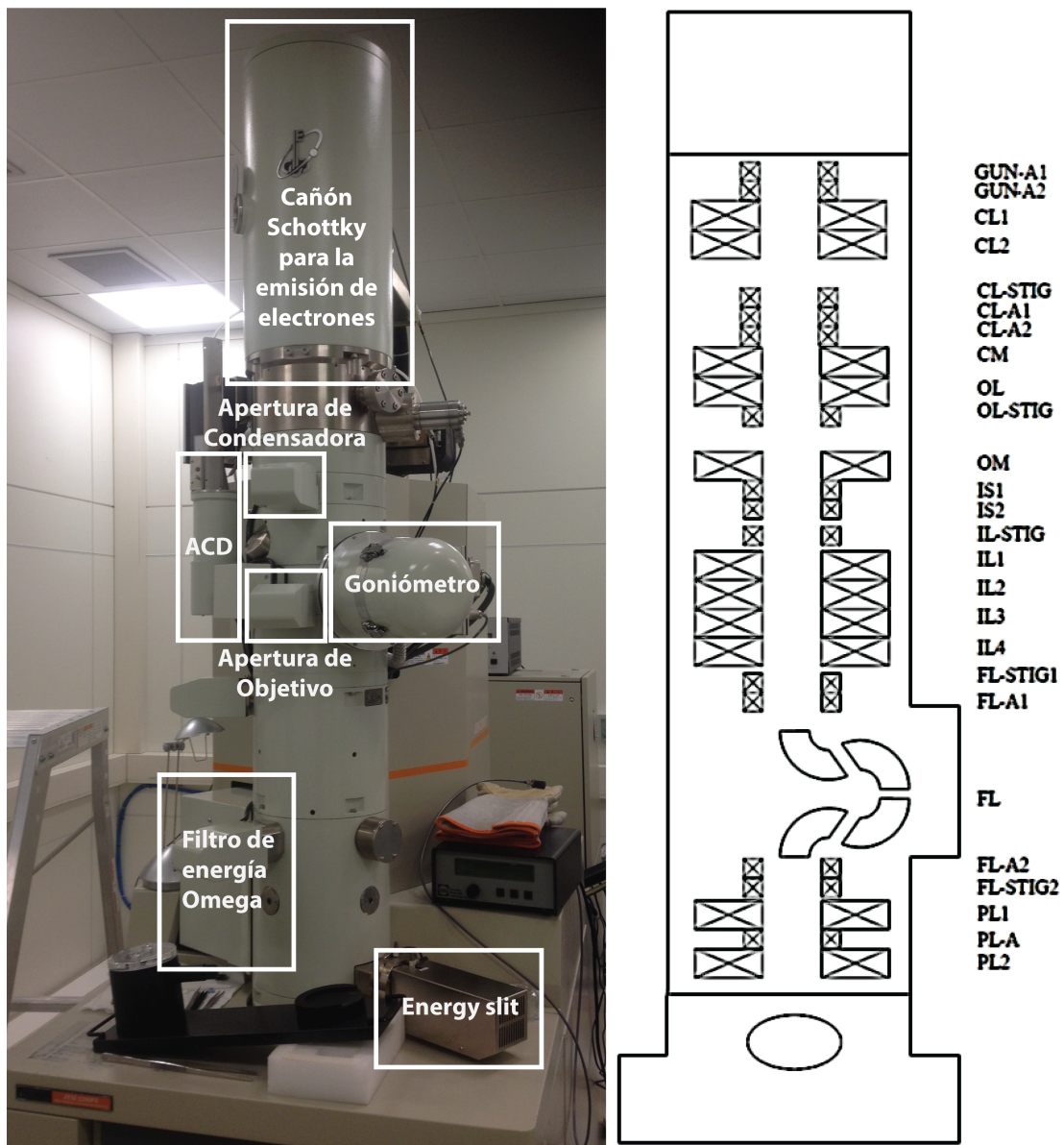


Figura 1.2: Componentes visibles y esquema básico de las lentes del TEM JEM-2200FS/CR

A continuación se detallarán cada uno de los componentes del TEM utilizado en esta tesis, destacando algunas de sus limitaciones que lo hacen no ideal para un esquema automático no supervisado. Estos factores limitantes hacen necesario nuevos esquemas de

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

control para poder automatizar la adquisición de datos de forma eficiente y adaptable a los posibles inconvenientes.

Sistema de vacío

El sistema de vacío es una parte fundamental del TEM dado que los electrones son fuertemente absorbidos y desviados por las moléculas de aire. El interior de la columna de un TEM tiene que tener un vacío casi total, de forma que el camino óptico del TEM y todos los componentes del microscopio estén inmersos dentro de un alto vacío evitando de esta forma los efectos negativos de la contaminación en la muestra, en las aperturas, lentes, cañón de electrones, detector, etc.

El sistema de evacuación de un TEM incluye la cámara del cañón de electrones, la columna, la cámara de la muestra y la cámara del detector. Para conseguir el vacío necesario se utiliza una combinación de diferentes bombas, tubos de vacío y un juego de válvulas que funcionan de forma automática, siguiendo un esquema de diferentes etapas como se ve en el esquema de la figura 1.3. Entre estas bombas de vacío las más utilizadas son las bombas rotatorias (100 L/min), difusoras (420 L/s), iónicas (20/150 L/s) y turbomoleculares (450 L/s) (Jeol, 2009). El FEG tiene integradas dos bombas iónicas (SIP) que consiguen un alto vacío, necesario para su buen funcionamiento y durabilidad. Los sensores de vacío son 5 medidores de conductividad térmica de gases Pirani y un medidor cátodo-ánodo Penning (CCIG) de más precisión. Al insertar el porta-muestras dentro de la columna del TEM a través del goniómetro, las bombas rotatorias comienzan el ciclo de vacío. Después el sistema de vacío del TEM sigue un protocolo específico en el que intervienen varias válvulas, las bombas difusoras, la bomba turbomolecular, y la junta de vacío del porta-muestras. Este sistema de vacío permite insertar las rejillas desde una presión atmosférica ($10^5 Pa$) hasta el vacío final dentro de la columna de $\sim 2 \times 10^{-5} Pa$ medido por el sensor Penning. El usuario solamente puede controlar alguna de estas válvulas, como es la válvula que separa la fuente de electrones FEG de la columna del TEM.

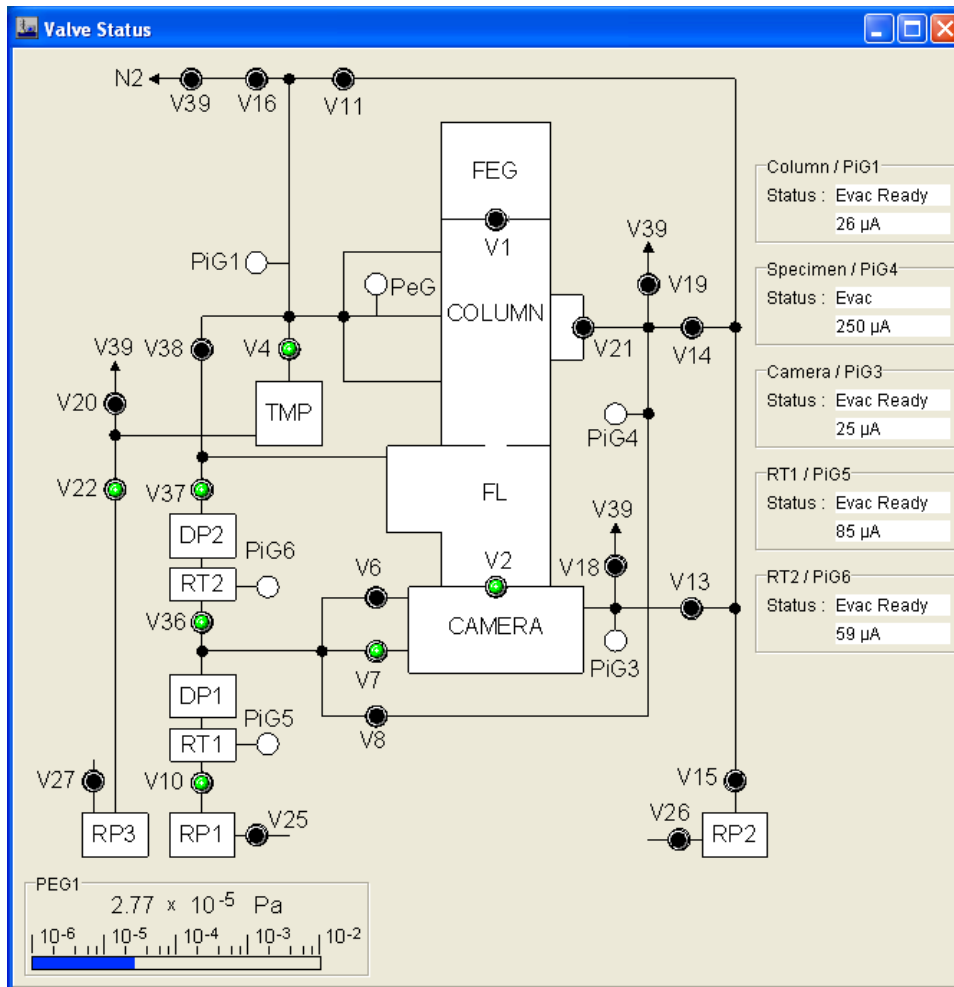


Figura 1.3: Esquema del sistema de vacío del TEM JEM-2200FS/CR

Fuente de electrones

Los electrones en un TEM son generados y acelerados por un cañón de electrones. Este puede ser tanto un elemento termoiónico (Tungsteno o un cristal de LaB6) o un monocristal orientado recubriendo una punta de Tungsteno (W), como es el caso de una configuración FEG. Este tipo de cañones produce un haz altamente coherente y de alto brillo necesario para producir imágenes de alta resolución. Existen dos tipos de FEG, el de tipo cátodo frío y el térmicamente asistido como es el tipo Schottky. Un FEG emite electrones a partir de una punta muy afilada de un cátodo aplicando un campo eléctrico fuerte.

En el TEM de la plataforma del CIC bioGUNE, el cañón de electrones es de tipo Schottky, no de emisión de campo ya que no se produce efecto túnel. El efecto Schottky es un fenómeno que ocurre cuando la barrera potencial de una sustancia disminuye en pre-

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

sencia de un fuerte campo eléctrico y ayuda a generar la emisión térmica de electrones. En un cañón de electrones de tipo Schottky, la punta emisora está hecha de tungsteno (W), con la superficie cubierta con una fina capa de óxido de Circonio (ZrO) que hace la emisión de electrones más fácil reduciendo la función de trabajo de la punta ($\Delta\Phi \approx 2.8 eV$), como puede verse en la figura 1.4.

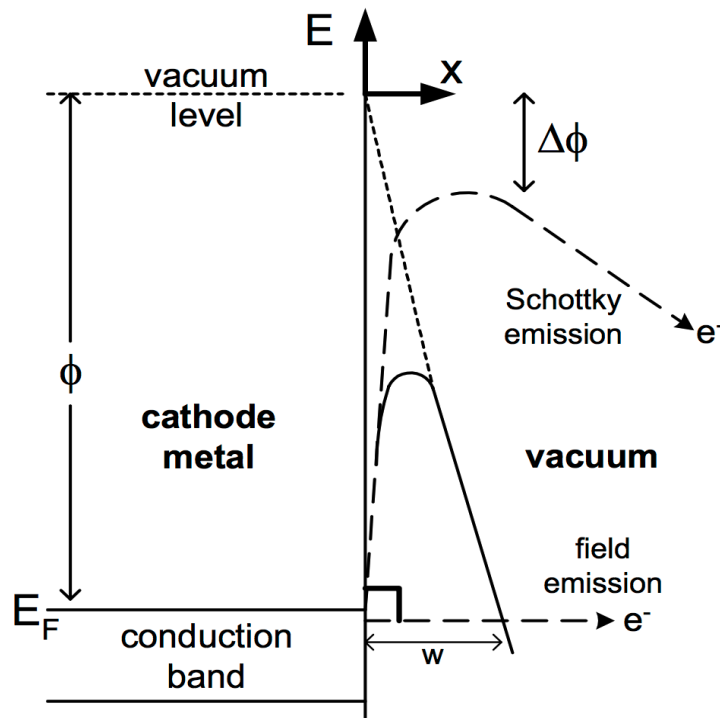


Figura 1.4: Descripción del efecto Schottky en un material conductor para la extracción de electrones reduciendo la función de trabajo en un valor $\Delta\Phi$. Imagen de Egerton, 2007

En un cañón de tipo Schottky la punta es un cátodo respecto a dos ánodos. El primer ánodo extrae los electrones de la punta del cátodo y el segundo los acelera a 200kV (ver figura 1.5). El primer ánodo es una lente electrostática de extracción y la segunda de aceleración. El haz de electrones emitido por el cátodo converge gracias a esta segunda lente electrostática de aceleración y forma la mínima sección transversal delante del cátodo, conocida como "crossover" o fuente virtual, donde todas las trayectorias de los electrones emitidos se juntan virtualmente (en un punto) por la extrapolación de la trayectoria de los electrones. El brillo del cañón de electrones se refiere al generado en el *crossover*. El brillo electrón-óptico de la fuente es una medida de la densidad de corriente por unidad de ángulo sólido, el cual indica la calidad de una fuente de electrones, y se puede calcular de la forma,

$$\beta = \frac{J_e}{\Omega} = I \cdot \left[\pi \left(\frac{d}{2} \right)^2 \right]^{-1} \cdot (\pi \alpha^2)^{-1} \quad (1.3.1)$$

donde J_e es la densidad de corriente y en un emisor de tipo Schottky es $J_e \approx 10^7 \text{ A/m}^2$ en la superficie. Ω es el ángulo sólido sobre el cual se emiten los electrones, I es la corriente del haz, d es el diámetro del haz y α es el semi-ángulo de convergencia. Si el sistema óptico está libre de aberraciones el brillo se mantiene constante en todas las etapas del recorrido.

Los filamentos de tipo Schottky son calentados a una menor temperatura ($\sim 1800 \text{ K}$) en comparación con los termoiónicos, y la dispersión de energía de este emisor de electrones es $\sim 0.5 \text{ eV}$. Un FEG de emisión Schottky a 200kV genera un haz altamente coherente y con alto nivel de brillo $\beta \approx 10^{11} \text{ Am}^{-2}/\text{sr}^{-1}$ (Bahm et al., 2011). El tamaño de la fuente virtual producida es $>10 \text{ nm}$. El cañón de tipo Schottky es ampliamente usado gracias a la alta estabilidad de su corriente de emisión, frente a los cañones de efecto campo de cátodo frío (CFEG) que sí utilizan el efecto túnel, su haz es más coherente (menor dispersión de energía) pero sufren más contaminación por gases residuales porque trabajan a temperatura ambiente, lo cual les hace fluctuar (Egerton, 2007).

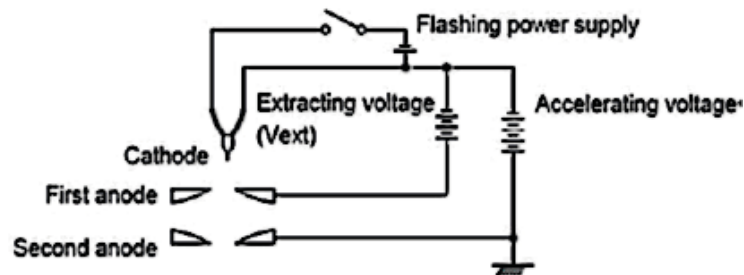


Figura 1.5: Esquema de la extracción y aceleración de electrones en un FEG

El valor del voltaje de aceleración del haz de electrones generado por la fuente de electrones de un TEM determina el poder de penetración de los electrones en la muestra. El recorrido libre medio (MFP) de los electrones elásticamente dispersados depende del voltaje de aceleración y el material de la muestra y está típicamente en el rango entre 100-1000 nm. Por ejemplo, en hielo vitrificado, el MFP está en el rango de $\sim 200 \text{ nm}$ para un voltaje de 120 keV y en el rango de $\sim 350 \text{ nm}$ para voltajes de 300 keV (Feja & Aebi, 1999; Grimm et al., 1996). Por tanto, mayores voltajes de aceleración permiten analizar muestras más gruesas pero producen menor sección transversal de dispersión

(SCS), que es la probabilidad de interacción entre un electrón y los átomos en la muestra. En consecuencia, podrían no producir suficiente contraste en muestras con bajo poder de dispersión de electrones como son las biológicas.

Lentes para el control de la iluminación

En un TEM, las lentes electromagnéticas condensadoras son usadas para afinar el haz, definir su tamaño y el nivel de convergencia. En el caso del modo imagen en un TEM se encarga de dirigir un haz de electrones paralelo hacia la muestra. Las lentes electromagnéticas tienen la función de converger el haz de electrones utilizando un campo magnético controlado por un imán solenoide. La alteración de la corriente eléctrica continua a través de éste produce cambios en la longitud focal y magnificación de estas lentes.

Para trabajar en modo imagen en un TEM el sistema de condensadoras crea un haz paralelo para iluminar la muestra. El esquema típico se basa en un sistema de dos lentes condensadoras: mientras la lente condensadora 1 (CL1) controla el tamaño del punto “*spot size*” del haz, la condensadora 2 (CL2) controla el tamaño del haz sobre la muestra, lo cual determina la intensidad obtenida en la imagen creada. Nuestro TEM utiliza una tercera lente de condensadora conocida como mini-lente condensadora (CM), que permite cambiar el ángulo de convergencia del haz, ver figura 1.6. La primera lente CL1 reduce el tamaño del *crossover* o fuente virtual de electrones generada por el cañón a \square 1/10 veces su tamaño hasta el denominado “*spot size 5*”. La segunda lente CL2 transfiere este haz reducido en el plano de la muestra (la cual se encuentra inmersa dentro de la lente objetivo) con una ampliación de $\sim 1\times$.

El tamaño del haz que irradia la muestra es un parámetro importante en el sistema de iluminación dado que determina el grado de inclinación del haz sobre la muestra. Para controlar el área de iluminación sobre la muestra se modifica la fuerza del campo magnético de la lente CL2, que controla la extensión del haz sobre la muestra a una magnificación determinada. La tercera lente de condensadora, conocida como *mini-lens* (CM), se sitúa entre la lente de condensadora (CL2) y la lente objetivo (OL) para producir un haz de electrones con un ángulo de convergencia apropiado, que dependerá del modo de trabajo elegido en el TEM. Las “*mini lens*” no tienen pieza polar en el interior dado que la función de la pieza polar es reforzar el campo magnético, como en la lente OL. Dependiendo de la excitación de esta lente CM se converge el haz a un nano-área (para los

modos analíticos como EELS, STEM o CBED), o se genera una iluminación paralela del haz de electrones sobre la muestra para trabajar en el modo imagen.

Para poder minimizar al máximo el tiempo de exposición en el detector manteniendo las condiciones de mínima dosis, así como un haz lo más paralelo posible es necesario ajustar convenientemente los diferentes parámetros del sistema de iluminación. Cambiando la fuerza del campo magnético de la lente CL1 se cambia el *spot size*. Para el microscopio Jeol existen 5 “*spot size*” disponibles, donde el “*spot size 5*” corresponde al punto más pequeño posible, luego es el que ofrece mejor resolución espacial, pero también es el que ofrece la menor intensidad de los 5. Lo ideal en nuestro TEM es utilizar el “*spot size 5*” si genera suficiente intensidad en el haz paralelo de electrones sobre la muestra. El objetivo es utilizar un tiempo de exposición lo menor posible en el detector, lo cual disminuye la influencia de la deriva en la formación de imagen. El cañón de electrones en un TEM se cambia cada ~4-5 años. Recién instalado ofrece suficiente intensidad como para poder trabajar con el “*spot size 5*”, pero a medida que se va agotando y disminuye el brillo generado por el filamento es necesario disminuir el *spot size* a 4, o incluso a 3, de forma que empeora la resolución espacial pero se consigue más intensidad.

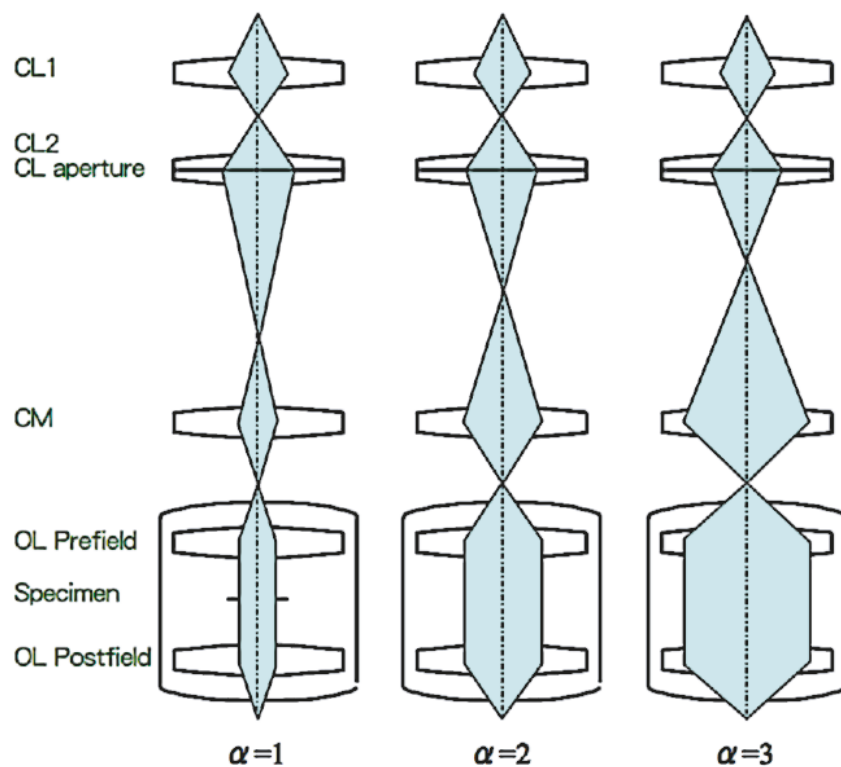


Figura 1.6: Esquema del sistema de lentes condensadoras de un TEM en modo imagen

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

La configuración de las lentes condensadoras también determinan el ángulo de convergencia del haz. En este modo de trabajo existe un parámetro conocido como *alpha* (α) que depende de la lente CM y es necesario ajustar dependiendo de la magnificación de trabajo, como se puede ver en la figura 1.6. Con el TEM configurado en modo imagen el haz debería ser lo más paralelo posible para obtener una iluminación óptima de la muestra. Una iluminación no-paralela (como es un haz convergente o divergente) puede producir cambios de foco locales y variaciones de magnificación en diferentes áreas de la misma imagen. Esto se produce porque la lente de objetivo no es perfecta y siempre producen aberración esférica en las imágenes. Normalmente todos los parámetros de las lentes de iluminación son configuradas previamente a una sesión en el TEM, con el objetivo de obtener las mejores condiciones dependiendo de la magnificación de trabajo, la sensibilidad de la muestra, el estado del FEG, la intensidad necesaria sobre la muestra, etc.

Lentes para la formación de imagen

El sistema de lentes para la formación de imagen en un TEM incluye la lentes de objetivo (OL), la mini-lente de objetivo (OM), las intermedias (IL) y las proyectoras (PL). La lente principal para la formación de imagen es la OL, cuyo núcleo formado por una pieza-polar ferromagnética rodeado de una bobina de hilo de cobre exterior permite modificar el poder de convergencia del campo magnético de la OL. Esto permite controlar los electrones que pasan a través de la lente. Una pieza polar es un polo magnético hecho de un material magnético blando (e.g. hierro puro) el cual concentra el flujo magnético producido por una bobina electromagnética de hilo de cobre que la rodea, como puede verse en la figura 1.7. El fuerte campo magnético producido en el estrecho canal del centro de la pieza polar permite enfocar el haz de electrones y formar imagen. Una bobina de longitud l , sección S , un número de espiras N y por la que circula una corriente eléctrica $i(t)$ induce un flujo magnético $\Phi(t)$ definido como,

$$\Phi(t) = B(t) \cdot S = \mu_0 \cdot \frac{N}{l} i(t) \cdot S = \mu_0 \cdot \frac{NS}{l} \cdot i(t) \quad (1.3.2)$$

donde $B(t)$ es la inducción magnética producida por la corriente $i(t)$ y μ_0 es la constante magnética.

Este campo puede ser usado para controlar el camino recorrido por los electrones dentro de las lentes, simplemente variando la corriente $i(t)$. Cuando una corriente continua pasa a través de la bobina, se modifica el campo magnético concentrado en el centro del canal de la pieza polar. Cuando se enfoca, lo que se ajusta es la corriente a través de la bobina de la OL. En un TEM, la pieza polar de la OL debe ser mecánicamente perfecta aunque esto es imposible por lo que siempre existen aberraciones. El diseño de la pieza polar de la lente de objetivo determina la configuración final del microscopio.

Dado que la OL es la lente más importante para formar la imagen, su rendimiento determina la calidad de la imagen (resolución, contraste, etc.). Para obtener mayor resolución se utiliza una OL con un coeficiente de aberración esférica (C_s) lo más pequeño posible. Para poder reducir el valor de este coeficiente se reduce la distancia entre los dos polos magnéticos de la pieza polar, reduciendo el diámetro del orificio donde se inserta la muestra. La compañía Jeol dispone de diferentes configuraciones para la pieza polar; desde las que ofrecen muy alta resolución (UHR, HR) con un coeficiente de aberración esférica muy pequeño $C_s \leq 0.5$, hasta las que ofrecen alto contraste (HC) y altos ángulos de inclinación del goniómetro (HT), aumentando el hueco entre los dos polos de la pieza polar. Esto produce un aumento del valor de C_s . También existe una configuración de pieza polar diseñada para experimentos de cryo-TEM, denominada modelo CR. Se emplea para favorecer el contraste de fase con una $C_s = 2 \text{ mm}$ alta. Está a su vez diseñada para permitir altos ángulos de inclinación, perfectos para experimentos de cryo-tomografía.

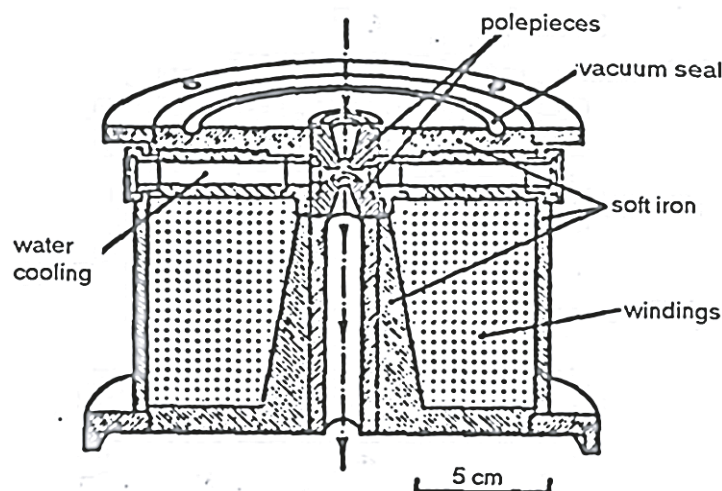


Figura 1.7: Sección transversal de una lente electromagnética en un TEM donde una pieza polar está rodeada por una bobina controlada por una corriente continua. Imagen de Egerton, 2007

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

El control del enfoque utilizando la lente de objetivo (OL) es esencial para controlar el contraste y el contenido en frecuencia de la imagen adquirida dado que los objetos biológicos, formados principalmente por átomos ligeros (e.g., H, O, C, y N) producen un contraste de amplitud muy débil respecto al fondo (*background*). Esto es debido a su mala eficiencia de dispersión de electrones, muy parecida a la del hielo amorfo. Además la densidad de las proteínas está en el rango de los $\sim 1.4 \text{ g cm}^{-3}$ (Fischer et al., 2004) mientras que la densidad del hielo amorfo es de $\sim 0.94 \text{ g cm}^{-3}$. Esta pequeña diferencia de densidades produce un contraste muy débil entre ellos, haciendo difícil o imposible visualizar macromoléculas biológicas más pequeñas que 200 kDa de peso molecular. Para mejorar el contraste en las imágenes de baja dosis en experimentos de cryo-TEM, es necesario incrementar la diferencia de fase entre los electrones dispersados y no dispersados, lo cual se consigue sub-enfocando con OL. El control de OL a lo largo de una sesión es fundamental para obtener buena calidad en las imágenes adquiridas. El proceso de formación de imagen por contraste de fase se analizara con mas detalle en el Capítulo 2.

Lentes para el control de la magnificación

La minilente de objetivo (OM) es una lente sin pieza polar, con un campo magnético débil y situada debajo de la lente OL. Se utiliza para formar una imagen en modo de baja magnificación (*low mag*) ($\sim 50\times$ to $3,000\times$) desactivando el funcionamiento de la OL. La magnificación de la OM es de $1\times$ a $2\times$. Las imágenes pueden ser adquiridas en un amplio rango de magnificaciones, desde magnificaciones bajas (*low mag*) hasta magnificaciones altas (desde $3,000\times$ hasta $1,000,000\times$). Una vez que el haz de electrones paralelo atraviesa la muestra, éste es enfocado por la lente objetivo para generar una imagen de la región de la muestra expuesta al haz de electrones. Esta imagen es a continuación magnificada y proyectada gracias a una configuración de lentes intermedias y proyectoras, ver figura 1.8.

En nuestro TEM las lentes intermedias son de 4 etapas y las lentes proyectoras de 2 etapas. Este grupo de lentes es configurado de fábrica para ofrecer la magnificación nominal en el plano donde se insertan las películas analógicas (Kodak film), y cada una de ellas tiene un rango de magnificaciones desde $\sim 0.5\times$ hasta $\sim 100\times$. En la fábrica se guarda una lista de valores de corriente de este grupo de lentes (intermedias y proyectoras)

para cada una de las diferentes magnificaciones y la entrada a una fila de esta lista en un índice determinado cambiará el valor de corriente de este grupo de lentes, luego modificará la magnificación a la deseada. Este es el motivo de tener solamente acceso a unas magnificaciones predefinidas (discretas) contenidas en esta tabla y no un valor de magnificación arbitrario (analógico).

Cada lente proyectora tiene una magnificación fija de $\sim 150\times$. y se encarga de formar la imagen magnificada en el detector. Dado que la última lente es una proyectora y el detector CCD se encuentra por debajo del plano de las películas analógicas, existe un factor de escala entre la magnificación nominal y la magnificación real en el plano de la cámara. Este valor no es constante a lo largo de todas las magnificaciones luego es necesario realizar una calibración de las magnificaciones en el plano de la CCD antes de poder utilizar las imágenes generadas en la CCD para hacer medidas.

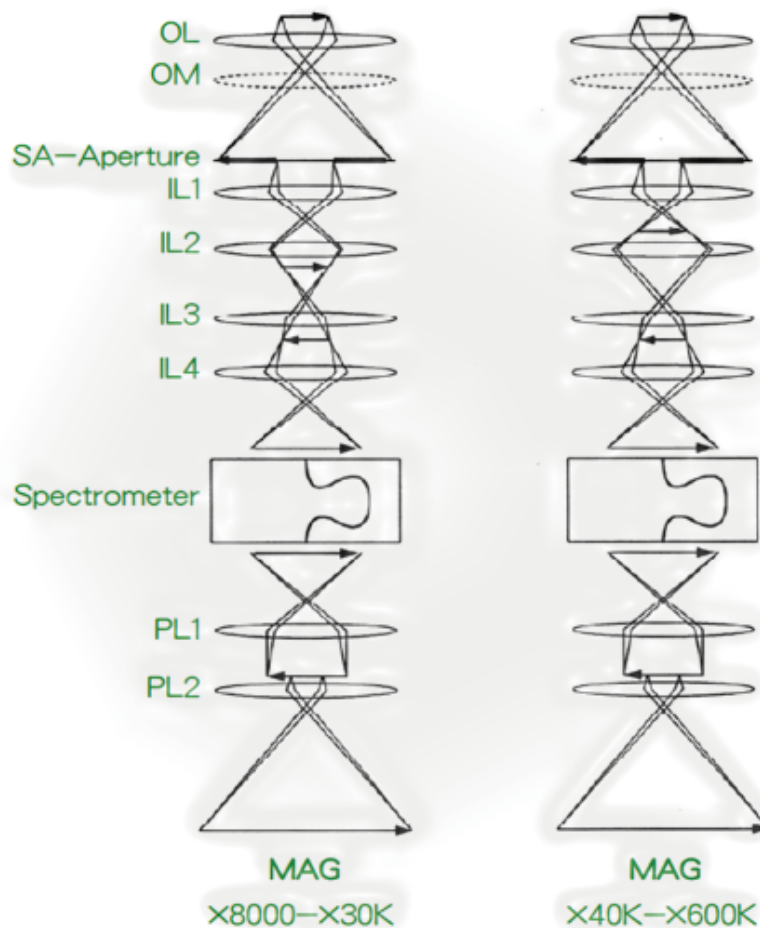


Figura 1.8: Esquema del sistema de lentes de magnificación y proyectoras de un TEM

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

Al cambiar entre diferentes valores de magnificación se produce un fenómeno de histéresis (van Bree et al., 2010) dentro de las lentes electromagnéticas, lo que produce cierta inestabilidad óptica. Esto hace difícil reproducir exactamente la misma posición en la rejilla tras un cambio de magnificaciones sin mover el goniómetro. Para corregir este efecto y aumentar la estabilidad óptica en los TEM se han desarrollado en la actualidad lentes de doble bobina, donde una bobina trabaja a una corriente constante, mientras que la segunda bobina es ajustable en incrementos muy finos.

Lentes para el alineamiento del haz

Para realizar el alineamiento del haz de electrones a lo largo de la columna del TEM están disponibles diferentes lentes electromagnéticas deflectoras de dos etapas balanceadas para realizar el desplazamiento e inclinación del haz (*beam shift* y *beam tilt*). El alineamiento del haz de electrones a lo largo de todo el recorrido del TEM es de vital importancia dado que el haz debería pasar a través del centro de cada lente con el objetivo de minimizar las aberraciones. Para centrar el haz en diferentes puntos específicos de la columna del TEM se utilizan diferentes lentes deflectoras, que constan de dos etapas de bobinas perpendiculares entre sí, como puede verse en la figura 1.9 (A). El TEM de Jeol está equipado con 3 sets de bobinas deflectoras dobles, un set en el cañón, otro por encima de la OL y el tercero forma las deflectoras de imagen por debajo de la OL. Las 2 bobinas de estas lentes deflectoras son capaces de realizar desplazamientos (*shift*) e inclinaciones (*tilt*) independientes, permitiendo modificar de forma precisa la orientación y dirección del haz de electrones. En la figura 1.2 se muestra la posición de cada una de estas lentes deflectoras a lo largo de la columna de nuestro TEM. El alineamiento del haz a lo largo de toda la columna del TEM se realiza justo antes de la sesión y normalmente es estable durante un gran periodo de tiempo (Bozzola & Russell, 1999).

La lente de objetivo está formada por un núcleo en forma de pieza-polar y una parte externa que incluye una bobina. Dado que la pieza polar no puede ser construida a la perfección, los campos electromagnéticos generados no son siempre perfectamente circulares, lo que genera una pérdida de simetría rotacional del haz de electrones. En una dirección la lente enfocará más fuerte que en la dirección perpendicular produciendo una asimetría llamada astigmatismo. Este defecto es corregido gracias a lentes dedicadas a corregir el astigmatismo conocidas como *stigmators*. Estas están formadas por un sistema de bobinas (cuadrupolo) ajustables que introducen ligeras variaciones en el campo mag-

nético de la lente de objetivo y ayudan a compensar las imperfecciones, como puede verse en la figura 1.9 (B).

Un TEM suele estar equipado con tres sets de *stigmators*, el *stigmator* de condensadora, el *stigmator* de objetivo y el *stigmator* de difracción. El primero se utiliza para obtener un haz circular que ilumine la muestra. El segundo se utiliza para corregir el astigmatismo axial relacionado con la formación de imagen en la OL. El astigmatismo axial se puede caracterizar en el espacio de densidad espectral de potencia (PSD) como una variación azimutal en la cantidad de sub-enfoque e introduce un alargamiento direccional en las características de la imagen. El tercer *stigmator* se usa para corregir el astigmatismo en el patrón de difracción y en las imágenes a baja magnificación (Xing & Lograsso, 2009). Dado que la cantidad de astigmatismo tiende a cambiar con el tiempo debido a efectos de carga electrostática (producido por una apertura de objetivo contaminada o por una muestra no conductora como es el hielo) e inestabilidad en las lentes, se debe corregir periódicamente durante una sesión en el TEM, sobre todo a altas magnificaciones.

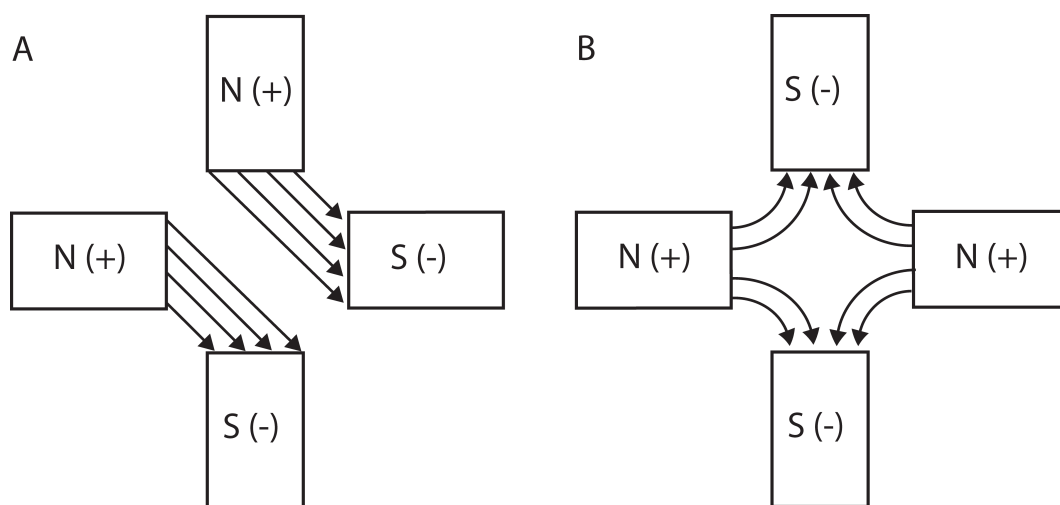


Figura 1.9: Esquema de la distribución del campo magnético (electrostático) para (A) un deflector de haz simple o lente de alineamiento realizando una deflexión diagonal y (B) un corrector de astigmatismo o stigmator. El eje óptico es perpendicular al plano de la página

Aperturas

Para controlar la colimación del haz, se utilizan aperturas fijas retráctiles que son introducidas en varias posiciones de la columna del TEM. En el microscopio JEM-2200FS de Jeol en modo imagen se utilizan diferentes aperturas. La apertura de condensadora

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

(CLA) determina el ángulo de divergencia de un haz de electrones y la dosis del haz incidente. Se trata de una hoja con 4 agujeros en forma de disco (con diámetros entre 200, 100, 40 y 10 μm) que elimina los electrones más alejados del centro. Esta apertura se sitúa justo después de la lente CL2 y se encarga de limitar el haz de electrones a los más cercanos al eje central, dado que los electrones más alejados sufren más aberraciones, y además un exceso de electrones irradia más la muestra de forma innecesaria. La apertura de objetivo (HCOA) consiste en una hoja con cuatro agujeros redondos de diferentes diámetros (60, 40, 30 y 5 μm), insertadas dentro del hueco de la pieza polar, exactamente en el “*back-focal plane*” de la lente objetivo y determina el ángulo de dispersión de electrones que salen de una muestra. Esta apertura es la responsable de un aumento del contraste, sobre todo de contraste de amplitud. El filtro de energía Omega (Ω) tiene una apertura de entrada (ENTA) que consiste en una hoja con 4 agujeros en forma de disco (de diámetro 120, 60, 40 y 20 μm). Esta apertura se utiliza en experimentos de espectroscopía EELS y no se suele utilizar en el modo imagen. Todas estas aperturas son motorizadas y sus posiciones están precalibradas y guardadas en memoria. Es muy común tener que recentrar una apertura a lo largo de una sesión con el TEM.

Goniómetro

El goniómetro es uno de los mecanismos del TEM que más necesita la intervención del usuario y su diseño varía entre fabricantes. Las muestras para microscopía son preparadas en pequeños discos metálicos (de 3 mm de diámetro y típicamente hechos de cobre u oro con una fina capa soporte hecha de carbón amorfo) llamados rejillas (*EM grids*). Estas rejillas son insertadas dentro de la columna del TEM utilizando un porta-muestras diseñado para poder insertarlas desde el exterior a presión atmosférica hasta el alto vacío final en la columna del TEM, como puede verse en el esquema de la figura 1.10. Hoy en día existen sistemas robotizados que cargan hasta 12 rejillas dentro del vacío del TEM de forma automática, empleando para ello un portamuestras sin contacto al exterior que centra las rejillas y las mueve a través del haz de electrones.

A continuación se describirá el método de carga y movimiento de las rejillas basado en un porta-muestras externo insertado en la columna a través de un goniómetro piezoeléctrico (Gale & Hale, 1962). En un porta-muestras estándar la rejilla es fijada en uno de los extremos por un anillo metálico. Este extremo del porta-muestras se sitúa entre los dos polos que componen la pieza polar de la OL. Gracias al goniómetro la muestra pue-

de desplazarse bajo un haz de electrones centrado en una posición fija dentro de la columna del microscopio en los ejes ortogonales (X, Y / Z) en el rango (± 1 mm / ± 0.4 mm) y en nuestro TEM puede inclinarse en un eje de giro (α tilt) en el rango $\pm 80^\circ$ (gracias a la configuración de pieza polar de tipo CR). Estos movimientos se realizan mecánicamente por motores paso a paso o motores piezoeléctricos, como puede verse en la figura 1.10.

El mecanismo de giro del goniómetro está mecánicamente diseñado y calibrado para inclinar la muestra sin sufrir un gran desplazamiento del área de interés. Esto se consigue buscando la inclinación eucéntrica, desplazando la posición de la rejilla en la dirección del eje Z hasta que la zona de interés coincida con la misma altura Z del eje de giro α del goniómetro. Esta altura Z, conocida como altura eucéntrica, es fundamental en experimentos de tomografía y también se suele utilizar como altura de referencia dentro del microscopio para realizar todos los alineamientos. El goniómetro está calibrado para que utilizando el porta-rejillas más habitual, combinando un valor estándar de OL y situando la rejilla en el plano del eje Z que coincida con la altura eucéntrica, la configuración coincida con un estado de sub-enfoque cero o plano focal (*in-focus plane*).

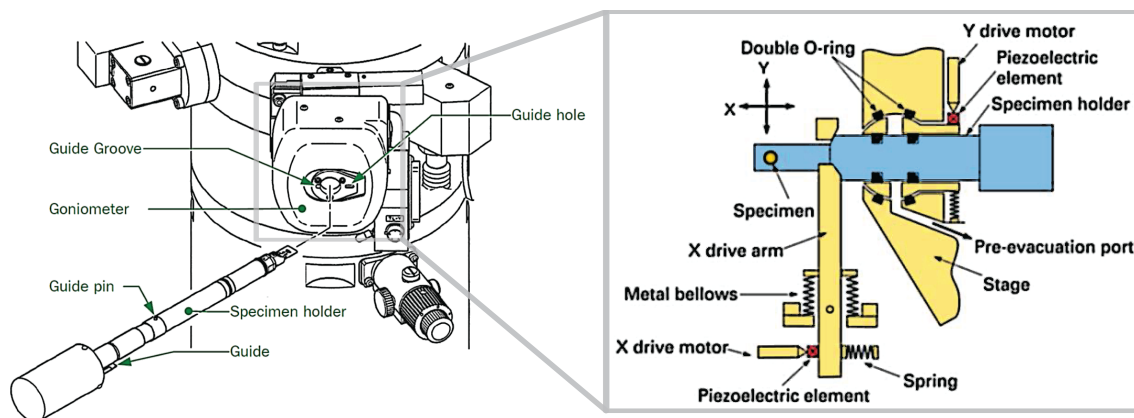


Figura 1.10: Esquema de la inserción del porta-muestras en la columna de un TEM a través del goniómetro y esquema del mecanismo motorizado de un goniómetro

Filtro de energía en columna

Existen filtros de energía incluidos en la columna del TEM (Tsuno, 2004) que funcionan como espectrómetros de energía capaces de separar y seleccionar los electrones con un valor específico de energía cinética (Egerton, 2011). El TEM del CIC bioGUNE dispone de un filtro de energía Omega (Ω) en columna que forma parte del sistema de len-

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

tes para la formación de imagen y está diseñado para minimizar la distorsión. El filtro omega se instala entre las lentes intermedias y proyectoras, y esta formado por 4 electroimanes. La trayectoria de los electrones dentro del filtro tiene forma de Ω , como puede verse en la figura 1.11. El campo magnético producido por el grupo de dos electroimanes superiores y los otros dos inferiores tiene sentido opuesto.

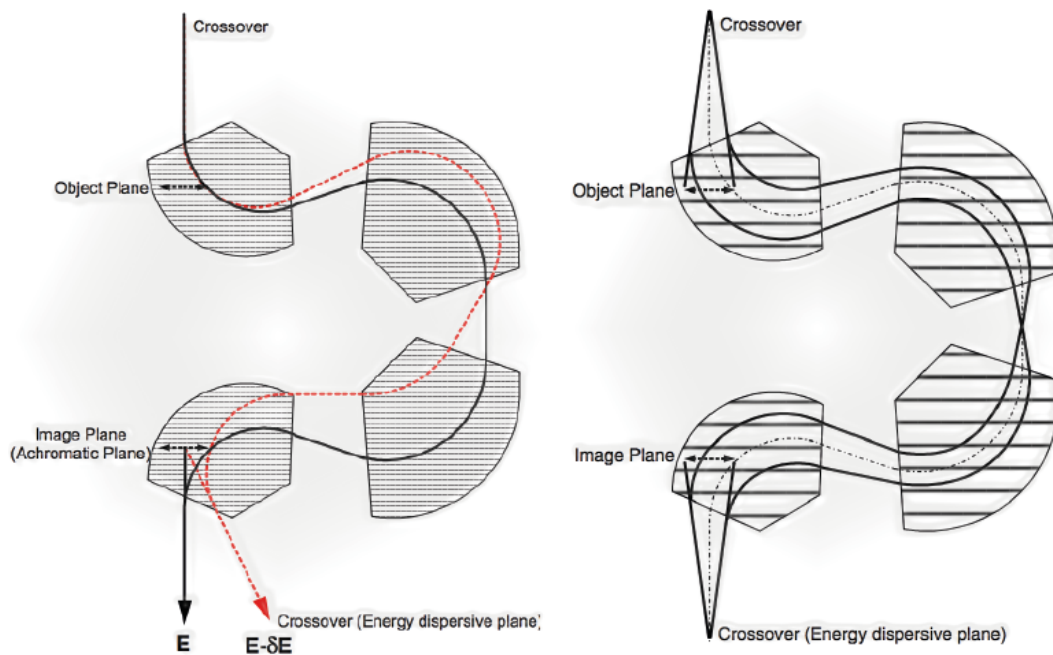


Figura 1.11: Esquema del filtro de energía Omega (Ω) en un TEM

Con un filtro de energía es posible filtrar los electrones en función de su energía y generar imágenes sin pérdida de energía (*zero-loss imaging*), i.e., el filtro solamente permite atravesar a los electrones que tengan una energía cinética cercana a la energía primaria (incidente) (Schröder et al., 1990; Langmore & Smith, 1992).

Otra aplicación del filtro de energía es la identificación de la composición química y la cuantificación de los elementos químicos en la muestra, utilizando la información contenida en los espectros de pérdida de energía y la teoría de EELS. Cuando la energía del pico de absorción de un elemento específico es seleccionada y aislada del resto, es posible crear un mapa del elemento en la imagen (*energy-loss image*), como puede verse en la figura 1.12. Luego para poder realizar un mapa de elementos se sitúa la apertura del filtro de energía (*energy slit*) en la región del espectro de energía que aísla los electrones inelásticamente dispersados que han excitado los electrones de un nivel del núcleo de un átomo específico de ese elemento a una energía cuantizada (picos de ionización o *core loss energy* o *inner shell edge*). Sin embargo, estos electrones inelásticos con un valor

de pérdida de energía cuantizada constituyen sólo una pequeña fracción del haz total de electrones (<1 %), por lo que para poder crear un mapa de elementos químicos en una imagen la dosis total en la muestra tiene que ser muy alta. Esto limita el método a muestras que no se dañen con una alta radiación de electrones (muestras inorgánicas o secciones de muestras biológicas embebidas en resina), y no se puede aplicar a muestras biológicas vitrificadas (hidratadas-congeladas).

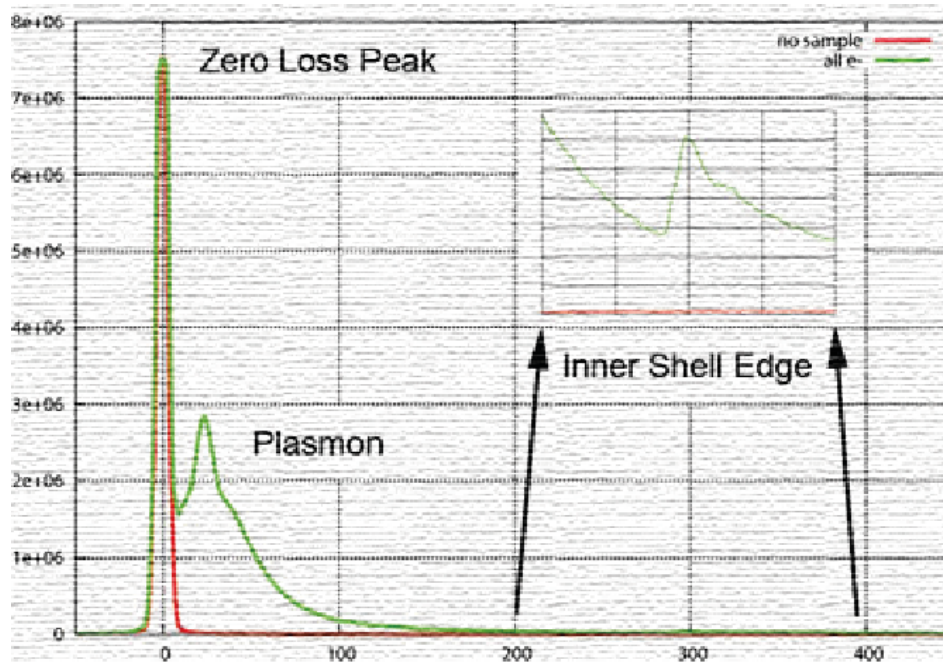


Figura 1.12: Ejemplo de un espectro de energía obtenido gracias a un filtro de energía

Detector de electrones

Los detectores digitales permiten una inspección instantánea de las imágenes y son necesarios en esquemas de adquisición automática de datos (Stagg et al., 2006). El dispositivo de captura de imagen digital puede ser una cámara CCD o una cámara de detección directa.

Una CCD es un dispositivo 2D digital de conversión fotoeléctrica basado en tecnología de semiconductores. Para la detección del haz de electrones, los electrones son convertidos en luz (fotones) por una emulsión fosforescente (*scintillator*), que finalmente inciden sobre un chip CCD. Cuando el chip CCD es irradiado con estos fotones, se acumulan cargas de electrones en pozos de potencial, que son transferidos a sucesivos pozos y finalmente se utilizan como señal eléctrica, que contiene las cuentas de fotones detectados (directamente relacionado con el número de electrones que indican en el material fluo-

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

rescente). Para eliminar la corriente oscura de la CCD se enfría el chip a -30°C usando un enfriador Peltier. La resolución del nivel de grises viene determinada por el número de bits utilizados por pixel, que en nuestra cámara son 16 bits. El rango dinámico del detector se define como la relación entre la señal máxima posible frente a la señal de ruido total, y es equivalente al rango de contraste en una fotografía o capacidad de distinguir entre luz/oscuridad. Para mejorar el rango dinámico de la CCD es necesario realizar periódicamente una calibración completa del detector (*set bias levels*) y una calibración de ganancia (*gain reference*) justo antes de cada sesión con el TEM. Para muestras sensibles a la dosis de electrones como son las muestras biológicas vitrificadas es de suma importancia que el haz solamente ilumine la muestra durante el tiempo de exposición en la adquisición de una imagen. Durante el resto del tiempo el haz debería ser desviado (*blanked*) para evitar radiación innecesaria sobre la muestra. En el TEM del CIC bioGU-NE el controlador de la cámara CCD de Gatan consigue realizar un blanking del haz, conmutando la bobina de la lente de inclinación del cañón (*gun tilt*) a una configuración en la que el haz se desvía lejos de la muestra. Para evitar que las imágenes finales no sean sobre- ni sub-expuestas al haz de electrones, es necesario utilizar un rango de cuentas predeterminado, de forma que las cuentas medidas en cada píxel del detector durante una sesión deben estar en este rango de cuentas (las cuentas en las imágenes de una CCD están directamente relacionadas con el número de electrones que detecta el sensor en cada pixel). Las cuentas promedio en cada píxel pueden ser controladas ajustando el tiempo de exposición del detector. Este tiempo de exposición debe ser ajustado en un rango donde el efecto de deriva, y el efecto de manchado debido a tiempos de exposición excesivamente cortos sean minimizados, evitando de esta forma la sobre- o sub-exposición. La dosis total sobre la muestra se define como la energía de radiación absorbida por área de muestra y por tiempo, y se mide en electrones por área por segundo $e^{-1}\cdot\text{\AA}^2\cdot s$. La dosis sobre la muestra depende de la configuración del sistema de iluminación (*spot size* y *brightness*), de la magnificación (a mayor magnificación los mismos electrones irradian un área menor) y del tiempo de exposición en el detector. En nuestro TEM la medida de la dosis no se hace directamente sino que se utiliza un detector con una emulsión de fósforo que nos da una medida en pico-Amperios por área pA/cm^2 . La dosis de radiación en $e^{-1}\cdot\text{\AA}^2\cdot s$ sobre la muestra se puede calcular aproximadamente utilizando las curvas que se muestran en la figura 1.13, las cuales dependen de la magnificación nominal.

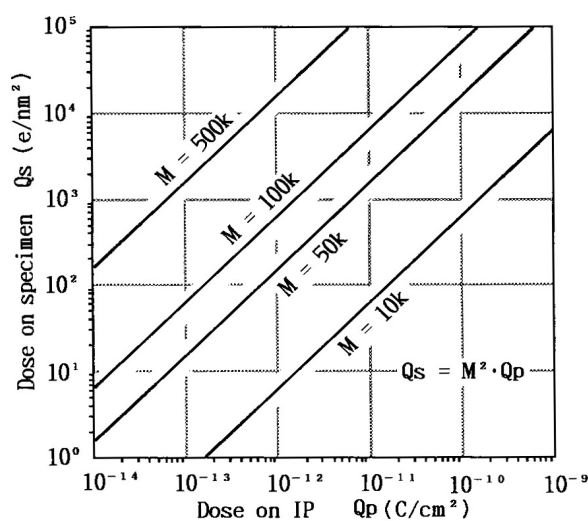


Figura 1.13: Gráfica para el cálculo de la dosis total de electrones sobre la muestra en función de la magnificación

1.4 Objetivos de la tesis

El objetivo principal de la tesis es el desarrollo de un nuevo esquema de control para la adquisición automática de datos en el TEM del CIC bioGUNE, utilizados para experimentos cryo-EM. Este esquema tiene que permitir el control remoto del microscopio y monitorizar en tiempo real el proceso de la adquisición y el análisis de las imágenes en una sesión cryo-TEM en modo automático. Para su consecución se han planteado los siguientes hitos:

- *Integración del conocimiento de un experto en el esquema de control.* Uno de los objetivos de este proyecto es crear un nuevo esquema de control inteligente que lleve a cabo la misma tarea y de forma similar a cómo lo realizaría un microscopista experto en sesiones cryo-TEM. Este nuevo esquema de control tiene que poder realizar una navegación automática a través de una rejilla de microscopía con agujeros, identificando la posición de los mismos y moviendo el goniómetro automáticamente, sin necesidad de utilizar un *atlas* de toda la rejilla y siguiendo al menos el mismo ritmo de trabajo que un usuario experto en el TEM.
- *Evaluación de las imágenes en tiempo real.* El sistema de automatización debe proporcionar un método efectivo para la adquisición de un gran número de imá-

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

genes de alta calidad, pudiendo evaluar “*in-situ*” la validez y calidad de cada una de las imágenes generadas en el microscopio. Hasta ahora no era posible evaluar de forma automática y en tiempo real los datos adquiridos en sesiones cryo-TEM, y en el caso de una sesión cryo-TEM no supervisada, el resultado podría ser de muy mala calidad. La presencia de un exceso de contaminación, una mala elección de la zona del agujero a irradiar, una mala elección del cuadrante de la rejilla, un grosor de hielo inadecuado, áreas de la rejilla con agujeros vacíos debido a la rotura de la capa de carbón, agregación, pobre concentración de partículas, o muestras dañadas, podrían reducir drásticamente el tamaño final del set de imágenes provechoso. Para realizar esto es necesario poder detectar automáticamente el número de partículas de contaminación y la distribución de las partículas individuales válidas. Además se debe evaluar la CTF de cada una de las imágenes para eliminar las que estén fuera de un rango de sub-enfoque predefinido y las que tengan astigmatismo o deriva.

- *Validación del esquema de control frente a un TEM no ideal.* Los esquemas basados en *atlas* o en áreas preseleccionadas de la rejilla no siempre funcionan bien con microscopios de la anterior generación como el instalado en el CIC bio-GUNE. Estos TEM utilizan porta-rejillas externos, sufren histéresis en sus lentes, son sensibles a diferentes fenómenos ambientales y tienen goniómetros no tan estables como los actuales. En este contexto, resulta esencial crear una estrategia de control diferente y más inteligente, que imite el comportamiento de un experto y sea capaz de tomar decisiones para superar cada una de las dificultades que puedan surgir durante una sesión cryo-TEM en modo automático.
- *Integración en un sistema totalmente automatizado desde la adquisición de datos hasta la reconstrucción 3D del complejo biológico en estudio.* Ya sea para hacer más accesible la técnica de cryo-EM a todo tipo de investigadores o para ayudar a los investigadores expertos, resultaría de gran utilidad disponer de una herramienta que automatice cada una de las etapas del proceso de reconstrucción 3D de un complejo biológico por cryo-EM, incluyendo la etapa de adquisición automática de datos, la corrección de la CTF, la selección de las partículas individuales válidas, el alineamiento, la clasificación y la reconstrucción 3D de estos complejos, utilizando por ejemplo “*projection matching*”.

1.5 Estructura de la tesis

La memoria de esta tesis se organiza en 6 capítulos y un anexo. Se ha incluido también un glosario de abreviaturas y algunos términos en inglés que no son traducidos en el texto.

En el Capítulo 1 se describen los detalles técnicos del TEM dedicado a experimentos cryo-EM disponible en la actualidad en el CIC bioGUNE, poniendo énfasis en una descripción exhaustiva de los diferentes componentes del microscopio electrónico y las principales diferencias del equipo del CIC bioGUNE con los microscopios de última generación del mercado. Esto es necesario para describir los objetivos principales de esta tesis.

En el Capítulo 2 se realiza una descripción de la técnica de cryo-EM para la reconstrucción tridimensional (3D) de complejos biológicos, haciendo una breve introducción a la biología estructural y explicando el estado del arte de esta técnica. Para una mejor comprensión del nuevo método de control inteligente descrito en esta tesis es necesario explicar en detalle un experimento completo de crio-microscopía electrónica para la reconstrucción 3D de un complejo biológico: desde la preparación de muestras, la formación de imagen por contraste de fase, la evaluación de la calidad de estas imágenes, la selección de partículas individuales y el método de partículas individuales para la reconstrucción 3D de estos complejos biológicos. En este capítulo también se describe brevemente uno de los métodos utilizados para la purificación de complejos biológicos con el objetivo de explicar el origen de la heterogeneidad en una muestra purificada. Además, se describirán los diferentes complejos biológicos utilizados en la parte experimental de esta tesis para validar los diferentes módulos del nuevo esquema de control (ribosomas eucariota, ribosomas procariotas y virus icosaédricos).

El Capítulo 3 está dedicado a la descripción de la teoría de los diferentes modelos matemáticos utilizados en este trabajo. Por un lado se hace una descripción de los diferentes algoritmos de inteligencia artificial y los principios matemáticos que forman el sistema experto desarrollado. Este sistema experto hace al esquema de control más inteligente, e incluye un sistema de inferencia difusa (FIS) para tomar decisiones en tiempo real y diferentes sistemas de inferencia neuro-difuso adaptativo (ANFIS) que conforman un sistema de identificación de partículas. Por otro lado se realiza una introducción a la visión

1. MOTIVACION Y OBJETIVOS

artificial describiendo en detalle los diferentes algoritmos de procesamiento digital de imagen utilizados para la detección automática de objetos, como son los diferentes tipos de filtros para la mejora de contraste y reducción de ruido, las diferentes estrategias de segmentación de imagen utilizadas y la medición de características de los objetos detectados en las imágenes segmentadas.

En el Capítulo 4 se presenta el desarrollo del nuevo esquema de control para la automatización de la adquisición de datos en el TEM de la compañía Jeol del CIC bioGUNE, y el sistema para la evaluación de la calidad de las imágenes en tiempo real. Se presentará un esquema del modo de trabajo de este novedoso esquema de control, describiendo los diferentes módulos programados para las diferentes tareas a realizar durante una sesión. En este capítulo se describirá por un lado la programación del sistema para la toma de decisiones basado en un sistema de inferencia difusa, y por otro lado la programación y entrenamiento de los diferentes sistemas de inferencia neuro-difuso adaptativo que forman parte del sistema de identificación de partículas individuales.

En el Capítulo 5 se mostrarán los resultados experimentales del esquema de control inteligente que incluye la toma de decisiones, junto con el diseño y la validación final del sistema de identificación de partículas en tiempo real. Para el desarrollo y la validación de este nuevo sistema automático de identificación de partículas se han utilizado dos muestras diferentes estudiadas por el grupo de investigación en biología estructural del biólogo Dr. Mikel Valle (CIC bioGUNE). Una de esas muestras ha surgido de la colaboración que mantiene el Dr. Mikel Valle con el grupo de investigación en homeostasis de proteínas de la Dra. Rosa Barrio (CIC bioGUNE). Por otro lado los diferentes algoritmos y los sistemas de inferencia difusa utilizados en el desarrollo de este nuevo esquema de control inteligente han sido supervisados por los físicos: Dr. Aitor Josu Garrido y la Dra. Izaskun Garrido (UPV/EHU).

En el Capítulo 6 se reúnen las principales conclusiones extraídas a lo largo de las diferentes etapas en esta tesis y se presentan las líneas futuras de investigación.

El Anexo recoge alguno de los programas en matlab para la automatización del TEM del CIC bioGUNE. A continuación se numeran las publicaciones que han sido directamente resultado de este trabajo y las relacionadas con la tesis. Finalmente se presentan las referencias a publicaciones.

Capítulo 2

Antecedentes: TEM en biología estructural

Conocer la estructura tridimensional de las macromoléculas biológicas y la manera en que interactúan entre ellas contribuye a entender el funcionamiento de los sistemas biológicos. En biología estructural convergen un amplio rango de técnicas mutuamente complementarias que utilizan diferentes fenómenos físicos para caracterizar la muestra: este enfoque multidisciplinario permite una descripción más completa y coherente de los fenómenos biológicos a nivel molecular. Los principios básicos de las técnicas más comúnmente empleadas en biología estructural (tales como la resonancia magnética nuclear (NMR), microscopía de fuerzas atómica (AFM) o la difracción de cristales por rayos X) son compartidos por las bien conocidas herramientas de diagnóstico médico como la tomografía axial computarizada por rayos-X, la imagen por resonancia magnética (MRI) o la tomografía por emisión de positrones (PET). La microscopía electrónica ha sido una rama emergente de la biología estructural que llena el vacío existente entre la microscopía de luz (óptica) y la cristalografía de rayos-X. Se utiliza para estudiar una amplia gama de procesos biológicos fundamentales incluyendo la síntesis de proteínas, el transporte en membranas, la transducción de energía, el proceso de infección de un virus, etc. Desde que a mediados del siglo pasado la microscopía electrónica revelase por primera vez la arquitectura de las células (Palade, 1952; Porter et al., 1945) o los ribosomas (Palade, 1955) de forma muy general, la técnica ha evolucionado de forma que en la actualidad permite caracterizar macromoléculas biológicas con gran precisión. Independientemente de la resolución, la microscopía electrónica se ha convertido en una

técnica esencial en el área de la biología estructural para obtener información 3D de múltiples complejos macromoleculares mediante técnicas tales como la reconstrucción por tomografía, cristalografía 2D de proteínas de membrana por TEM o el análisis de partículas individuales (cryo-EM). El estudio por microscopía electrónica ha sido históricamente complementario a otras técnicas de mayor resolución, como es la cristalografía de rayos X y RMN, y ha permitido estudiar grandes complejos macromoleculares que no forman cristales 3D sin necesidad de utilizar grandes concentraciones de muestra. A menudo ha sido la única técnica capaz de estudiar diferentes estados conformacionales de algunos complejos biológicos debido a que una de sus virtudes principales es que permite capturar y caracterizar eventos dinámicos. Como veremos en este capítulo en la actualidad es posible resolver mapas de densidad 3D por cryo-EM con suficiente resolución para construir *de novo* el modelo atómico de las macromoléculas en estudio.

2.1 Descripción de la técnica cryo-TEM

La técnica de cryo-TEM nació con el desarrollo de un nuevo método para inmovilizar macromoléculas biológicas y mantenerlas dentro del alto vacío de un TEM en un estado hidratado (Dubochet & McDowell, 1981; Dubochet et al., 1987). Mediante esta técnica, las muestras son vitrificadas y después visualizadas en un TEM a temperaturas criogénicas, lo que permite un análisis detallado de la nano-estructura de la muestra en un estado nativo muy cercano al fisiológico.

En las imágenes obtenidas por cryo-TEM la muestra hidratada-congelada, embebida dentro de una fina capa de hielo amorfo, ofrece muy bajo contraste en las imágenes porque las secciones transversales por dispersión elástica de los complejos biológicos y el hielo amorfo son muy similares. Como se explica más adelante, se utiliza el contraste de fase para la formación de imagen por cryo-TEM, por lo que es necesario sub-enfocar la imagen para obtener suficiente contraste entre la proyección de la muestra y el hielo (*background*). Además, las muestras biológicas son extremadamente sensibles a la radiación de electrones (Egerton, 2012; Egerton et al., 2004) y es necesario utilizar dosis de electrones mínimas (*low electron dose imaging*) durante la adquisición para minimizar el daño por radiación. Las imágenes que se obtienen en sesiones de cryo-TEM a mínima dosis pueden utilizarse para generar reconstrucciones 3D utilizando el análisis de

partículas individuales, como se verá en la siguiente sección de este capítulo. En esta tesis el término cryo-TEM se refiere a la técnica de observación de una muestra vitrificada en un TEM a temperatura de nitrógeno líquido y cryo-EM a la técnica de reconstrucción 3D (análisis de partículas individuales) que utiliza imágenes obtenidas mediante cryo-TEM.

2.1.1 Preparación de muestras para cryo-TEM

Las muestras biológicas consisten en un 70-80% de agua líquida, lo que implica que para poder introducir estas muestras dentro del alto vacío de un TEM, el agua en la muestra tiene que ser eliminada (tiñéndola usando sales de metales pesados), substituida (embebida en plástico) o solidificada (vitrificada). De lo contrario el alto vacío inducirá una evaporación inmediata del líquido (Bozzola & Russell, 1999). Una muestra preparada para un TEM debe ser lo suficientemente fina (idealmente $<500\text{ nm}$) para permitir que suficientes electrones pasen a través de la muestra. Esto requiere que el soporte sea lo más fino posible, de forma que maximice el espacio para la muestra. Para poder preservar la muestra en un estado casi fisiológico, cercano al nativo en el solvente, se utiliza una técnica de congelación ultra-rápida en etano líquido (vitrificación) (Dubochet et al., 1988; Dubochet & McDowell, 1981). Una congelación ultra-rápida convierte el agua líquida en hielo amorfo de baja densidad, comparable al vidrio, preservando la integridad de la muestra embebida. El grosor de la capa de hielo puede variar en la misma rejilla desde 10 nm hasta 500 nm.

Las imágenes resultado de una sesión cryo-TEM contienen proyecciones 2D de una muestra 3D. Si el objetivo de la sesión cryo-TEM es la reconstrucción 3D de muestras biológicas resulta de vital importancia una buena preparación de muestra. Entre otros factores, es necesario ajustar la concentración de la muestra para tener suficientes partículas por imagen y a la vez una buena dispersión evitando que se agreguen. El hielo también tiene que ser lo más fino posible pero que pueda contener la muestra, lo cual dependerá de su tamaño (Orlova & Saibil, 2011). El grosor de hielo nunca debe superar los 500 nm dado que en una capa de hielo más ancha se incrementan las dispersiones múltiples e inelásticas de electrones, reduciendo drásticamente la relación señal/ruido (SNR) en las imágenes.

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

Para vitrificar las rejillas se emplea el equipo *Vitrobot Mark II* de la compañía FEI, que permite hacer más reproducible el proceso de vitrificación de rejillas para experimentos cryo-TEM. Gracias a este equipo el proceso de criofijación se realiza en condiciones físicas y mecánicas constantes, como son temperatura, humedad relativa, condiciones de uso del papel de filtro y velocidad de congelación. La criofijación de muestras hidratadas, manteniendo las rejillas en una atmósfera controlada, permite evitar la evaporación y la transferencia de calor, lo cual podría producir artefactos causados por cambios de concentración, pH, fuerzas iónicas, y/o de temperatura. Esto hace que al terminar el proceso tengamos la muestra vitrificada en una fina capa de hielo manteniendo su estado original en disolución, sin alterar su nano-estructura (Bellare et al., 1988; Frederik & Hubert, 2005; Friedrich et al., 2010).

Elección del tipo de rejilla

El soporte más común es una rejilla, normalmente de cobre, con forma de disco de 3 mm de diámetro y un patrón en forma de cuadrícula, cubiertas con una fina capa de carbón de un grosor entre 20-50 nm, ver figura 2.1.

Las rejillas cubiertas con una cobertura de carbón completa sobre toda la rejilla son normalmente empleadas en experimentos de tinción negativa o *negative stain* (NS) (Palade, 1952). La tinción negativa utiliza sales de metales pesados (como son tetróxido de osmio, molibdato de amonio o acetato de uranilo). La tinción cubre todas las áreas donde no esté la muestra con una fina capa de la sal. Después de teñir y dejar secar la rejilla se observa en un TEM a temperatura ambiente. Las imágenes muestran áreas no teñidas que corresponden a las huellas del complejo macromolecular en el carbón. La tinción negativa se suele utilizar como método de análisis de la calidad de la purificación de la muestra, así como para verificar si la rejilla contiene una población homogénea de complejos macromoleculares idénticos y aislados (partículas individuales). También se emplea para realizar análisis preliminares 2D utilizando métodos de clasificación (Scheres, 2010; Sorzano et al., 2010). En NS la resolución viene limitada por el tamaño del grano de la sal. La mayor desventaja de esta técnica es la exposición del complejo a condiciones no-nativas durante el proceso de tinción, lo que produce aplastamiento y deformación en la estructura 3D de la muestra.

Otro tipo de rejillas son las agujereadas irregulares (*lacey*) con orificios de desigual tamaño y menos carbón. En cryo-TEM, estas rejillas ofrecen en ocasiones una mejor distribución de la muestra, pero los métodos convencionales no permiten utilizarlas para automatizar la adquisición de datos en un TEM.

Las rejillas agujereadas (*holey*) por el contrario, tienen orificios idénticos de unas pocas micras de diámetro (entre 1.2 – 3.5 μm) y regularmente espaciados por todo el carbón de la rejilla. En estas rejillas la muestra se extiende a través de los agujeros donde son vitrificadas y observadas utilizando el haz de un TEM, lo que evita la interferencia con el fondo y ofrece mayor SNR. En ocasiones, la muestra no se extiende bien por los agujeros y es necesario utilizar rejillas con una fina capa de carbón depositada por toda la rejilla.

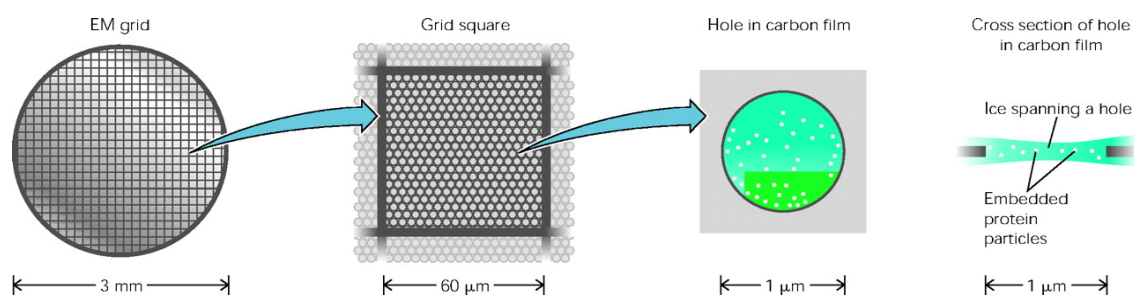


Figura 2.1: Esquema básico de una rejilla y la preparación de muestras para cryo-TEM. Imagen de Wang & Sigworth, 2006

Estas rejillas pueden ser hechas de una gran variedad de materiales y forma de agujeros, pudiendo ser personalizadas dependiendo de la muestra (Ermantraut et al. 1998; Quispe et al. 2007). El número de cuadrículas por disco (*mesh size*) puede variar normalmente entre 100-400 *mesh*. Las rejillas comerciales más comúnmente utilizadas son rejillas de cobre, níquel u oro de la compañía Quantifoil (Micro Tool GMBH, Jena, Germany): *Quantifoil grid* (Cu/Ni/Au 200/300 *mesh*, R1.2/1.3, R 2/1, R 2/2, R2/4, R3.5/1). El modelo R2/1 tiene agujeros circulares de 2 μm de diámetro y separados 1 μm entre ellos, R2/2 tiene agujeros circulares de 2 μm de diámetro y separados 2 μm entre ellos, R3.5/1 tiene agujeros circulares de 3.5 μm de diámetro y separados 1 μm entre ellos, o el modelo R1.2/1.3 con agujeros de diámetro 1.2 μm en todo el carbón de la rejilla y separados 1.3 μm entre ellos. También existen las rejillas modelo *C-flat* (Cu 200 *mesh*, CF-1.2/1.3, CF-2/2, CF-2/1) que suelen producir un grosor de hielo más fino y regular, y se suelen utilizar para analizar por cryo-TEM complejos de bajo peso molecular. En este trabajo

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

se han empleado rejillas comerciales de la compañía *Quantifoil R2/2 200 mesh*. Para disminuir el movimiento que sufren las macromoléculas vitrificadas en presencia del haz de electrones, se están desarrollando en la actualidad nuevos tipos de rejillas mejoradas con agujeros más pequeños (Marr et al., 2014), o cubiertas por una fina capa de grafeno adecuadamente tratado con un plasma (Pantelic et al., 2011; Russo & Passmore, 2014).

Protocolo de vitrificación

Debido a la presencia de una capa de carbón, la superficie de la rejilla es hidrofóbica, lo que limita la adsorción de la muestra en suspensión. Con el objetivo de hidrofilar las rejillas se realiza una descarga de iones creando un plasma con el aire residual (Dawson & Adkins, 1995). El aire es un gas compuesto por nitrógeno (78%), oxígeno (21%), y otras sustancias (1%), como ozono, dióxido de carbono, hidrógeno y gases nobles (como kriptón y argón). El aire es un gas aislante, donde la conductividad eléctrica es extremadamente baja, pero si se aplica un campo eléctrico intenso los electrones del aire se pueden separar de sus átomos, luego se ionizan, generando este nuevo estado de la materia que es el plasma.

Para conseguir la formación del plasma, la Plataforma del CIC bioGUNE dispone del equipo *MED-020 high-vacuum coating system* (Bal-Tec, Liechtestein), en el cual el aire se ajusta a un valor de $2 \times 10^{-1} \text{ mbar}$ y un campo eléctrico entre el cátodo y el ánodo de 10 mA. Este campo eléctrico, a esa presión de aire, se aproxima al valor de rotura y hace que los electrones libres alcancen una aceleración suficiente para crear electrones libres adicionales mediante la colisión y la ionización de los átomos del aire. Este proceso es denominado rotura en avalancha (Aebi & Pollard 1987). El proceso de rotura forma un plasma que contiene un número significativo de electrones móviles y de iones positivos, por lo que se comporta como un conductor eléctrico. Las rejillas se hidrofilizan tratándolas con este plasma de aire ionizado durante 90 segundos.

Después de hidrofilar las rejillas, una pequeña cantidad de muestra (normalmente 3.5-4 μl), a una concentración de aproximadamente 0.1-2 mg/ml es adsorbida durante un minuto en una de estas rejillas dentro de la cámara del *Vitrobot* con la humedad y temperatura controladas (normalmente se utilizan 4°C de temperatura y 100% de humedad relativa) (Dubochet et al., 1982; Iancu et al. 2006; Grassucci et al. 2007). La mayor parte

del líquido es eliminado por dos papeles de filtro (*blotting*) de forma que queda una fina capa de muestra líquida en la rejilla (ver figura 2.2). Esta es rápidamente sumergida en un recipiente metálico con etano líquido previamente licuado y enfriado con nitrógeno líquido a una temperatura cercana al punto de fusión del etano, aproximadamente a -180 °C. Gracias a la gran capacidad calorífica del etano la velocidad de congelación es muy elevada y esto evita la formación de cristales de agua. La velocidad de enfriamiento ultra-rápida del etano es más apropiada que la del nitrógeno líquido.

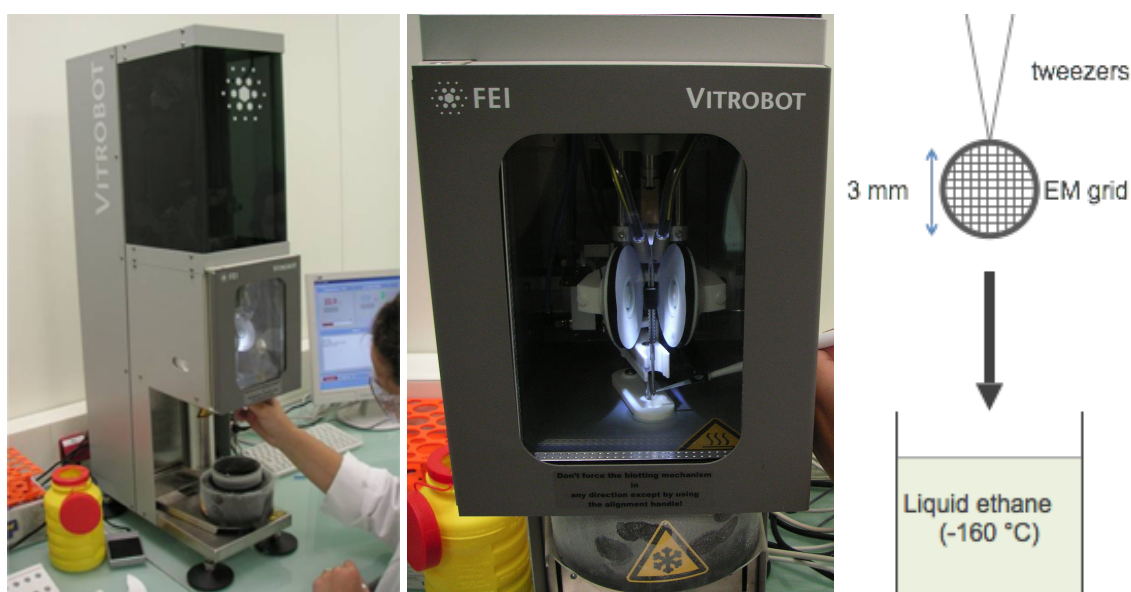


Figura 2.2: Imagen y esquema del proceso de vitrificación con el Vitrobot del CIC bioGUNE

Transferencia de la rejilla vitrificada en el vacío del TEM

Después de ser vitrificadas las rejillas tienen que mantenerse a una temperatura de nitrógeno líquido durante su transferencia, manipulación y análisis dentro del alto vacío de un TEM. Para esto se requiere equipo especializado con el objetivo de manipular e insertar dentro del TEM las rejillas vitrificadas. En esta Plataforma disponemos de varios porta-rejillas de la compañía Gatan especialmente diseñadas para cryo-TEM, que contienen un depósito (*dewar*) que debe ser llenado con nitrógeno líquido antes de cada sesión. Para cargar las rejillas en el porta-muestras se utiliza una plataforma diseñada para mantener en todo momento las rejillas vitrificadas dentro de una atmósfera de nitrógeno (lo cual evita que se descongelen o se contaminen), ver figura 2.3. Una vez que la muestra es cargada en el porta-rejillas (previamente enfriado) se tapa con una cubierta metálica que rodea la rejilla para protegerla mientras es rápidamente insertada dentro de la co-

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

lumna del TEM. Después, el porta-muestras es manualmente insertado a través del goniómetro del TEM para situar la rejilla en el eje central del haz de electrones, dentro de la columna del TEM en condiciones de muy alto vacío. Antes de ser visualizada la muestra en el TEM es necesario estabilizar la deriva térmica y mecánica, esperando a que la temperatura del porta-rejillas se estabilice a $T^a \approx -174\text{ }^\circ\text{C}$ dentro de la columna del TEM. La temperatura de la rejilla vitrificada se mantiene gracias al depósito (*dewar*) situado en el otro extremo del porta-muestras, el cual se debe mantener lleno con nitrógeno líquido para enfriar la rejilla a través de una pieza metálica que lo conecta con la punta donde ésta se sitúa.



Figura 2.3: Imágenes del proceso de transferencia de una rejilla vitrificada dentro del vacío del TEM utilizando un porta-muestras Gatan con el *dewar* lleno de nitrógeno líquido

Una vez insertada la rejilla, y para evitar posibles depósitos de contaminación (hidrocarburos o contaminación de hielo) sobre la muestra vitrificada o cualquier tipo de preparación se utiliza un dispositivo conocido como dispositivo anti-contaminación (ACD). El ACD está formado por una aleta fría (trampa), la cual está formada por dos pequeñas aperturas en el extremo situado alrededor de la rejilla, mientras que el otro extremo se enfría con nitrógeno líquido gracias a un contenedor situado en el exterior del TEM, que es necesario rellenar periódicamente (cada ~3-4 horas). El ACD funciona gracias a la acción de condensación de moléculas de gas sobre una superficie metálica expuesta al

vacío (no perfecto) mediante enfriamiento de la superficie con nitrógeno líquido. El ACD logra mejorar el vacío en la columna del TEM previniendo la contaminación sobre la muestra.

2.1.2 Formación de imagen en un TEM

Las aberraciones en la lente OL del TEM son el principal obstáculo para conseguir mayor resolución. Existen dos aberraciones principales presentes en esta lente, la aberración cromática y la aberración esférica. La aberración cromática ocurre cuando la respuesta de las lentes es dependiente de la longitud de onda de los electrones. La aberración esférica se produce cuando la respuesta de la lente varía a través de ella y significa que los electrones que incidan en diferentes zonas serán enfocadas a puntos diferentes.

Contraste de amplitud

En ciencias de materiales, las muestras compuestas por material inorgánico no sensible a la radiación de electrones se pueden analizar utilizando una dosis muy alta de electrones. Esto produce valores de SNR muy altos y grandes cambios de fase debido a los números atómicos altos que forman estos materiales. En este caso las imágenes son producidas principalmente por contraste de amplitud. Debido a que la amplitud normalizada de la función de transferencia de contraste (CTF) a bajas frecuencias espaciales es cercano a 1 (gracias a que el contraste de amplitud es un término coseno), se puede ajustar el sub-enfoque muy cerca del cero (*in-focus*) y aún así tener suficiente contraste.

El valor de foco que proporciona la máxima respuesta en frecuencia en muestras que ofrecen un alto contraste de amplitud se conoce como foco Scherzer (Scherzer, 1949) y se define como,

$$\Delta f_{Sch} \approx -\sqrt{\frac{4}{3} C_s \lambda} \quad (2.1.1)$$

donde λ es la longitud de onda de los electrones y C_s es el coeficiente de aberración esférica de la OL del TEM. Nuestro TEM está diseñado para cryo-TEM luego el valor de esta aberración es alto ($C_s=2\text{mm}$). Para un voltaje de aceleración de 200 kV, $\lambda=0.0025\text{nm}=2.5\text{ pm}$, el foco de Scherzer tiene un valor de $\Delta f_{Sch}=-85\text{ nm}$, re-

presentado por el primer cero (*zero-crossing*) de la CTF. Cuando se trabaja con muestras que ofrecen mucho contraste de amplitud las imágenes se deben producir en condiciones de foco muy cercanas al foco de Scherzer. Ajustando la lente OL a este valor de foco se crea una banda ancha de frecuencias espaciales, que también contiene las bajas frecuencias (el contraste), las cuales son transferidas con una fase similar. Por lo tanto se maximiza el contenido de información de la imagen no afectado por los ceros de la CTF, ver figura 2.5 (A).

Contraste de fase

En ciencias de la vida las muestras biológicas son altamente sensibles al daño por radiación. Éstas deben ser analizadas bajo condiciones de mínima dosis y por lo tanto las imágenes resultantes contienen bajo SNR. Bajo estas condiciones la dispersión de electrones se produce a pequeños ángulos y los objetos son considerados objetos de fase débil (*weak phase objects*) con un desplazamiento de fase de la onda de salida bastante pequeño. Además, como se ha comentado anteriormente, las muestras biológicas están compuestas de átomos ligeros (H, O, N, y C) y su contraste de amplitud es muy bajo. La resolución alcanzable a través de un TEM depende del contraste dado por la relación SNR y la distribución de frecuencias espaciales registradas en las imágenes. Esto último depende del desplazamiento de fase (*phase shift*) de la onda de salida del objeto. Lo que los electrones experimentan cuando atraviesan los complejos biológicos es un cambio de fase dependiente de la localización, producido por el potencial de Coulomb de la muestra. Estas variaciones de fase se encuentran codificadas en la onda de salida y se convierten en variaciones de amplitud en el proceso de formación de imagen de la OL, gracias a la presencia de la aberración esférica y al uso de un valor de OL que sub-enfoque la imagen, lo que forma el contraste en las imágenes de cryo-TEM. En la práctica, esto se consigue gracias a introducir un desplazamiento de fase de 90° entre la onda incidente y la dispersada. El ángulo de dispersión de los electrones elásticamente dispersados es proporcional al potencial de electrones de la muestra. La onda de salida que atraviesa la muestra se puede describir en el espacio real de la forma,

$$\Psi_{out}(\vec{r}) = \Psi_{in}(\vec{r}) \cdot \exp(i\sigma\phi_{pr}(\vec{r})) \quad (2.1.2)$$

donde Ψ_{out} es la onda de salida que emerge de la muestra; Ψ_{in} es la onda incidente; $\sigma = m_e \lambda / (2\pi \hbar^2)$; m_e es la masa del electrón; λ es la longitud de onda de los electrones del haz incidente; $\hbar = h/2\pi$; h es la constante de Planck; (\vec{r}) es un vector en el plano imagen; y $\varphi_{pr}(\vec{r})$ es la integral del potencial de Coulomb de la muestra, proyectado a lo largo de la dirección z, el cual coincide con el eje óptico del microscopio donde t corresponde al grosor de la muestra,

$$\varphi_{pr}(\vec{r}) = \int_{-t/2}^{+t/2} \varphi(\vec{r}, z) dz \quad (2.1.3)$$

Dado que las muestras biológicas en general dispersan muy débilmente los electrones, el desplazamiento de fase introducido por la muestra es pequeño y se puede describir la onda de salida por la siguiente aproximación.

$$\Psi_{out}(\vec{r}) \approx \Psi_{in} (1 + i\sigma \varphi_{pr}(\vec{r})) \quad (2.1.4)$$

donde la onda transmitida $\Psi_{out}(\vec{r})$ consiste en dos partes: el primer término corresponde a la onda no dispersada, y el segundo término corresponde a los electrones desviados (dispersados). El segundo término $\Psi_s = \Psi_{in} i\sigma \varphi_{pr}(\vec{r})$ es linealmente proporcional al potencial de la muestra y tiene un desplazamiento de fase de $\pi/2$, porque corresponde a la parte imaginaria.

En sesiones cryo-TEM con muestras pequeñas de baja densidad el contraste de amplitud solamente contribuye un $\sim 7\%$ al contraste final de las imágenes (Wade, 1992), lo que produce imágenes muy ruidosas y de bajo contraste. El contraste de fase se forma gracias a la interferencia entre el haz no dispersado y los electrones elásticamente dispersados. Si asumimos la amplitud de la onda incidente $\Psi_{in} = 1$, la distribución de intensidad observada en el plano imagen estará dado por,

$$I(\vec{r}) = \Psi_{out}(\vec{r}) \cdot \Psi_{out}^*(\vec{r}) \approx 1 + (\sigma \varphi_{pr}(\vec{r}))^2 \quad (2.1.5)$$

Sin embargo la magnitud de $(\sigma \varphi_{pr}(\vec{r}))^2 \ll 1$, por lo que la imagen enfocada (*in-focus*) no tendrá prácticamente contraste. Para incrementar el contraste, es necesario cambiar la fase del haz dispersado $\varphi_{pr}(\vec{r})$ por $\pi/2$, lo cual cambia la onda de salida como sigue,

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

$$\Psi_{out}(\vec{r}) \approx 1 - \sigma \phi_{pr}(\vec{r}) \quad (2.1.6)$$

La intensidad en el plano imagen puede entonces ser aproximada por la siguiente expresión,

$$I(\vec{r}) = \Psi_{out}(\vec{r}) \cdot \Psi_{out}^*(\vec{r}) \approx 1 - 2\sigma \phi_{pr}(\vec{r}) \quad (2.1.7)$$

En esta última expresión la intensidad es proporcional a la proyección del potencial de electrones de la muestra (o integral del potencial de Coulomb), y la magnitud de $2\sigma \phi_{pr}(\vec{r}) \gg (\sigma \phi_{pr}(\vec{r}))^2$. De esta forma la desviación de fase del haz dispersado convierte el contraste de fase antes invisible en contraste de amplitud. La forma de conseguir este tipo de contraste es utilizando las imperfecciones del microscopio como es la aberración esférica y aumentando el nivel de sub-enfoque modificando OL. Debido a la aberración esférica del microscopio y al nivel del sub-enfoque un punto en el objeto se convierte en un disco de confusión en la imagen, definido por una función de dispersión de punto (PSF) del TEM, ver figura 2.4. PSF es una función que describe las imperfecciones del TEM en el espacio real.

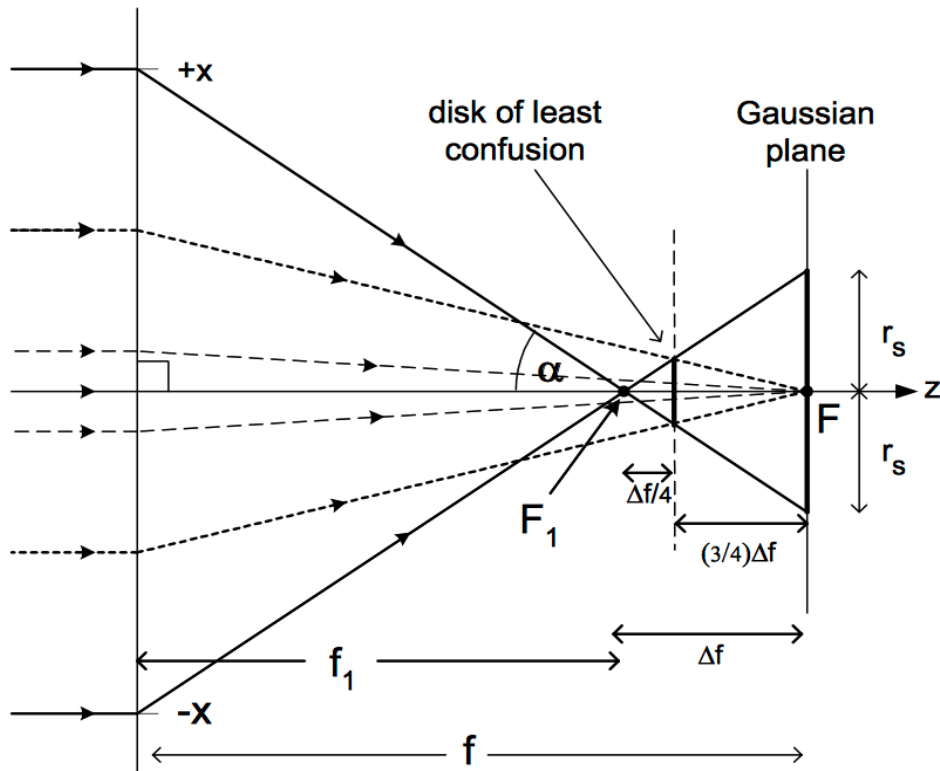


Figura 2.4: Esquema descriptivo del disco de confusión (PSF) producido por la aberración esférica de la OL en un TEM

Una forma más útil de describir la influencia de este factor en la imagen es usando el espacio de Fourier donde,

$$F\{\Psi_{imagen}(\vec{r})\} = F\{\Psi_{out}(\vec{r})\} \cdot CTF_{TEM}(\vec{R}) \cdot E(\vec{R}) + N(\vec{R}) \quad (2.1.8)$$

donde $F\{\Psi_{imagen}(\vec{r})\}$ es la transformada de Fourier de la imagen observada; \vec{R} es la frecuencia espacial (coordenadas del espacio de Fourier); $F\{\Psi_{out}(\vec{r})\}$ es la transformada de Fourier del potencial de electrones de la muestra; $CTF_{TEM}(\vec{R})$ es la función de transferencia de contraste del microscopio, que contiene el efecto de la aberración esférica y el sub-enfoque en las imágenes. Para aumentar el contraste, es necesario aumentar el valor del sub-enfoque Δf modificando la corriente en la lente OL. El aumento del sub-enfoque produce una atenuación de la información a altas frecuencias y limita la resolución alcanzable, como se ve en la figura 2.4 en el espacio real y en la figura 2.5 en el espacio recíproco (en función de la frecuencia espacial). Por lo tanto lo ideal es elegir rangos de sub-enfoque donde exista un balance entre alto contraste y la máxima información de altas frecuencias alcanzable; $N(\vec{R})$ es el ruido aditivo;

$E(\vec{R})$ es la función de envolvente, que expresa el amortiguamiento del contraste de fase al aumentar la frecuencia espacial e incluye: (i) la propia función de envolvente de la muestra, (ii) la influencia de la aberración cromática de OL producida por una limitada coherencia del haz incidente y (iii) la influencia de diferentes inestabilidades del TEM como el ruido cuántico (*shot noise*) debido a la naturaleza discreta de electrones, el movimiento de la muestra inducido por la radiación de electrones, la inestabilidad por histéresis en las lentes del TEM, las imperfecciones de estabilidad mecánica en la columna del TEM, las vibraciones producidas por el uso de un porta-rejillas externo o pérdida de resolución por condiciones ambientales (vibraciones, campos electromagnéticos parásitos, cambios de temperatura, inestabilidad del voltaje de aceleración o de la OL) entre otros factores. La frecuencia espacial a la cual la función de envolvente es *zero* se llama límite de información (máxima resolución) y también depende del detector. Es decir la máxima resolución se determina por la frecuencia espacial a la cual la función de envolvente alcanza el cero.

A esto hay que sumar el efecto de la función de transferencia de modulación (MTF) o respuesta en frecuencia del sensor detector de electrones, cuya consecuencia es la caída

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

de la transferencia de señal a altas frecuencias, limitando la resolución final obtenida en las imágenes. Por lo tanto la transformada de Fourier del PSF en la imagen digital adquirida en una CCD es como sigue,

$$F\{PSF(\vec{r})\} = F\{MTF_{CCD}(\vec{r})\} \cdot CTF_{TEM}(\vec{R}) \cdot E(\vec{R}) + N(\vec{R}) \quad (2.1.9)$$

La resolución directa en las imágenes creadas utilizando un valor de sub-enfoque determinado viene dado por el primer cero de la CTF, y la información de fase entre el primer cero y el límite de información puede ser utilizado para obtener mayor resolución utilizando algoritmos de corrección de la CTF. Los cambios de amplitud y fase producidos por la aberración de la OL, o $CTF_{TEM}(\vec{R})$, son normalmente descritos por la función $\exp(i\gamma)$, donde $\gamma(\vec{R})$ describe el desplazamiento de fase producido por la aberración esférica y el sub-enfoque de OL,

$$\gamma(\vec{R}) = -2\pi \left(\frac{1}{2} \Delta f \lambda \vec{R}^2 - \frac{1}{4} C_s \lambda^3 \vec{R}^4 \right) \quad (2.1.10)$$

donde \vec{R} es la frecuencia espacial (un vector en el *back focal plane* de la OL), C_s es el coeficiente de aberración esférica, λ es la longitud de onda del haz de electrones, y Δf es el sub-enfoque (coincide con la distancia entre el plano de imagen a partir del verdadero plano focal). La base para mejorar el contraste de la imagen es combinando la aberración esférica con el sub-enfoque modificando OL, lo que induce un aumento del desplazamiento de fase entre los electrones dispersados y no dispersados. La señal en el *back-focal plane* en la OL del TEM está dado por,

$$P(\vec{R}) = F\{\Psi_{imagen}(\vec{r})\} \cdot F^*\{\Psi_{imagen}(\vec{r})\} = (\delta(\vec{R}) - 2F\{\phi(\vec{r})\} \cos(\gamma(\vec{R})) - 2F\{\phi(\vec{r})\} \sin(\gamma(\vec{R}))) \cdot E^2(\vec{R}) + N(\vec{R}) \quad (2.1.11)$$

donde $\delta(\vec{R})$ es la función delta de Dirac, $\phi(\vec{r})$ es el contraste o término de amplitud, $\gamma(\vec{R})$ es el mapa de fase que codifica la forma o morfología del objeto y $N(\vec{R})$ es un término de ruido añadido. En el plano de la imagen, el contraste de amplitud está descrito por $2\cos(\gamma(\vec{R}))$ y el contraste de fase por $2\sin(\gamma(\vec{R}))$. Para objetos de fase débil, el término seno es el que tiene mayor influencia. Este término $\sin(\gamma(\vec{R}))$ produce el efecto descrito por la CTF en las imágenes, en forma de inversión de las fases de ani-

Los Thon alternos en la transformada de Fourier de la imagen, ver figura 2.5 (B). La distribución de intensidad en el plano de la imagen EM está relacionado con el potencial de electrones (potencial de Coulomb) proyectado de la forma,

$$I(\vec{R}) = \{\Psi_{imagen}(\vec{r})\} \cdot \{\Psi_{imagen}^*(\vec{r})\} \approx 1 + \sigma \varphi_{pr}(\vec{R}) \cdot F^{-1}\{\sin(\gamma(\vec{R}))\} \quad (2.1.12)$$

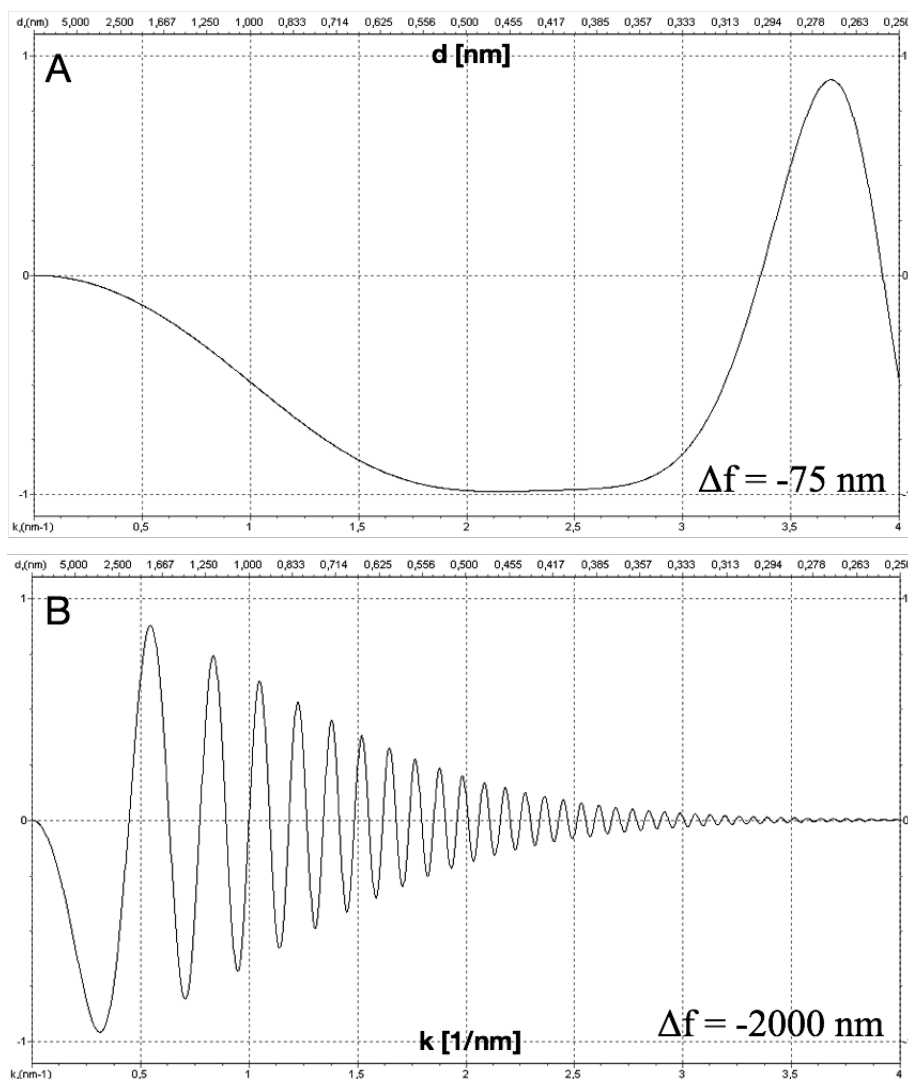


Figura 2.5: CTF a diferentes sub-enfoques (TEM 200keV, Cs=2mm, Cc=2.1mm, $\Delta E=0.5$ eV). La simulación de la CTF ha sido realizada utilizando ctfExplorer de Maxim V. Sidorov. (A) Foco de Scherzer, $\Delta f=-75$ nm. Se obtiene alta intensidad de información a altas frecuencias, pero el contraste es bajo debido a la baja amplitud a bajas frecuencias; (B) Se incrementa el valor del sub-enfoque a $\Delta f=-2000$ nm. Aumenta la amplitud de la información a bajas frecuencias pero degrada la información a altas frecuencias produciendo un efecto de modulación en el espacio de frecuencias de la imagen

En el caso de tener una muestra mixta que produzca tanto contraste de fase y contraste de amplitud, la formación del contraste en un TEM se puede describir en el espacio de Fourier, por la siguiente función CTF,

$$H(\vec{R}) = -2 \cdot e^{-2B\vec{R}^2} [(1-\Phi) \cdot \sin \gamma(\vec{R}) + \Phi \cdot \cos \gamma(\vec{R})] + N(\vec{R}) \quad (2.1.13)$$

donde $E(\vec{R}) = e^{-2B\vec{R}^2}$ representa a un factor de amortiguamiento (en forma de función de envolvente) producido por los varios factores que limitan la resolución (Glaeser & Hall, 2011; Saad et al., 2001), $\sin \gamma(\vec{R})$ y $\cos \gamma(\vec{R})$ representan las contribuciones debido al contraste de fase y contraste de amplitud respectivamente, $\Phi = F\{\phi(\vec{r})\}$ es la contribución del contraste de amplitud a la imagen (Wade, 1992) y $N(\vec{R})$ es un término de ruido añadido (Sander et al., 2003).

2.2 Análisis de Partículas Individuales (cryo-EM)

La crio-microscopía electrónica (cryo-EM) (Frank, 2006; Orlova & Saibil, 2011) es una técnica de reconstrucción 3D donde los datos de entrada son las proyecciones 2D o partículas individuales correspondientes a macromoléculas biológicas solidificadas en una fina capa de hielo vítreo (amorfo), donde el complejo se mantendrá en un estado muy cercano al nativo a nivel atómico (Taylor & Glaeser, 1974). La técnica de análisis de partículas individuales o cryo-EM permite resolver la estructura de grandes complejos biológicos en diferentes estados funcionales sin la necesidad de cristalizar el complejo y usando concentraciones mucho menores que las necesarias tanto en cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN).

En cryo-EM, una solución conteniendo una muestra purificada de macromoléculas biológicas de interés es vitrificada utilizando el protocolo descrito en la sección anterior y analizada en sesiones cryo-TEM en mínima dosis. De esta forma se pueden obtener múltiples copias de la misma macromolécula biológica aleatoriamente orientadas que se mantienen embebidas en una fina capa de hielo vítreo. Lo ideal es conseguir un grosor de hielo algo mayor del diámetro de la macromolécula en estudio. Las imágenes 2D adquiridas en una o varias sesiones cryo-TEM contienen las proyecciones 2D de muchas macromoléculas individuales aisladas y en orientaciones aleatorias que o son idénticas entre sí o se encuentran en un estado conformacional parecido (Frank et al., 1978; Gri-

gorieff 2007; van Heel et al. 1996). Estas proyecciones 2D en cryo-EM se conocen como partículas y son proporcionales a la integral de la distribución del potencial de Coulomb 3D del complejo biológico en estudio.

Durante una sesión cryo-TEM el haz de electrones incide sobre la muestra biológica causando daño por radiación a través de la rotura de uniones químicas. Luego la dosis total de electrones durante el tiempo de exposición debería ser reducido al mínimo posible, de forma que se preserve la información estructural al nivel de resolución subnanométrica (Typke et al., 2004). Esto hace que las imágenes que contienen las proyecciones 2D del complejo en estudio tengan muy poca SNR frente al fondo de hielo amorfo y para obtener la reconstrucción 3D es necesario promediar muchas partículas correspondientes a macromoléculas idénticas entre sí o similares, de forma que se mejore la SNR (De Rosier & Klug, 1968). Por lo tanto, el número total de partículas obtenidas en una o varias sesiones cryo-TEM está directamente relacionada con la resolución final de la reconstrucción 3D. Esto hace necesario el uso de sistemas de automatización para la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM.

Como hemos descrito cryo-EM no necesita utilizar la difracción de cristales 3D, sino que combina mediante procesamiento de imagen la información contenida en estas partículas, las cuales son alineadas, clasificadas y promediadas entre sí, para ser utilizadas por el algoritmo de reconstrucción 3D y crear un mapa de densidad 3D final. Combinando las partículas correspondientes a muchas macromoléculas idénticas en múltiples orientaciones diferentes que completen todo el rango espacial, es posible resolver la estructura 3D de un complejo a alta resolución. Sin embargo, para determinar esta estructura a alta resolución, es necesario promediar muchas partículas para mejorar el SNR. La resolución de la reconstrucción 3D es mejorada tras un proceso iterativo que refina los cinco primeros parámetros de alineamiento asociados a cada partícula (Frank, 1996) (ver figura 2.6).

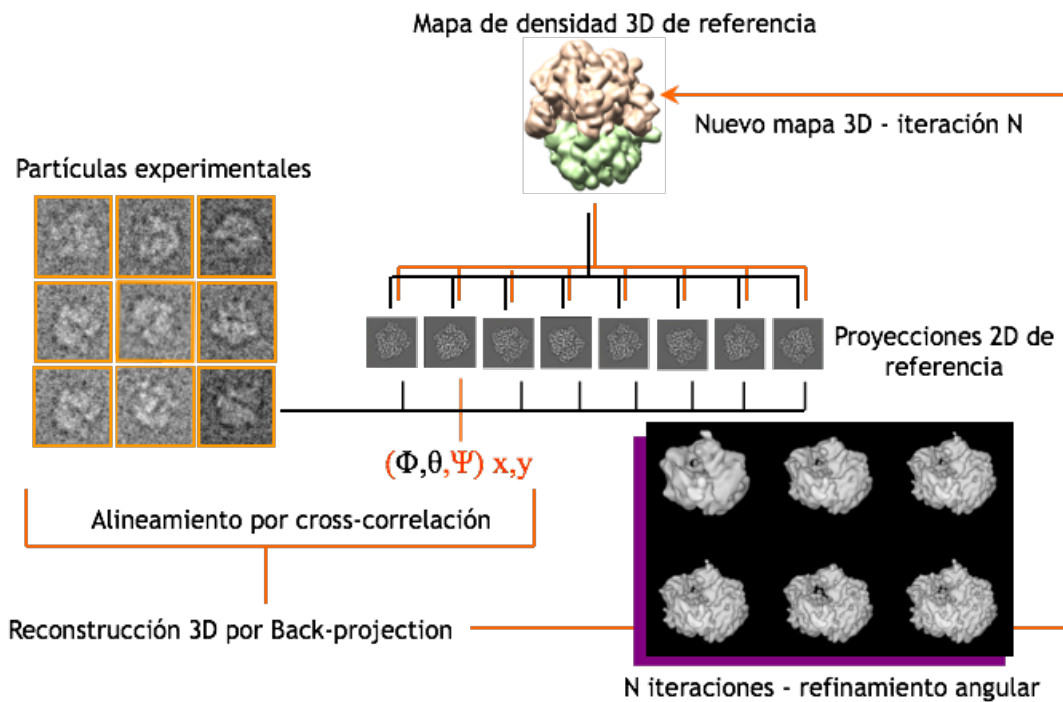


Figura 2.6: Esquema de la técnica de reconstrucción 3D cryo-EM en biología estructural

El sexto parámetro es el valor del sub-enfoque necesario para conseguir mayor resolución corrigiendo la función de transferencia de contraste (CTF) (Erickson & Klug, 1970). La reconstrucción 3D final es un mapa de densidad relativa del potencial de Coulomb de la macromolécula biológica purificada, que puede ser interpretado de la misma forma que un mapa de densidad de electrones obtenido por cristalografía de rayos X.

2.2.1 Método de reconstrucción 3D por cryo-EM

El procesamiento de imagen para la reconstrucción 3D siguiendo la estrategia de cryo-EM consiste en varios procedimientos matemáticos, como es la corrección de la CTF que produce el TEM en las imágenes, la selección de las partículas en estas imágenes, la determinación de la orientación espacial correspondiente a cada partícula, el desplazamiento y giro en el plano para alinear las partículas, la realización del promedio de las partículas asociadas a una misma orientación y finalmente la combinación de la información 2D de estas medias de proyección para reconstruir un nuevo mapa de densidad 3D de la macromolécula compleja en estudio.

Corrección de la CTF

El primer paso después de adquirir todo el set de imágenes por cryo-TEM incluye el cálculo del sub-enfoque y el astigmatismo para cada una de las imágenes. El cálculo del astigmatismo es necesario dado que hay que descartar las imágenes con alto valor de astigmatismo y deriva. Las imágenes obtenidas en un TEM son imágenes en el espacio real y contienen información de amplitud y fase. El módulo de la transformada de Fourier de cada imagen permite evaluar su calidad y eliminar las imágenes con deriva o astigmatismo (ver Figura 2.7) en el proceso de reconstrucción 3D.

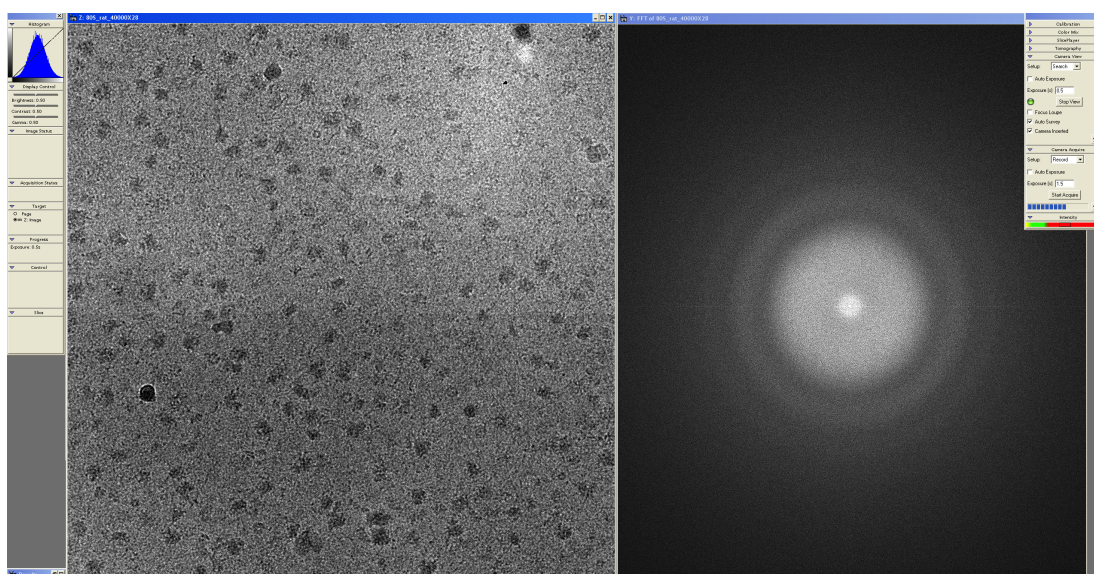


Figura 2.7: Imagen digital adquirida gracias al software DigitalMicrograph y la transformada de Fourier que muestra el efecto de la CTF en función de la frecuencia espacial

Para producir contraste de fase en el análisis de muestras biológicas vitrificadas es necesario sub-enfocar la imagen modificando el valor de OL, la cual tiene aberración esférica y produce alteraciones en los datos de las imágenes cryo-TEM. Estas alteraciones se describen como la CTF. Para una imagen perfecta la función de transferencia debería ser +1 a todas las frecuencias espaciales pero como se ve en la figura 2.8 la CTF suprime información espacial en los pasos por cero e invierte el contraste en las zonas donde la función cambia de signo. Para recuperar la información de los ceros es necesario adquirir las imágenes por cryo-TEM con diferentes valores de sub-enfoque en un rango predeterminado. De esta forma unas imágenes aportarán la información en frecuencias perdidas por otras. La CTF se puede ver como una función escalar que produce una modulación en la transformada de Fourier de la muestra en

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

forma de anillos de Thon (Thon, 1966), luego altera la información de amplitud y fase de cada partícula.

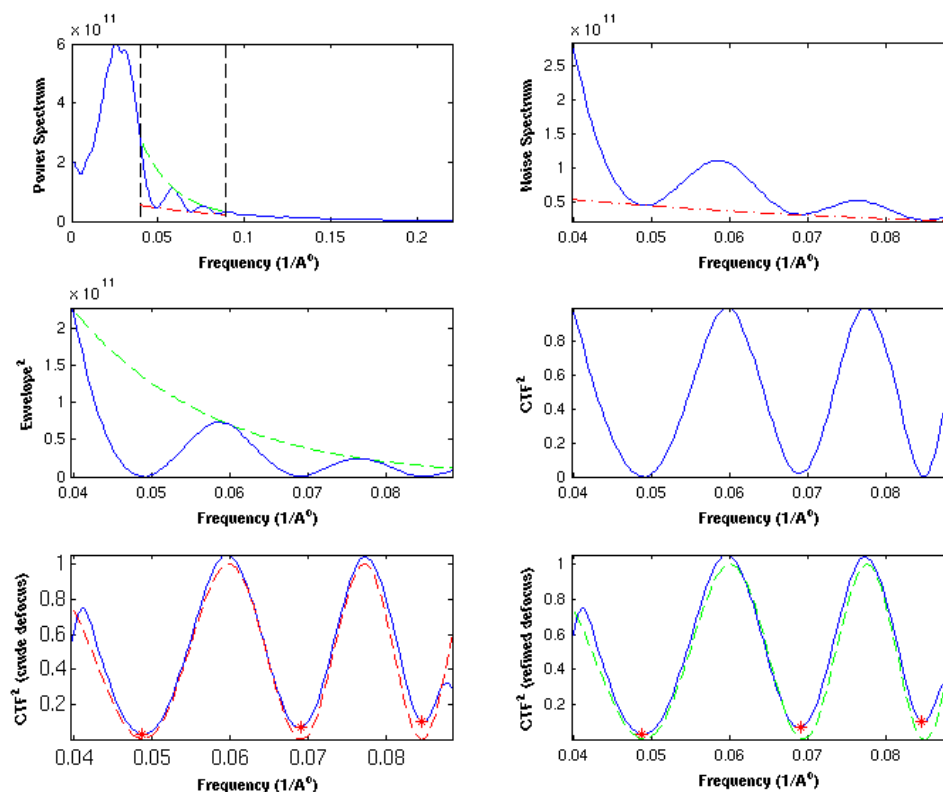


Figura 2.8: Ajuste automático de la curva de la CTF experimental utilizando un modelo teórico creado por el software ACE toolbox

Antes de utilizar las imágenes para realizar la reconstrucción 3D es necesario corregir la distorsión en amplitud y en fase que produce la CTF. Para realizar esta corrección es necesario calcular con precisión el valor del sub-enfoque en cada imagen cryo-TEM adquirida. En esta tesis el cálculo automático que ajusta la CTF teórica respecto a cada CTF experimental se ha realizado con el software *ACE toolbox* (Mallick et al., 2005), y la teoría es como sigue. Todas las correcciones se basan en el conocimiento de la CTF

en función de la frecuencia espacial \vec{k} y los parámetros Δz sub-enfoque de OL, C_s constante de aberración esférica del TEM (en nuestro caso $C_s=2\text{mm}$), z_a que es la diferencia focal debido al astigmatismo axial, ϕ_0 es el ángulo de referencia que define la dirección azimutal debido al astigmatismo axial y λ es la longitud de onda de los electrones que depende del voltaje de aceleración del cañón. Las aberraciones de OL y el efecto del subenfoco producen un desplazamiento de la fase de la onda dispersada

por una cantidad igual,

$$\gamma(\vec{k}) = 2\pi \cdot \chi(\vec{k}) \quad (2.2.1)$$

Este término depende de las coordenadas en el *back focal plane* $\vec{k} = (k_x, k_y)$, que son a su vez proporcionales al ángulo de dispersión y la frecuencia espacial. En un sistema de coordenadas polares, $k = |\vec{k}|$, $\phi = a \cdot \tan(k_x, k_y)$. El término $\chi(\vec{k})$ es llamado *función de aberración de onda* del TEM,

$$\chi(k, \phi) = -\frac{1}{2} \lambda \left[\Delta z + \frac{z_a}{2} \sin 2(\phi - \phi_0) \right] k^2 + \frac{1}{4} \lambda^3 C_s k^4 \quad (2.2.2)$$

de forma que según la teoría de transferencia de contraste de fase la transformada de Fourier del contraste de la imagen cryo-TEM, considerando que los objetos solamente producen contraste de fase sobre los electrones que interaccionan con ellos debido a la dispersión elástica, es como sigue,

$$\mathcal{F}\{I(\vec{r})\} = \mathcal{F}\{\Phi(\vec{r})\} \cdot A(\vec{k}) \cdot E(\vec{k}) \cdot \sin(\gamma(\vec{k})) + N(\vec{k}) \quad (2.2.3)$$

donde $\mathcal{F}\{\cdot\}$ es la transformada de Fourier, $\Phi(\vec{r})$ es el potencial proyectado en el espacio real \vec{r} o desplazamiento de fase de la onda incidente que viaja en la dirección del eje z, y es definido como,

$$\Phi(\vec{r}) = \int C(\vec{r}, z) dz \quad (2.2.4)$$

donde $\vec{r} = \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$ es un vector 2D y $C(\vec{r}, z)$ es la distribución del potencial de Coulomb 3D dentro del objeto. $A(\vec{k})$ es la función de apertura y se define,

$$A(\vec{k}) = \begin{cases} 1 & \text{para } |\vec{k}| = \theta / \lambda \leq \theta_1 / \lambda \\ 0 & \text{para el resto} \end{cases} \quad (2.2.5)$$

donde θ_1 es el ángulo correspondiente al radio de la apertura de objetivo, $\sin(\gamma(\vec{k}))$ es la función de transferencia de contraste (CTF), $N(\vec{k})$ es el término correspondiente al ruido aditivo y $E(\vec{k})$ es la función de envolvente debido al efecto de la coherencia

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

parcial por la dispersión espacial por el tamaño de la fuente y la dispersión de energía. Existen diferentes algoritmos para realizar automáticamente el análisis de la CTF de cada una de las imágenes del set de imágenes de un experimento cryo-EM. La mayoría de algoritmos ajustan un patrón de CTF teórico con el espectro de potencia experimental para cada imagen, usando un método iterativo de ajuste de mínimos cuadrados no-lineal. Para este ajuste se varían los parámetros Δz , z_a , ϕ_0 y un factor de escala multiplicativo. Una vez que se conoce la CTF como una función de la frecuencia espacial y los parámetros Δz , z_a y C_s se puede realizar la corrección de la CTF. La corrección de la CTF más simple es por un cambio de fase de 180° (*phase flipping*) en las zonas donde el contraste cambia de signo antes de la selección de partículas, luego llevando a cabo la siguiente operación en la imagen transformada,

$$F'(\vec{k}) = \begin{cases} -F(\vec{k}) & \text{para } H(\vec{k}) < 0 \\ F(\vec{k}) & \text{para } H(\vec{k}) > 0 \end{cases} \quad (2.2.6)$$

lo cual asegura que la imagen modificada $F'(\vec{k})$ tiene las fases correctas a través de los dominios de resolución y $H(\vec{k}) = A(\vec{k}) \cdot E(\vec{k}) \cdot \sin(\gamma(\vec{k}))$. Sin embargo la atenuación de las amplitudes dependiente de la frecuencia espacial quedan sin corregir. La CTF también se puede corregir durante el proceso de reconstrucción utilizando un filtro de Wiener que restaura tanto las fases como las amplitudes de la transformada de Fourier. Considerando $F(\vec{k})$ la transformada de Fourier del objeto y $N(\vec{k})$ la función de ruido, la transformada de Fourier de la imagen en notación de Fourier es como sigue $I(\vec{k}) = F(\vec{k}) \cdot H(\vec{k}) + N(\vec{k})$, el filtro de Wiener es como sigue,

$$W(\vec{k}) = \frac{H^*(\vec{k})}{|H(\vec{k})|^2 + P_N(\vec{k})/P_F(\vec{k})} \quad (2.2.7)$$

donde $P_N(\vec{k})$ y $P_F(\vec{k})$ son los espectros de potencia del ruido y el objeto.

En objetos que presentan tanto contraste de fase como contraste de amplitud, por pérdida de electrones que no participan en la formación de imagen produciendo el contraste. En este caso la intensidad de la imagen en el espacio de Fourier se puede aproximar como,

$$I(\vec{k}) = O_r(\vec{k}) \cdot \sin(\gamma(\vec{k})) - O_i(\vec{k}) \cdot \cos(\gamma(\vec{k})) \quad (2.2.8)$$

donde $O_r(\vec{k})$ y $O_i(\vec{k})$ son las transformadas de Fourier de las porciones real (o fase débil) e imaginaria (amplitud débil) del objeto, respectivamente. Luego la función de transferencia de contraste se reescribe de la forma,

$$H'(\vec{k}) = \sin(\gamma(\vec{k})) - Q_0 \cos(\gamma(\vec{k})) \quad (2.2.9)$$

El cambio más importante de los objetos que producen contraste mixto por amplitud y fase frente a los que solamente producen contraste de fase es que la función de transferencia comienza con un valor distinto de cero a la frecuencia cero,

$$H'(0) = -Q_0.$$

Selección de partículas

La selección de partículas es uno de los pasos más críticos y que consumen más tiempo en el flujo de trabajo de una reconstrucción por cryo-EM. Cuantas más partículas se utilicen en el proceso de reconstrucción mejor será la resolución final, aunque un mal centrado o la selección de excesivas regiones de ruido por parte de un sistema automático de detección de partículas hace en ocasiones inviable el uso de este set de partículas para un análisis estructural. Esto suele suceder en el estudio de complejos biológicos con un peso molecular pequeño, y no con ribosomas y virus icosaédricos por ejemplo, ya que estos presentan mejor SNR y los métodos automáticos resultan más eficientes. En la sección 2.4.2. se explicará el estado del arte de los diferentes métodos existentes para la automatización de la selección de partículas en un set de imágenes cryo-TEM una vez adquirido. Hay que destacar, que al ser un paso crítico, es preferible conocer con antelación la forma aproximada de la estructura a reconstruir (si está disponible) en diferentes vistas, para de esta forma realizar una buena selección y centrado de partículas. En la sección 2.5 se mostrará la estructura general de las muestras utilizadas en este trabajo, los ribosomas y virus icosaédricos. No se realizará un análisis detallado de estos complejos biológicos sino que se explicarán los principios básicos que permiten su detección en imágenes cryo-EM desde un punto de vista morfológico.

Alineamiento y reconstrucción 3D

La orientación espacial y el desplazamiento en el plano de cada una de las macromoléculas embebidas en la fina capa de hielo vítreo son definidas por cinco parámetros geométricos (tres ángulos de Euler (ψ , θ y φ) y dos parámetros de desplazamiento (Δx , Δy)). Estos son los cinco parámetros de alineamiento para cada una de las partículas que son necesarios refinar hasta llegar a la mejor solución, para lo cual se pueden utilizar diferentes métodos. En este trabajo nos basamos en el método de refinamiento angular 3D basado en una referencia 3D inicial o *projection matching*, para la optimización de estos parámetros. Si ya existe un modelo 3D de la macromolécula en estudio, como sucede al estudiar complejos ribosomales, se utiliza el alineamiento basado en una referencia. Siguiendo este procedimiento, las orientaciones asociadas a cada una de las partículas experimentales se obtienen mediante el cálculo de la cross-correlación entre las partículas experimentales y las proyecciones 2D del modelo de referencia 3D existente (ver figura 2.9). El algoritmo de cross-correlación es uno de los más utilizados para la búsqueda de semejanza entre dos conjuntos de datos. En nuestro caso una imagen es una matriz de niveles de grises y se utiliza la cross-correlación para alinear dos imágenes $f_1(r)$ y $f_2(r)$ de forma que se chequean todas las posiciones relativas entre las imágenes, producidas por los parámetros de búsqueda de rotación y traslación (\vec{R}_α, \vec{r}') de una respecto a la otra, y se busca la que minimice la longitud del vector diferencia (o distancia Euclidiana generalizada E_{12}) utilizando la siguiente expresión,

$$E_{12}^2(\vec{R}_\alpha, \vec{r}') = \sum_{j=1}^J [f_1(\vec{r}_j) - f_2(\vec{R}_\alpha \vec{r}_j + \vec{r}')]^2 \quad (2.2.10)$$

donde \vec{R}_α es la matriz de rotación de la función $f_2(\vec{r})$ que representa la imagen $\{f_2(\vec{r}_j), j=1, \dots, J\}$ en coordenadas cartesianas. Mientras que el vector \vec{r}' representa un desplazamiento de la función rotada. Este tipo de comparación es similar a la comparación que realizaría un experto humano a ojo para juzgar si dos partículas representan la misma vista del mismo objeto, o no. De la ecuación anterior se deduce la función de cross-correlación cuyos máximos en función de los parámetros de búsqueda (\vec{R}_α, \vec{r}') nos indican una medida de similitud y se expresa de la forma,

$$\Phi_{12}(\vec{R}_a, \vec{r}_k) = \sum_{j=1}^J f_1(\vec{r}_j) \cdot f_2(\vec{R}_a \vec{r}_j + \vec{r}_k) \quad (2.2.11)$$

La orientación angular de las proyecciones de referencia es conocida, luego los parámetros de alineamiento de las partículas experimentales se logran comparándolas con las proyecciones de referencia por cross-correlación. Los parámetros de alineamiento se van refinando iterativamente emparejando las partículas experimentales con las proyecciones de referencia que produzcan un mayor valor de cross-correlación. Para realizar el refinamiento angular se utilizan métodos iterativos emparejando las proyecciones experimentales con las de referencia calculadas a partir de la última reconstrucción, de forma que las proyecciones 2D de referencia se renuevan en cada iteración utilizando el nuevo mapa 3D reconstruido. A lo largo de las diferentes iteraciones se va reduciendo el ángulo de búsqueda y en cada nueva iteración se generan más proyecciones 2D de referencia (ver figura 2.9), de forma que el cálculo de los parámetros de alineamiento de las partículas experimentales se hace más preciso. Una vez que los parámetros de alineamiento han sido refinados durante suficientes iteraciones hasta llegar a converger, se combina la información de las partículas para crear una reconstrucción 3D del mapa de densidad electrónica con la información estructural obtenida (Penczek, 2012; Shaikh et al. 2008). El algoritmo más utilizado para realizar la reconstrucción es *weighted-back projection* aunque existen diferentes algoritmos de procesamiento para cryo-EM (Frank et al., 1981; Ludtke et al. 1999, Marabini et al., 1996; Scheres, 2015; Grigorieff 2007). Una asunción intrínseca es que la población de partículas es homogénea y pertenecen a la misma conformación del complejo biológico, o que en todo el set de partículas se puede identificar alguna subpoblación homogénea correspondiente a alguna de las diferentes conformaciones que conviven en la muestra, utilizando algoritmos de clasificación 3D.

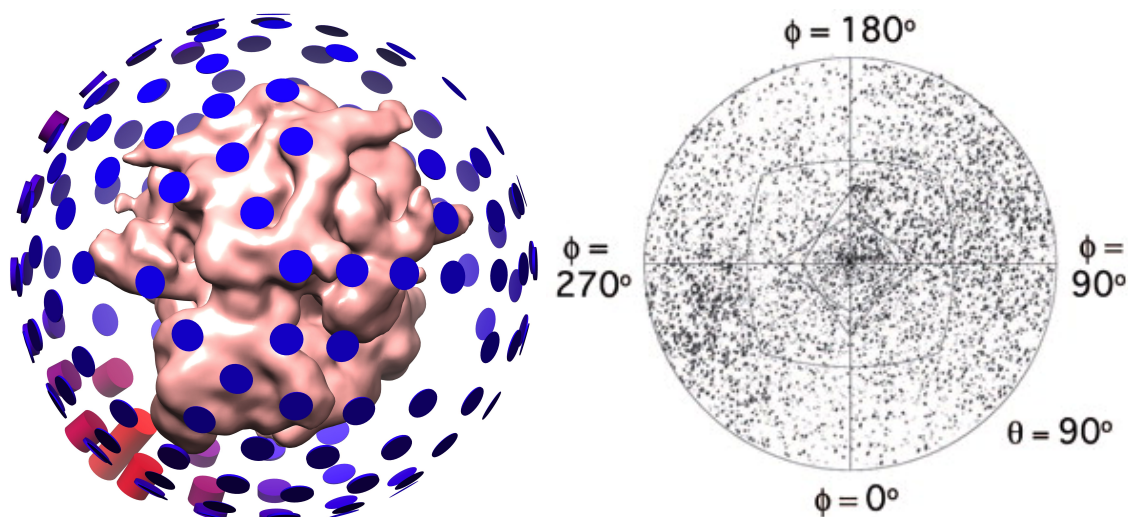


Figura 2.9: Gráfico de la distribución angular de las partículas experimentales en todo el espacio

Durante los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para la clasificación 3D no supervisada basados en diferentes procedimientos estadísticos (Elad et al., 2008; Lyumkis et al., 2013; Penczek et al., 2011; Scheres et al., 2007). El objetivo principal de la clasificación no supervisada es investigar la presencia de distintos estados conformacionales de la muestra en un set de partículas 2D, lo que permite responder a cuestiones sobre el funcionamiento dinámico de estas macromoléculas. Estos métodos necesitan un número muy grande de partículas para producir una significativa evaluación estadística. Por lo tanto la adquisición de un gran número de imágenes de alta calidad en un TEM se ha convertido en la norma en estudios de biología estructural por cryo-EM. La demanda de esta gran cantidad de datos necesita de sistemas de automatización fiables y eficientes para la adquisición y análisis de imagen en sesiones cryo-TEM.

2.2.2 Límite de resolución en una reconstrucción 3D

El TEM

En ciencias de materiales la resolución de la imagen final en un TEM normalmente depende de la configuración del sistema de lentes, sobre todo del tipo de pieza polar ferromagnética en la OL, del sistema de blindaje ante interferencias y del FEG. El límite de resolución punto a punto d_p en el foco de Scherzer está definido de la forma (Tsuno, 1993),

$$d_p = 0.65 C_s^{1/4} \lambda^{3/4} \quad (2.2.12)$$

El microscopio en la Plataforma EM del CIC bioGUNE ofrece una resolución máxima punto a punto de ~ 2.8 Å. Existen muchos factores que modulan la obtención de resolución atómica en un estudio por cryo-EM, pero la potencia de resolución del microscopio electrónico no suele ser el factor limitante. Si por ejemplo, trabajamos con una muestra homogénea, de peso molecular adecuado (> 300 kDa) para la obtención de suficiente contraste a bajos sub-enfoques, el factor limitante es la información contenida en cada una de las partículas; es decir, tanto las altas frecuencias (el detalle fino, el cual determina la resolución final) como las bajas frecuencias (que contribuyen a la morfología general de la muestra en la imagen, que a su vez determina el contraste necesario para alinear y clasificar con precisión las partículas).

Como se ha explicado a lo largo de este capítulo el material biológico solamente produce contraste de fase, por lo cual es necesario modular el coeficiente de aberración esférica de la OL y los valores de sub-enfoque. La imagen generada por el TEM está formada por una función compleja con una amplitud y una fase espacial que puede ser transformada al espacio de frecuencias a través de una transformada de Fourier. Esta información está modificada por la CTF y atenuada a altas frecuencias debido al sub-enfoque. Además, el poder resolutivo de la óptica del microscopio está también limitada por la coherencia espacial y temporal del haz, que principalmente vienen definidas por las propiedades del FEG y la elección del *spot size* en la primera lente CL1. Estas influencias ópticas producen una función de envolvente que describe la amortiguamiento de la información a altas frecuencias.

La muestra

Uno de los principales factores que limitan la resolución final en experimentos cryo-EM es la *extremada sensibilidad* de las estructuras biológicas al daño producido por el haz de electrones en un TEM. Las muestras biológicas son sensibles al haz de electrones y la información de alta resolución desaparece rápidamente ante un haz de electrones de alta energía (Egerton, 2012; Taylor & Glaeser, 1974). Por otra parte, también se ha demostrado que el *movimiento de la muestra inducido por el haz* durante el tiempo de exposición, es decir durante la adquisición de una imagen, reduce drásticamente la resolución (Brilot et al., 2012 ; Glaeser & Hall, 2011; Henderson, 1992).

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

A priori se supone que la población de partículas a lo largo de la rejilla es homogénea y todas las partículas son proyecciones del mismo objeto, pero es posible que las imágenes en sesiones cryo-TEM contengan proyecciones de macromoléculas en diferentes estados conformacionales. Luego la *heterogeneidad en la muestra* es una de las causas de limitación en resolución por cryo-EM. Además en ocasiones existen *vistas preferentes* en las imágenes por cryo-TEM, lo que produce que no se obtenga información en todas las orientaciones espaciales.

Por último, otra limitación de la técnica de cryo-EM es el *mínimo peso molecular* que debe tener la macromolécula biológica compleja en estudio. Las macromoléculas deben tener un tamaño suficiente para obtener una adecuada relación señal-ruido (SNR) en las imágenes 2D generadas por cryo-TEM. Esto hace difícil la reconstrucción por cryo-EM de macromoléculas pequeñas, con pesos moleculares por debajo de los ~200 kDa, ya que el proceso de alineamiento de estas partículas no es muy fiable.

El sensor detector de electrones

El sensor detector de electrones también juega un papel importante en la adquisición de imágenes a alta resolución, dado que su resolución depende de su sensibilidad, ruido y respuesta en función de la frecuencia espacial. La SNR de las imágenes registradas influyen en la resolución, donde SNR está definido como el ratio entre el poder de la señal y el poder del ruido que corrompe la señal (o la media de la señal μ entre la desviación estándar σ).

$$SNR = \frac{P_{señal}}{P_{ruido}} = \frac{\mu}{\sigma} \quad (2.2.13)$$

Una imagen típica en un experimento cryo-TEM tiene un valor de SNR de aproximadamente 0.05 a 0.1 (Baxter et al., 2009). El ruido en las imágenes consiste en una parte aditiva que es independiente de la iluminación y una parte multiplicativa que es proporcional al tiempo de exposición del dispositivo detector de electrones. Es posible aumentar la SNR utilizando más cantidad de electrones para formar la imagen, luego aumentando la señal. En cryo-TEM si se aumenta la dosis de electrones, la probabilidad de dañar la muestra se incrementa, lo cual hace disminuir la información útil en la imagen y resulta en una disminución drástica de la resolución (Henderson et al. 1990). Por tanto,

la resolución obtenida es directamente proporcional a la dosis total aplicada sobre la muestra y la sensibilidad de la muestra a la radiación.

Un detector perfecto cuenta un electrón de entrada (fuente puntual) con una señal en exactamente uno de los píxeles del detector mientras los píxeles vecinos no registran señal (respuesta puntual). En la Plataforma EM del CIC bioGUNE el sistema de detección de electrones se basa en una CCD, que convierte los electrones en fotones usando una película de material fluorescente (*scintillator*) y convierte de nuevo los fotones a electrones usando un chip CCD (Booth et al., 2006). Normalmente en las CCDs la DQE es baja debido a esta doble conversión electrón-fotón-electrón. En un detector CCD la sensibilidad y respuesta en frecuencia depende principalmente del grosor de su *scintillator*, típicamente hecho de una aleación de fósforo. Cuando la luz transferida de los electrones incidentes por un material fluorescente es detectada en la CCD, el tamaño de la luz emitida es mayor que la de los electrones incidentes debido a la dispersión de electrones por las partículas fluorescentes. Por lo tanto el tamaño de la luz (fotones) puede ser mayor que el tamaño de pixel del chip CCD ($\sim 15 \mu\text{m}$), y esta dispersión viene definida por la función de dispersión de punto (PSF) en el espacio real. La respuesta en frecuencia espacial del detector está relacionada con esta PSF y se caracteriza usando la función de transferencia de contraste (MTF), (Faruqi & Henderson, 2007). Los efectos de la integración de señal dentro de un pixel se pueden modelar con un punto de dispersión Gaussiano y la MTF en función de la frecuencia espacial y la longitud de onda λ del TEM se define de la forma,

$$MTF(w) = \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}w\right) \exp(-\pi^2 \lambda^2 w^2/4) \quad (2.2.14)$$

Por lo tanto otro factor limitante que hace perder información en las imágenes cryo-TEM es la mala eficiencia de detección a altas frecuencias-espaciales de los sensores CCD, tradicionalmente instalados en los TEM hasta la llegada de la tecnología de detección directa basada en CMOS. Para medir la eficiencia de detección de un sensor se mide el rendimiento de la relación señal-ruido a la entrada y salida del detector, en función de la frecuencia espacial, lo que da una medida de la DQE del sensor (Ruijter, 1995; Weickenmeier et al., 1995), que se puede definir de la forma,

$$DQE(w) = \frac{SNR_{out}^2(w)}{SNR_{in}^2(w)} \quad (2.2.15)$$

En la actualidad gracias al avance en los sensores de detección directa de electrones diseñados para experimentos en mínima dosis se ha mejorado mucho la DQE gracias a la alta sensibilidad de estos sensores a todas las frecuencias, lo que mejora el contraste y mantienen la información estructural a altas frecuencias, ver figura 2.10.

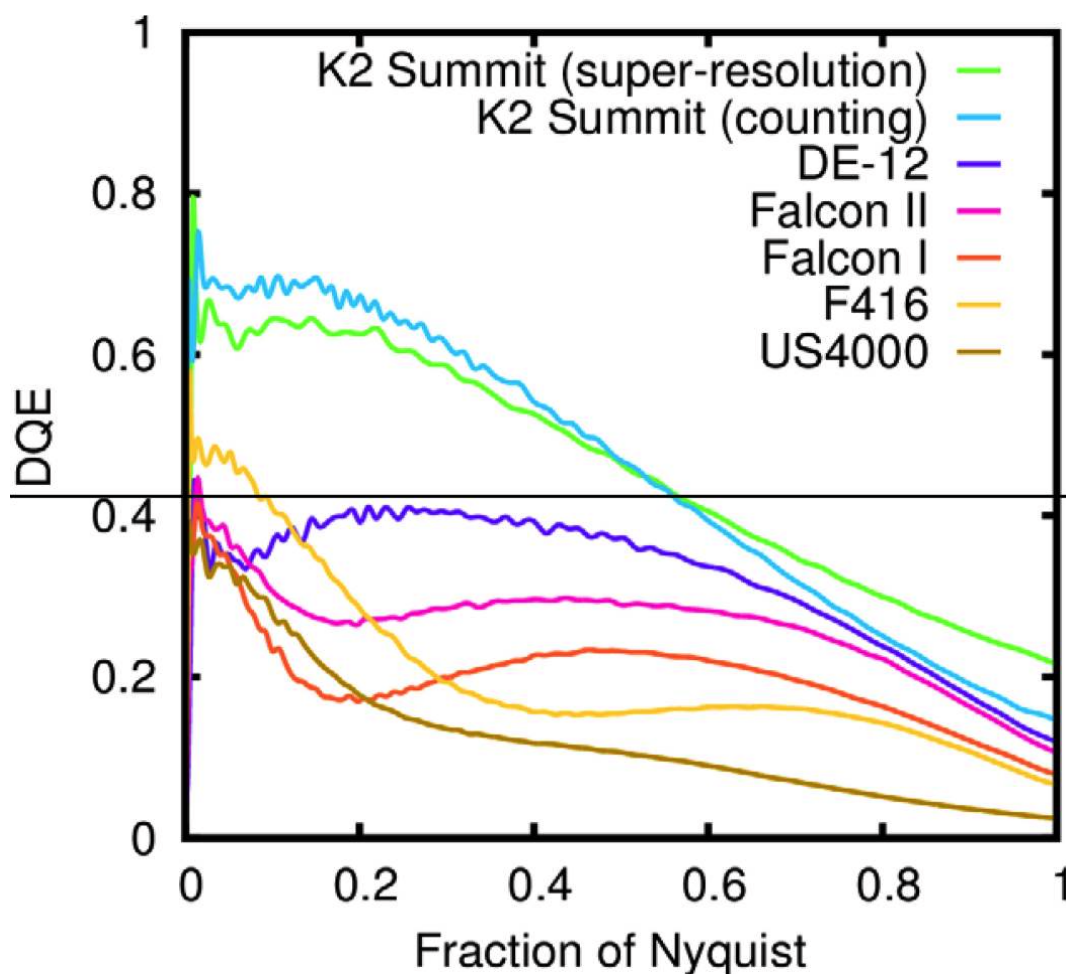


Figura 2.10: Comparativa del valor DQE en función de la frecuencia de Nyquist de diferentes sensores de detección directa de electrones en comparación con la cámara CCD modelo US4000 de Gatan (Ruskin et al., 2013)

2.3 Estado del arte de cryo-EM

Hasta hace unos pocos años, la criomicroscopía electrónica de partículas individuales o cryo-EM (Frank, 1996), no era la elección principal para los biólogos estructurales inte-

resados en conocer interacciones moleculares debido a su limitada resolución. Durante los últimos años no obstante, se ha realizado un gran esfuerzo para solucionar cada uno de los problemas que limitan la resolución, de forma que la técnica ha evolucionado rápidamente hasta convertirse en una alternativa real a la cristalografía de rayos X en cada vez más experimentos de biología estructural, lo cual se ha descrito como una verdadera revolución (Kühlbrandt, 2014). Como detallaremos a continuación esta revolución se debe principalmente al desarrollo en *hardware* de nuevas cámaras CMOS de detección directa y nuevos procedimientos en el procesamiento de imagen/video (Bai et al., 2013; Bammes et al., 2012; Campbell et al., 2014; McMullan et al., 2014).

El poder de resolución del TEM no suele ser un factor limitante en esta técnica y el principal avance tecnológico que ha permitido obtener resolución atómica mediante cryo-EM ha sido el desarrollo de una nueva generación de cámaras CMOS que detectan directamente los electrones (McMullan et al., 2009; Ruskin et al. 2013). Una forma de incrementar la SNR es minimizando el ruido en el detector y al mismo tiempo incrementando su sensibilidad en todo el espacio de frecuencias espaciales. La mejor alternativa para disminuir el ruido en el detector resulta ser el uso de un dispositivo de detección directa de electrones, que evita cualquier conversión y tiene un factor DQE mejor que un detector analógico en forma de película fotográfica (Kodak film), ver figura 2.10. En la actualidad existen tres compañías que comercializan estas cámaras de detección directa de electrones: modelo *K2 Summit* de GATAN, *Falcon* de FEI y *DE* de Direct Electron. Todas ellas ofrecen más señal que los FILM analógicos o las cámaras CCD, tanto a bajas como a altas frecuencias espaciales, luego ofrecen imágenes con más contraste y más resolución. Otra característica importante de estas cámaras es su rapidez, lo que permite fraccionar la baja dosis total de electrones en muchas sub-imágenes, luego en vez de adquirir una sola imagen se adquiere un vídeo de esa región. El alineamiento de las sub-imágenes de un vídeo permite corregir el efecto de borrosidad producido por el movimiento de las macromoléculas embebidas en el hielo inducido por el haz de electrones o inestabilidad mecánica del porta-muestras (Brilot et al., 2012; Campbell et al., 2012; Li et al., 2013). Luego la combinación del fraccionamiento de la dosis en los nuevos detectores y la corrección del movimiento inducido por el haz en la muestra vitrificada, mejora la resolución final de la reconstrucción 3D. Generalmente, y para mejorar la resolución de la estructura final se eliminan las últimas sub-imágenes del vi-

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

deo, ya que en esas sub-imágenes la muestra tiene mayor dosis acumulada, luego mayor daño por radiación (Scheres, 2014).

Estos avances tecnológicos han marcado una nueva era en cryo-EM, ya que es posible obtener estructuras atómicas "de novo" de un amplio rango de macromoléculas biológicas sin la necesidad de cristalizarlas. Las estructuras resueltas incluyen ribosomas de patógenos humanos (Wong et al., 2014) o mitocondrial (Amunts et al., 2014), ribosomas en complejo con una proteína translocadora (Voorhees et al., 2014), canales iónicos (Cao et al., 2013; Liao et al., 2013), o complejos enzimáticos (Allegretti et al., 2014). En todos estos casos la mayoría de las cadenas laterales de los aminoácidos son claramente visibles, y se han podido construir "de novo" modelos atómicos casi completos a partir de los mapas de densidad por cryo-EM.

Cryo-EM también está evolucionando para poder resolver estructuras de macromoléculas más pequeñas, a resolución cercana a la atómica, como es el caso del estudio por cryo-EM de la encima "*γ-secretase*" (Lu et al., 2014), con una región ordenada de 170 kilodaltons (kDa) y resuelta a 4.5 Å de resolución. La habilidad para resolver estas estructuras a nivel atómico es un prerequisite esencial para el desarrollo de nuevos antibióticos y drogas. Por ejemplo, la estructura del ribosoma 80S citoplasmático del *Plasmodium falciparum* que forma un complejo con la droga anti-protozoos *emetine* fue resuelta a una resolución de 3.2 Å. En este caso, tanto la posición y orientación de la droga ha podido ser determinada con precisión, proporcionando una detallada información molecular acerca del modo de acción de este inhibidor (Wong et al., 2014).

Por tanto, cryo-EM se ha convertido en una técnica que consigue resolución casi atómica en el estudio de cada vez más complejos macromoleculares, convirtiéndose en una alternativa real a la técnica de cristalografía de rayos-X para obtener la estructura atómica de macromoléculas biológicas en un estado fisiológico muy cercano al nativo (Cheng, 2015), ya sea en estados funcionales específicos o formando un complejo con diferentes co-factores. Además, existe margen de mejora si se consigue evitar que la muestra se mueva durante el tiempo de exposición en la adquisición de imagen en mínima dosis (Meyerson et al., 2014; Russo & Passmore, 2014). Sobrepasar el umbral de los 3 Å en mapas de cryo-EM permitirá visualizar pequeñas moléculas como iones, o cómo pequeñas moléculas ligando, como son cofactores o inhibidores, se unen a proteínas, siendo esto último de particular interés para la industria farmacéutica ya que es esencial

en el diseño y optimización de drogas basadas en estructura (*structure based drug design*).

Como consecuencia de esta revolución en cryo-EM, existe una creciente necesidad de usar TEM totalmente automatizados y de alto rendimiento para generar set de datos cada vez más grandes y de mejor calidad, lo cual permite reconstruir estructuras en forma de mapas de densidad 3D a resoluciones muy cercanas a la atómica. En la actualidad las sesiones cryo-TEM automatizadas funcionan toda la noche sin supervisión. En este contexto es indispensable desarrollar nuevos esquemas de control inteligentes que imiten el comportamiento de expertos investigadores durante una sesión cryo-TEM, de forma que se mejore considerablemente la calidad de los datos de salida. Este es precisamente uno de los objetivos principales de esta tesis.

2.4 Estado del arte de los sistemas de automatización

Como hemos visto a lo largo de este capítulo la técnica de cryo-EM tiene como objetivo principal tratar de crear una relación entre las diferentes conformaciones estructurales de un complejo macromolecular y los procesos celulares a nivel molecular. La metodología es muy laboriosa porque el análisis de la estructura de complejos macromoleculares en distintos estados conformacionales requiere la adquisición de gran cantidad de imágenes de buena calidad en un TEM.

Uno de los principales cuellos de botella de esta técnica es la enorme cantidad de imágenes de alta calidad que deben ser adquiridas en un TEM para su posterior procesamiento. En equipos no automáticos este trabajo está limitado por lentos métodos manuales de adquisición de datos, realizados por operadores experimentados, lo cual resulta lento y costoso. Luego para incrementar la disponibilidad y eficiencia de esta técnica estructural se está haciendo un gran esfuerzo en automatización. Como se ha descrito, el *modus operandi* en cryo-TEM se centra en evitar daños en la muestra debido a la radiación del haz de electrones por lo tanto no permite determinar *a priori* la calidad de cada región de la rejilla a alta magnificación. Es por esto que el porcentaje de imágenes de alta calidad es muchas veces bajo. Por lo tanto en cryo-TEM la decisión de adquirir una imagen en el modo *Photo* debe ser realizada basándose en la apariencia de la muestra a

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

baja magnificación (en el modo *Search*), o en los resultados anteriores a alta magnificación en una región cercana. Esto significa que un investigador experto siempre debe evaluar la calidad del set de datos después de ser adquiridos y en muchas ocasiones parte del set de datos adquirido de forma no supervisada resulta de baja calidad y no puede ser utilizado.

Los sistemas de automatización para cryo-TEM deben trabajar utilizando la estrategia de mínima dosis, y como propósito principal deben adquirir grandes cantidades de imágenes de calidad uniforme a una velocidad adecuada, sin intervención del operador (Lyumkis et al. 2010). Un microscopio inteligente que integre el control de instrumentos, algoritmos de reconocimiento de características, técnicas de aprendizaje automático, junto con el análisis y procesamiento de imagen podría mejorar ampliamente la calidad y la cantidad de los datos adquiridos. También permitiría evaluar de forma más eficaz la validez de las imágenes adquiridas en tiempo real. Luego disponer de un sistema de adquisición de datos flexible y adaptativo para la automatización y control de tareas en sesiones cryo-TEM es de vital importancia para la biología estructural.

En el contexto de una sesión cryo-TEM totalmente automatizada, en un TEM que trabaje toda la noche sin supervisión, el desarrollo de nuevos esquemas de control inteligente que imiten el comportamiento de un investigador experto resulta esencial para la mejora de los resultados. En cryo-TEM se trabaja en modo de mínima dosis para no dañar la muestra y un buen microscopista experimentado tiene la habilidad de utilizar ciertas características de la imagen a baja magnificación para obtener imágenes de buena calidad a alta magnificación. Sin embargo, es difícil para el microscopista mantener una precisión en sus decisiones en las diferentes sesiones con el microscopio. Además resulta difícil transferir este conocimiento a nuevos o inexpertos operadores del microscopio electrónico. Como existen unos retardos sustanciales entre que se adquiere la imagen a alta magnificación y se evalúa su calidad, es difícil sistematizar la evaluación y mejorar el proceso de toma de decisiones.

2.4.1 Automatización de la adquisición de imágenes

Investigadores en la industria y en instituciones académicas han desarrollado varios sistemas software con varios grados de automatización y robustez. *AutoEM* (Lei &

Frank, 2005) proporciona capacidades de semi-automatización para microscopios de la serie *FEI Tecnai*, requiriendo la participación continua del operador. *Leginon* es el sistema de automatización libre más avanzado en la actualidad, diseñado para proporcionar una automatización total para microscopios *FEI Tecnai* (Carragher et al., 2000; Potter et al., 1999; Suloway et al., 2005). FEI también dispone de un software propio para la automatización de datos en experimentos cryo-TEM, conocido como EPU (*Automated Data Acquisition Software for Single Particle Analysis Workflow*) y diseñado para equipos TEM del modelo Titan y Polara. Sólo existe en la comunidad científica una integración de Leginon para un microscopio JEOL JEM3100FSC (Glaeser et al., 2006), pero todavía no existen resultados estructurales publicados para demostrar su fiabilidad. JEOL ofrece un software comercial *JEOL Automated Data Acquisition System* (JADAS), desarrollado en colaboración con el centro *NCMI Baylor College of Medicine*, para la automatización de adquisición de datos en sesiones cryo-TEM con los microscopios JEOL más modernos (Zhang et al., 2009). JADAS se comunica con el microscopio JEOL a través del software *TemServer*, con la cámara Gatan a través de *DigitalMicrograph*, y con el control piezo-eléctrico del goniómetro a través del *driver* del *piezo*. El sistema JADAS se define como un sistema flexible que ofrece al usuario experimentado la posibilidad de construir sus propios protocolos experimentales y ajustar parámetros para adaptarse a las necesidades de cada investigador. Empleando JADAS y un microscopio JEOL JEM3200FSC se pueden adquirir 30-40 imágenes CCD (4k x 4k) por hora, pero esto precisa unas condiciones de calidad excelentes en la rejilla y un rendimiento óptimo del microscopio.

Los métodos actuales disponibles para automatizar la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM, incluido el sistema EPU de FEI, permiten adquirir imágenes a partir de áreas preseleccionadas a baja magnificación en forma de *atlas* (mapas de toda la rejilla en low mag) de las zonas a irradiar. El software EPU utilizado por los microscopios electrónicos de última generación (e.g., Titan Krios (FEI, Eindhoven, The Netherlands)), funciona de forma ininterrumpida y no supervisada. El esquema se basa en la preselección de áreas de la rejilla, generando un *atlas* (o mapa completo de toda la rejilla) a baja magnificación, en el que se calcula la posición de cada uno de los agujeros a irradiar. Este esquema aprovecha la gran estabilidad que ofrecen estos microscopios para navegar secuencialmente a lo largo del *atlas* completo de la rejilla durante días.

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

Es importante reseñar que ninguno de los software existentes toma decisiones en tiempo real de acuerdo a la calidad de las imágenes cryo-TEM que están siendo adquiridas. La evaluación en tiempo real de los datos mientras son obtenidos en una sesión automática cryo-TEM no es posible hoy en día, por lo que en el caso de una sesión no supervisada los resultados pueden ser de mala calidad y no válidos para el investigador. La presencia de un exceso de contaminación, un inadecuado grosor de hielo, agujeros vacíos debido a un área de la capa de carbón rota, agregación, una baja concentración de partículas o zonas con la muestra dañada, podrían reducir drásticamente el tamaño final del set de datos útil. Por lo tanto todos los sistemas de automatización existentes tienen en común que necesitan una perfecta distribución de partículas en toda la rejilla con un grosor de hielo uniforme, además de un microscopio extremadamente estable en el tiempo para poder trabajar muchas horas sin errores.

Generalmente, ninguno de estos sistemas de automatización sustituyen la capacidad y precisión de un operador experimentado por muchas razones. Un problema habitual en cryo-TEM por ejemplo es la irregular distribución de partículas en los distintos agujeros de la rejilla aunque el hielo parezca adecuado. En este caso un operador experimentado debe juzgar si se continúa el experimento, si se cambia de zona de rejilla o se inserta otra rejilla, y si merece la pena utilizar el sistema automático de adquisición. Además siempre hay que tomar decisiones “*in-situ*” teniendo en cuenta por ejemplo el nivel de contaminación de hielo en una rejilla particular, la estabilidad del porta-muestras o el comportamiento del microscopio. En general es necesario evaluar en tiempo real la validez y calidad de las imágenes obtenidas. Por lo tanto, en la actualidad es imprescindible la presencia de usuarios expertos en experimentos de cryo-TEM, para de esta forma asegurar la calidad de los datos adquiridos antes de continuar con el experimento con una determinada rejilla y no perder tiempo y recursos con una adquisición de datos inútil.

2.4.2 Automatización de la selección de partículas

La selección de partículas individuales en condiciones de baja SNR en imágenes de cryo-TEM es una de las tareas que consumen más tiempo y una de las más críticas de todo el flujo de trabajo. Durante los últimos 15 años se ha realizado un gran esfuerzo en investigación intentando automatizar el proceso de selección de partículas individuales

en imágenes cryo-TEM usando diferentes algoritmos divididos en dos categorías: métodos basados en características (*feature-based approach*) y otros basados en modelos previos (*template-based approach*) (Adiga et al., 2005; Chen & Grigorieff, 2007; Langlois et al., 2014; Norousi et al., 2013; Ogura & Sato, 2004; Potter et al., 2004; Roseman, 2003; Scheres, 2015; Sorzano et al., 2009; Vargas et al., 2013; Voss et al., 2009; Woolford et al., 2007; Zhao et al., 2013; Zhu et al., 2004). Todos estos métodos utilizan el set completo de imágenes cryo-TEM una vez adquiridas, pero ninguno permite la identificación de partículas en tiempo real. Además, a menudo los sets de datos en cryo-TEM presentan heterogeneidad en el tipo de partículas presentes en las imágenes (visualmente identificables por un experto). Esto suele ser producido por una heterogeneidad en la muestra purificada debido a ciertas limitaciones en los métodos bioquímicos de preparación. Además las imágenes de cryo-TEM también suelen contener partículas contaminantes, que corresponden a pequeños cristales de hielo producidos durante el proceso de vitrificación. Las contaminaciones son en la mayoría inevitables, pero es necesario controlar un nivel aceptable.

2.5 Muestras biológicas consideradas en esta tesis

Con el objetivo principal de conocer la morfología y características generales de los diferentes tipos de macromoléculas biológicas utilizados en esta tesis se presentan la estructura de los ribosomas, ya sean procariotas o eucariotas, y se explica la morfología general de los diferentes tipos de virus icosaédricos que existen en la naturaleza. Como se verá en el Capítulo 5, para el diseño de un sistema de identificación automática de partículas, combinando algoritmos de visión artificial y modelos neuro-difusos, es necesario conocer con antelación el tipo de partículas que nos podemos encontrar en las imágenes cryo-TEM. Esto es debido a que el sistema automático identificará el tipo de partícula en función de su morfología, de forma similar al método de trabajo manual de un experto humano.

2.5.1 Origen de la heterogeneidad

Con el objetivo de estudiar por cryo-EM la estructura de complejos macromoléculas es necesario aislar cada uno de estos complejos utilizando diferentes técnicas bioquímicas

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

de purificación. El objetivo de la purificación es obtener una muestra lo más homogénea posible que pueda ser utilizada siguiendo la estrategia de partículas individuales. En muestras donde no se consigue una purificación perfecta existen potentes algoritmos de clasificación que permiten separar los diferentes tipos de moléculas (Amunts et al., 2014). También es posible clasificar diferentes estados estructurales de la misma macromolécula (Fernandez et al., 2013) que pueden convivir simultáneamente en la misma preparación. Luego, la muestra es finalmente purificada en el ordenador en vez de usar procesos bioquímicos que a menudo son arduos, costosos y pueden dañar la muestra modificando la estructura de la macromolécula en estudio.

Existen diferentes tipos de purificación de muestras biológicas. Para el tipo de muestras utilizadas en esta tesis se utiliza la centrifugación diferencial a través de un gradiente de densidad de sacarosa o glicerol, que tiene como objetivo principal aislar los complejos celulares de acuerdo a su densidad (Stark, 2010). Siguiendo este método de purificación, se crean diferentes concentraciones de soluto (ej. sacarosa o glicerol) a lo largo de un tubo de centrifugación produciendo un gradiente de densidad con una concentración baja en la parte superior que será gradualmente incrementada hasta la parte inferior del tubo. Una vez creado el gradiente, la muestra es cargada en la parte superior del tubo y un proceso de ultracentrifugación hace que los diferentes complejos celulares en la muestra sean localizados en cada una de las diferentes fracciones de densidad a lo largo del tubo. Después se colectan las diferentes fracciones del gradiente de densidad resultante, donde cada fracción debería contener una población homogénea de cada complejo celular. Sin embargo este proceso de purificación no es perfecto, por lo que se pueden encontrar diferentes tipos de complejos macromoleculares en una misma fracción del gradiente de densidad. En esta tesis se ha diseñado una herramienta que puede ser entrenada para evaluar la distribución y heterogeneidad de cualquier tipo de muestra, de la misma forma que puede detectar e identificar partículas correspondientes a contaminación en forma de cristales de hielo. De esta forma será posible evaluar en tiempo real la distribución de la muestra de interés en cada una de las imágenes cryo-TEM durante la adquisición, y cambiar la estrategia de adquisición de acuerdo a esta evaluación en tiempo real, incluso si la muestra es heterogénea. El método de identificación de diferentes tipos de partículas ayudará en el proceso de purificación “*in-silico*”.

2.5.2 La estructura del ribosoma

La principal macromolécula biológica que ha sido utilizada en esta tesis es el ribosoma. El ribosoma, compuesto de ácido ribonucleico (RNA) y proteína, sintetiza proteínas a partir de la información contenida en el RNA mensajero mediante un proceso denominado traducción (Laursen et al., 2005). Se trata de una macromolécula dinámica de tamaño nanométrico y tiene una estructura flexible con componentes móviles necesarios para la realización de su función (Spirin, 1969).

El ribosoma está compuesto por dos subunidades: la mayor y la menor. Mientras que la subunidad mayor cataliza la formación del enlace peptídico, la subunidad menor realiza la traducción del código genético, monitorizando la interacción entre mRNA y tRNA. En las células los ribosomas pueden aparecer en diferentes estados oligoméricos: como subunidades disociadas y aisladas, como ribosomas completos o formando grupos asociados a un mismo mRNA (polisomas). Los ribosomas y sus subunidades son identificados por su coeficiente de sedimentación en unidades *Svedberg* (S). Las muestras de ribosomas han sido caracterizadas por cryo-EM durante más de 20 años (Frank, 1996), y disfrutan de ciertas características que son favorables para la determinación de su estructura por cryo-EM: su gran contenido de RNA por una parte, y su gran peso molecular (2.8 MDa para los ribosomas procariotas 70S y ~4 MDa para los ribosomas eucariotas 80S) por otra parte dan lugar a imágenes de relativamente alto contraste en comparación con otros complejos macromoleculares biológicos. Además el RNA es mucho menos sensible a la radiación del haz de electrones que las proteínas, lo que hace que preserve mejor su estructura en sesiones cryo-TEM.

Utilizando la técnica de cryo-EM (Agirrezabala & Valle, 2015) se ha conseguido resolver la estructura de diferentes estados conformacionales del ribosoma durante el ciclo de síntesis de proteínas. Las diferentes estructuras de complejos ribosomales interaccionando con el RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) o diferentes factores ribosomales han permitido delinear la secuencia de diferentes conformaciones estructurales que son necesarias para completar su función de traducción, mostrando los sitios de interacción de los RNA de transferencia y diferentes factores en el ribosoma (Frank & Agrawal., 2000; Gabashvili et al., 2000; Valle et al., 2003).

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

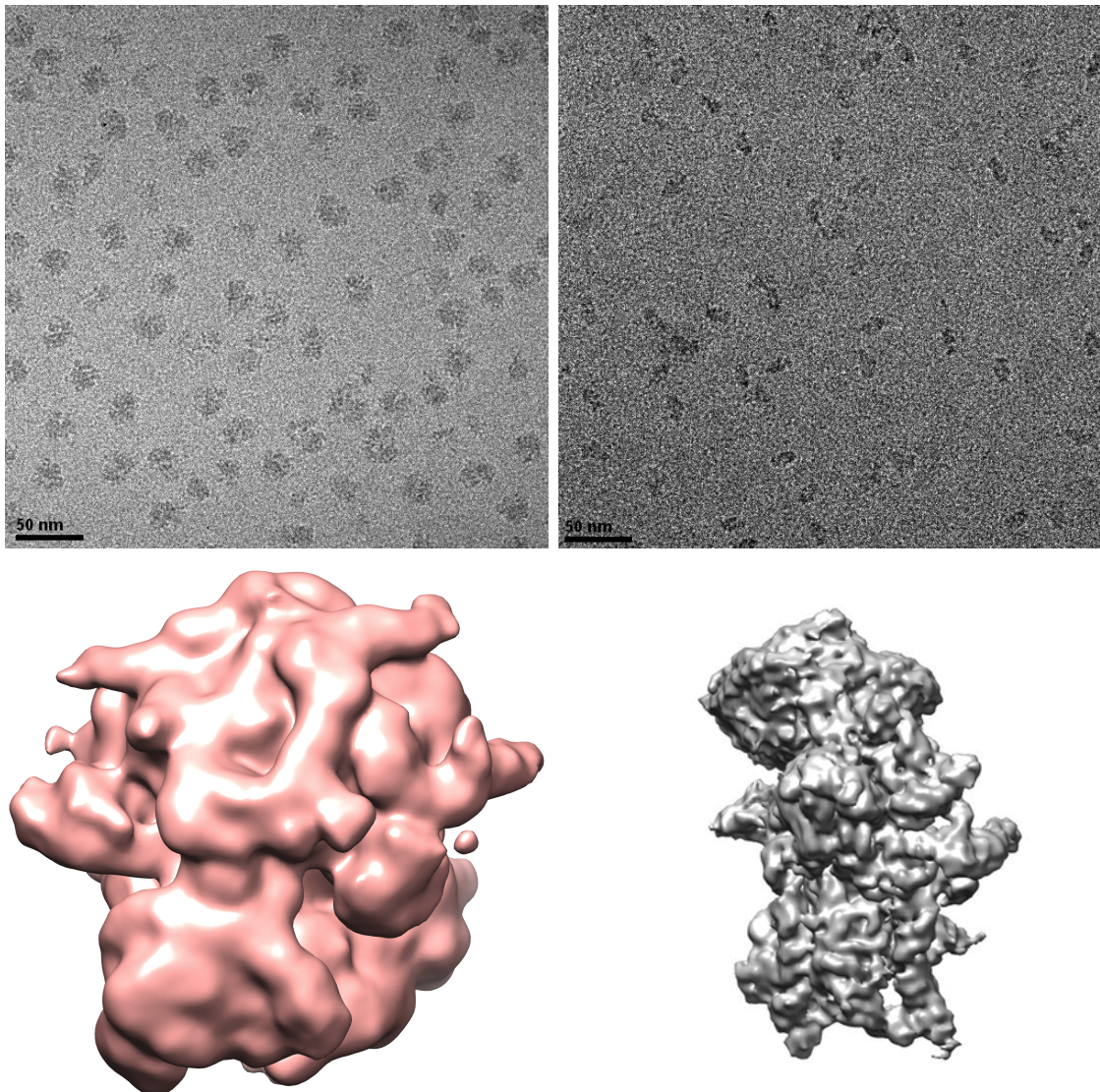


Figura 2.11: A la izquierda, se muestra una imagen de cryo-TEM con proyecciones de ribosomas 80S y debajo una vista del correspondiente mapa 3DEM del ribosomas 80S reconstruido por investigadores del CIC bioGUNE. A la derecha, se muestra una imagen de cryo-TEM conteniendo proyecciones de ribosomas 40S y debajo una vista de un mapa 3DEM de la subunidad ribosomal 40S (EMD-2450)

En las células eucariotas, los ribosomas tienen un coeficiente de sedimentación de 80S y miden aproximadamente 32 nm (Ramakrishnan & Moore, 2001) (ver figura 2.11). Al igual que los procariotas se dividen en dos subunidades de distinto tamaño: la subunidad mayor se denomina 60S y la subunidad menor 40S. En este trabajo se han utilizado ribosomas 80S extraídos de células de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Por otro lado, en las células procariotas los ribosomas tienen un coeficiente de sedimentación de 70S y miden aproximadamente 29 nm. El ribosoma procariota 70S

(en este trabajo, se ha usado el de la bacteria *Escherichia coli*) está formado por la subunidad mayor 50S y la subunidad menor 30S (Julián et al., 2008; Julián, 2010). La vista frontal de la subunidad pequeña tiene forma trapezoidal y es más estrecha cuando se tiene una visión lateral. En cambio la subunidad mayor tiene forma hemisférica y es aproximadamente dos veces la masa de la subunidad menor.

La ausencia de simetría en el ribosoma hace necesario conseguir muchas más partículas para poder caracterizar el mayor número de orientaciones posible. Esta falta de simetría combinada con la posible variabilidad estructural, implica el uso de cientos de miles, incluso millones de partículas para poder obtener resolución atómica de una conformación determinada. Para ello es necesario utilizar métodos de clasificación 3D donde se encuentre una población homogénea de la conformación de interés, que en ocasiones representa menos del 10% de todo el set de partículas (Agirrezabala et al., 2013).

2.5.3 La estructura de los virus icosaédricos

Los virus son agentes infecciosos, parásitos intracelulares que representan a las entidades vivientes más abundantes en la biosfera, superando numéricamente a sus organismos huésped por varios órdenes de magnitud. Se describen como ensamblados de tamaño nanométrico con diámetros entre 10 – 300 nm, capaces de realizar por sí mismos funciones tan complejas como son el auto-ensamblaje de nuevas partículas virales, el transporte y la replicación del material genético. Los dos pasos fundamentales en el ciclo de vida de los virus son la encapsidación del genoma para formar un virus infeccioso y la liberación del genoma durante la entrada del virus para infectar la célula huésped (ya sea eucariota, procariota o arquea). Determinar la estructura viral es de vital importancia para entender el mecanismo a través del cual un virus infecta a su huésped, con el objetivo de poder diseñar inhibidores basados en la estructura. La mayor parte de la investigación biomédica de virus está dedicada a virus humanos y de animales, sin embargo los virus dedicados a infectar células bacterianas o de arquea también son estudiados como un modelo de trabajo para obtener más conocimiento sobre los mecanismos moleculares de patógenos relacionados o para realizar estudios evolutivos.

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

Los virus se componen del material genético, ya sea DNA o RNA de cadena simple o doble y una cubierta proteica o glicoproteica encargada de proteger el material genético, llamada cápside. En algunos virus también se puede encontrar una envoltura lipídica situada entre la cápside y el material genético. El tamaño y la forma de las cápsides se determina durante el proceso de ensamblado y maduración pudiendo adquirir forma esférica, helicoidal o icosaédrica. Como puede verse en la figura 2.12 los virus pueden adquirir numerosas formas y tamaños diferentes en la naturaleza, aunque las cápsides con simetría icosaédrica (60-fold) son las que predominan, dado que resulta ser la forma más eficiente para montar bloques de un determinado tamaño obteniendo un armazón que encierra el mayor volumen posible. Una cápside icosaédrica simple está formada por 60 copias de bloques dispuestos alrededor de los tres diferentes ejes de simetría 5-3-2: los ejes de simetría de orden 2 pasan por el centro de cada una de las 30 aristas del icosaedro, los ejes de simetría de orden 3 atraviesan los centros de cada triángulo equilátero que forman las 20 caras del icosaedro y los ejes de simetría de orden 5 conectan cada uno de los vértices de los 12 pentámeros del icosaedro con el centro de la cápside. Una forma de definir una cápside icosaédrica es su número de triangulación, que define el número de triángulos en el cual está subdividida la cara fundamental del icosaedro. El número de triangulación viene dado por la relación $T = h^2 + hk + k^2$, donde h y k son números enteros que definen la posición de los pentones en la red hexagonal original.

Las estructuras 3D de los virus icosaédricos son fácilmente reconstruidas por cryo-EM a partir de sus proyecciones 2D explotando su simetría icosaédrica (Adrian et al., 1984; Agirrezabala et al., 2007; Fuller et al., 1996; Grigorieff & Harrison, 2011; San Martín, 2015). El tamaño del set de datos requerido para conseguir una cierta resolución en una reconstrucción icosaédrica es relativamente bajo dado que cada proyección puede contribuir a la reconstrucción en 60 orientaciones diferentes. Los métodos de reconstrucción de virus icosaédricos suelen utilizar un método comparativo utilizando proyecciones basadas en una referencia. Este método busca las proyecciones experimentales que mayor valor de cross-correlación ofrezcan con las de referencia y realiza un refinamiento angular iterativo.

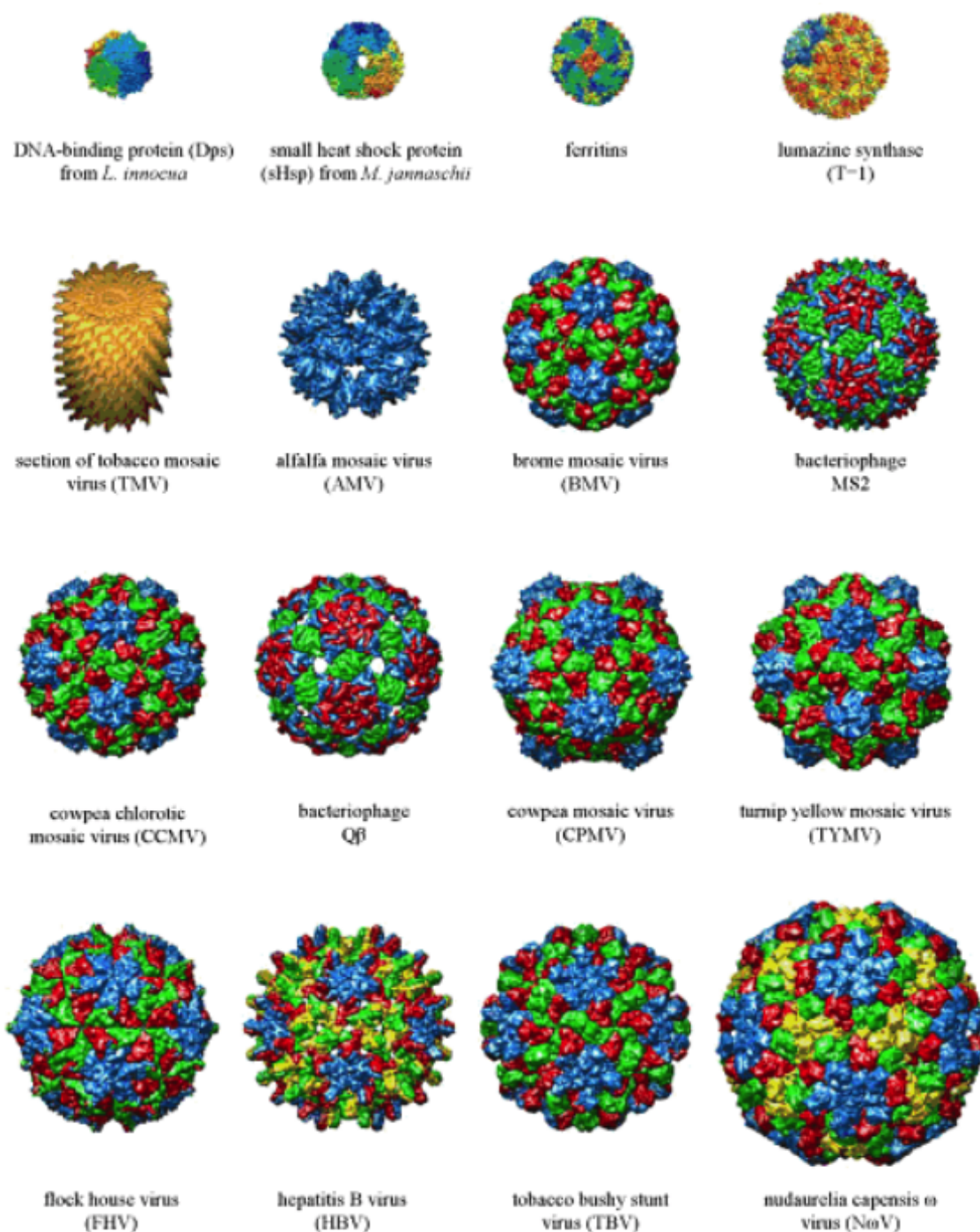


Figura 2.12 Estructuras 3D representativas de partículas virales con diferentes formas y tamaños. Figura de Prasuhn, 2007

Aprovechando la simetría icosaédrica de los virus se ha demostrado que es posible utilizar una sola imagen de cryo-TEM para obtener automáticamente una reconstrucción 3D de un virus icosaédrico en tiempo real durante una sesión en el TEM (Cardone et al., 2013; Yan et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento no existe ningún identificador de partículas que permita tomar decisiones en tiempo real durante una sesión cr-

2. ANTECEDENTES: TEM EN BIOLOGIA ESTRUCTURAL

yo-TEM y que además permita identificar automáticamente las diferentes poblaciones presentes en una muestra heterogénea. Por este motivo en esta tesis se ha utilizado el peor escenario posible para validar el nuevo sistema de identificación de partículas en tiempo real basado en sistemas neuro-difusos: una preparación compuesta de una mezcla de ribosomas 80S de *Drosophila* y un virus icosaédrico, concretamente *Flock House Virus* (FHV). Este virus de ~35 nm de diámetro es de la familia *Nodaviridae*, presenta uno de los genomas conocidos más pequeño entre los virus de RNA de animales y una estructura icosaédrica con un número de triangulación $T=3$ (Jovel & Schneemann, 2011; Odegard et al., 2010).

En las imágenes cryo-TEM los virus icosaédricos son fácilmente identificables. El virus icosaédrico de arquea HHIV-2 (Gil-Carton et al., 2015) por ejemplo es muy grande, ya que presenta un diámetro de ~80 nm y además, contiene una envoltura lipídica que rodea el material genético. No obstante, la toma de imágenes de partículas virales de este tipo también puede ser problemática debido a que la tensión superficial (las fuerzas cohesivas entre las moléculas de un líquido) tiende a situar a los virus en el borde del agujero, alejándolos del centro (donde el hielo es más fino y es recomendable recoger imágenes). En 2014 se realizó con esta muestra una sesión cryo-TEM en un servicio externo con un TEM modelo *Titan Krios* de última generación y utilizando un esquema de automatización basado en un *atlas* de toda la rejilla. El resultado fueron más de 1000 imágenes adquiridas en los centros de los agujeros sin la presencia de las proyecciones de los virus debido a que se encontraban en el borde de los agujeros. Por lo tanto es muy importante que un sistema de identificación de partículas automático sea capaz de localizar las partículas válidas en las imágenes adquiridas y un esquema de control más inteligente sea capaz de seleccionar la mejor región del agujero durante una sesión cryo-TEM automatizada.

En este trabajo se presenta un sistema de identificación de partículas en imágenes de cryo-TEM capaz de realizar esta tarea y además se ha demostrado la validez de este sistema de identificación para clasificar diferentes poblaciones. En el Capítulo 5 demostraremos cómo el nuevo sistema de identificación de partículas es capaz de identificar automáticamente las diferentes poblaciones de una muestra heterogénea permitiendo realizar la reconstrucción 3D de forma automática, en particular del virus icosaédrico FHV.

Capítulo 3

Sistema experto utilizado para control: sistemas neuro-difusos y visión artificial

La inteligencia artificial (AI) es un área multidisciplinar que estudia la creación y diseño de sistemas capaces de resolver problemas complejos por sí mismos, utilizando como paradigma la inteligencia humana. En 1955 John McCarthy definió la «inteligencia artificial» como la ciencia e ingenio de hacer máquinas inteligentes y programas de cómputo inteligentes (McCarthy et al., 1955). En la actualidad la AI está presente en nuestro día a día; por ejemplo cuando en una cámara fotográfica un algoritmo de AI identifica las caras sonrientes de la imagen, las enfoca, y dispara automáticamente. Como también es cotidiano poder controlar algunas funciones de nuestro vehículo o de nuestros teléfonos inteligentes utilizando complejos algoritmos de reconocimiento de voz. Las técnicas de AI también se utilizan actualmente en la planificación de procesos industriales o en el área de control de sistemas en la industria.

Para poder confirmar si una máquina es o no inteligente ésta debe pasar el Test de Turing (Turing, 1950), que afirma que si una máquina puede actuar como un humano, entonces se puede decir que es inteligente y debe tener las siguientes capacidades:

- *Reconocimiento del lenguaje natural (NLP)* en el que hablamos los humanos. Es un área de la AI que se ocupa de las capacidades de comunicación de los ordenadores con los humanos utilizando su propio lenguaje.

- *Razonamiento automático*, llegando a conclusiones a partir de una serie de premisas. Es posible utilizar la teoría difusa y los sistemas de inferencia difusa.
- *Aprendizaje automático* para poder adaptarse al medio. La máquina tiene que ser capaz de hacer generalizaciones a partir de ejemplos sacados del entorno. Para esto se pueden utilizar técnicas como las redes bayesianas (o de Markov) o las redes neuronales.
- *Representación del conocimiento*. Es una rama de la AI que investiga las técnicas de almacenamiento de información de forma que sea fácilmente accesible y, sobre todo, utilizable por los sistemas inteligentes.

En esta tesis se ha diseñado un sistema experto (ES) que es integrado en un nuevo esquema de control que permite automatizar la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM, de forma similar a como lo haría un experto en el área. En este capítulo se describen cada uno de los algoritmos de inteligencia artificial utilizados en la fase de desarrollo del sistema experto dedicado a tomar decisiones siguiendo un novedoso esquema de control en la adquisición automática de datos para cryo-EM.

3.1 Introducción a los sistemas expertos

En los años 70 surgió un nuevo paradigma en la AI, los sistemas expertos (ES), cuya función es desarrollar trabajos similares a los que desarrollaría un especialista en un área determinado. Los sistemas expertos son el producto de diferentes técnicas de AI pero no intentan sustituir a los expertos humanos, sino que sirven de apoyo a los especialistas para realizar con más rapidez y eficacia todas las tareas que realizan en un dominio de aplicación específico (Turban & Aronson, 2001). Los sistemas expertos usan el conocimiento humano de uno o varios expertos en un área específico (Durkin, 1994) para resolver un conjunto de problemas que normalmente requerirían la inteligencia humana, representando este conocimiento experimental en forma de datos y/o reglas que puedan ser usados para resolver problemas en tiempo real.

Los sistemas expertos emulan el razonamiento de un experto en un dominio concreto basándose en el conocimiento declarativo para realizar la evaluación del sistema en tiempo real y el conocimiento de control que contiene la información sobre el seguimiento de una acción. Se utiliza este conocimiento y procedimientos de inferencia para

resolver problemas que resultan lo suficientemente difíciles para necesitar la experiencia de un experto humano (Feigenbaum, 2003). Un sistema experto tiene que ser capaz de llegar a conclusiones lógicas a partir de hechos o premisas incluso cuando hay cierto nivel de incertidumbre. El objetivo final es aumentar la calidad y rapidez de las respuestas del sistema controlado en tiempo real, ofreciendo una mejora de su productividad.

3.1.1 Programación de sistemas expertos

Principalmente existen tres tipos de sistemas expertos: los basados en reglas previamente establecidas, los cuales aplican reglas heurísticas apoyadas generalmente en lógica difusa para su evaluación y aplicación; los que aplican el razonamiento basado en casos, donde la solución a un problema similar planteado con anterioridad se adapta al nuevo problema; y los que aplican redes bayesianas, luego basados en algoritmos estadísticos y el teorema de Bayes. En este trabajo se utilizan los ES basados en reglas, donde es necesario definir una base de conocimientos, una base de hechos y un motor de inferencias. Para su programación son necesarios:

- **Especialistas Humanos:** Para desarrollar los sistemas expertos primero hay que seleccionar a los especialistas capaces de resolver los problemas en el área de trabajo. Estos especialistas son expertos en un dominio específico (dominio de experticidad).
- **Ingenieros del Conocimiento:** Una vez seleccionado al experto (o a los expertos) el ingeniero extrae el conocimientos al experto y le da una representación en forma de reglas (o similar), conformando así la base del conocimiento del sistema experto.
- **Base del conocimiento:** Contiene el conocimiento declarativo extraído del diálogo con el experto. Contiene el conjunto de reglas que permiten representar el conocimiento del experto en su dominio de experticidad, donde cada regla aisladamente tiene significado propio. Una regla de inferencia es una combinación de hechos que permite representar el conocimiento y sacar las inferencias de los mismos y son del tipo: SI (Premisa) ENTONCES (Conclusión), donde tanto las premisas como las conclusiones son una cadena de hechos conectados por “Y” o por “O”.

- Base de hechos es la memoria de trabajo que contiene los hechos sobre cada problema a resolver.
- Módulos de justificación: Explica el razonamiento utilizado por el sistema para llegar a una determinada conclusión.
- Motor de inferencia: Modela el proceso de razonamiento humano en forma de un programa de control cuya función es seleccionar las reglas para solucionar cada problema. Luego, el mecanismo que selecciona las reglas, las ejecuta y obtiene las inferencias adecuadas para resolver cada problema es el motor de inferencias.
- Interfaz de usuario es la interacción entre el ES y el usuario, y se realiza mediante el lenguaje natural.

Para que un sistema experto sea una herramienta efectiva, los usuarios deben interactuar con él de una forma fácil. Para esto tiene que ser capaz de explicar sus razonamientos o base del conocimiento generando la explicación para cada una de las reglas que sigue el sistema experto, las cuales se basan en hechos y también debe ser capaz de adquirir nuevo conocimiento razonando y aprendiendo.

3.1.2 Sistemas expertos en aplicaciones de control

Muchos de los sistemas cotidianos pueden considerarse complejos por naturaleza y deben ser controlados de alguna manera. Los sistemas complejos pueden ser lineales o no lineales, continuos o discretos, variables o invariables en el tiempo, estáticos o dinámicos, centralizados o distribuidos, predecibles o impredecibles, bien o mal definidos, con variables de salida medibles o no medibles. Los sistemas complejos suelen consistir en muchos subsistemas, sub-procesos o componentes diferentes interconectados, donde cada parte realiza la función para la que está diseñada. El ejemplo más claro son las plantas industriales a gran escala.

Para poder mejorar el rendimiento de un sistema complejo es fundamental modelarlo correctamente ya que los modelos permiten entenderlo mejor y ayudan al análisis del mismo. El principal objetivo es controlar el sistema para optimizar la respuesta (Jamshidi, 1997; Kamiya et al., 2005). No obstante, en la práctica la mayoría de los sistemas a controlar están mal definidos por naturaleza y por tanto, son difíciles de modelar. Tanto

el diseño, optimización y supervisión de controladores como la detección y diagnóstico de fallos se basan en el modelado de sistemas; esto ayuda también en el diseño de nuevos procesos analizando los existentes. Como la precisión del control del sistema depende de la precisión del modelo es muy importante desarrollar un modelo que refleje correctamente el comportamiento del sistema a controlar incluyendo técnicas de identificación. Los métodos convencionales para modelar sistemas dependen de herramientas matemáticas que requieren un conocimiento preciso sobre la física en cada uno de los procesos. En sistemas donde el modelo matemático no está disponible y no es posible usar los métodos convencionales para su análisis, se pueden utilizar métodos de modelado basados en *soft computing* (Cherkassky, 1998; Dote & Ovaska, 2001). Esta aproximación proporciona una alternativa viable para el control del sistema a partir del conocimiento y los datos disponibles. Este es uno de los fundamentos para crear sistemas expertos o sistemas de control inteligente desde un punto de vista práctico, que es la base de la AI.

Un ES dedicado al control de un sistema complejo debe realizar las tareas descritas a continuación:

- Un ES tiene que tener la capacidad de monitorización, comparando continuamente los valores de las señales o datos de entrada con unos valores que actúan como criterios de normalidad. El programa debe determinar en cada momento el estado de funcionamiento del sistema complejo, anticipándose a las posibles dificultades que pudieran surgir. Un modelo computacional que simule el razonamiento de un experto humano debería proporcionar resultados equivalentes a los alcanzados por dicho experto.
- Un ES destinado al control debe realizar las tareas de interpretación, diagnóstico y reparación de forma secuencial. Con ello se consigue conducir o guiar un proceso o sistema. Los sistemas de control son complejos debido al número de funciones que deben manejar y el gran número de factores que deben considerar; esta complejidad creciente es otra de las razones que apuntan al uso del conocimiento, y por tanto de los ES.
- La finalidad de un ES es realizar las acciones de reparación que consiste en la proposición de las acciones correctoras necesarias para la resolución de cada dificultad, de la forma más rápida y eficiente posible.

Los sistemas expertos difieren de la programación tradicional en que la base del conocimiento está separada del motor de inferencia o el método del procesamiento del conocimiento. Esta característica permite que todo el conocimiento adicional pueda ser añadido al sistema sin necesidad de tener que ser reprogramado todo el sistema.

3.2 Metodologías de soft computing

El *soft computing* es una rama de la AI centrada en el diseño de sistemas inteligentes capaces de manejar adecuadamente la información incierta, imprecisa y/o incompleta (Burgohain & Mahanta, 2008; Hamdan, 2013; Kanta et al. 2011). Esta cualidad permite abordar problemas reales obteniendo soluciones más robustas, manejables y de menor coste que las obtenidas mediante técnicas convencionales. Las principales técnicas que componen el *soft computing* son la lógica difusa, las redes neuronales, la computación evolutiva y el razonamiento probabilístico. Desde que Lotfi Zadeh acuñó el término *soft computing* en 1991, este área ha experimentado un rápido desarrollo tanto en sus aspectos teóricos como en sus aplicaciones. Las técnicas de *soft computing* abordan problemas teóricos de gran diversidad como son el modelado, optimización, planificación, control, predicción y minería de datos. Este tipo de técnicas se aplican en producción industrial, logística, energía, banca o agroalimentación entre otras áreas.

Cualquiera de las metodologías de *soft computing* debe ser capaz de adaptarse a la imprecisión del mundo real, siendo tolerante a imprecisiones, incertidumbres y verdades parciales. De esta forma la mente humana puede ser considerada como un modelo base para *soft computing*. Más que una sola técnica, *soft computing* es una colección de metodologías basadas en redes neuronales, lógica difusa, algoritmos genéticos y diferentes algoritmos de optimización usados en AI como es la búsqueda Tabú. Las redes neuronales tienen la ventaja inherente de poder adaptarse por si mismas, teniendo también capacidad de aprendizaje. La lógica difusa tiene la habilidad de tener en cuenta la incertidumbre e imprecisión que prevalecen en los sistemas reales, con la ayuda de reglas difusas IF-THEN que contienen el conocimiento de un experto que controle el sistema real a modelar. Para poder explotar la ventaja de las dos metodologías existe un sistema híbrido conocido como sistemas de inferencia difusa basados en redes adaptables (ANFIS). Estos sistemas se basan en usar algoritmos de aprendizaje de redes neuronales para ajustar los parámetros del sistema difuso basado en el conocimiento de un experto.

3.2.1 Algoritmos basados en redes neuronales

Además de ser la fuente de inteligencia natural, el cerebro humano puede procesar rápidamente información incompleta obtenida por percepción del entorno. Inspirados por las propiedades biológicas del sistema nervioso y el cerebro, los investigadores han intentado emular el cerebro humano, lo que ha resultado en el desarrollo de las redes neuronales artificiales. El cerebro humano ha sido modelado como un sistema dinámico no lineal y continuo en el tiempo con una arquitectura que conecta diferentes neuronas (o unidades de procesamiento), las cuales están interconectadas entre sí utilizando pesos en las conexiones (Nelson & Illingworth, 1991). Esta arquitectura da a las redes neuronales la capacidad de aprender y adaptarse ajustando las interconexiones entre capas. Las Redes Neuronales Artificiales (ANN) son una técnica de aprendizaje y procesamiento automático, inspiradas en el funcionamiento de las redes neuronales biológicas del cerebro humano, de forma que aprenden de la experiencia, generalizan de ejemplos previos a ejemplos nuevos y abstraen las características principales de una serie de datos. Podemos definir las ANN como modelos conexionistas formados por una estructura de procesamiento paralelo masivo constituida por unidades muy sencillas y altamente interconectadas (denominadas neuronas), que tienen la capacidad de almacenar conocimiento experimental y ponerla a disposición para su uso. Estas conexiones contienen pesos sinápticos utilizados para almacenar el conocimiento adquirido.

Neuronas, pesos y función de activación

Cada neurona recibe un conjunto de entradas multiplicadas por su interconexión (peso), que son sumados, como se muestra en la figura 3.1. Una neurona es una unidad de procesamiento de información que recibe varias señales de sus conexiones de entrada, cada una de las cuales tiene un peso asignado. Estos pesos corresponden a la eficiencia sináptica en neuronas biológicas y son el medio básico para la memoria a largo plazo de las ANNs (Negnevitsky, 2005). Normalmente los pesos iniciales de la red son inicializados a valores aleatorios y la corrección de los pesos se realiza a través del proceso de entrenamiento de la red. La suma de las entradas a cada neurona es modificada por una función de activación, usada para transformar el nivel de activación de esa neurona en una señal de salida. La salida de la neurona se puede conectar a las entradas de otras neuronas artificiales mediante conexiones ponderadas. El comportamiento de la ANN depen-

de tanto de los pesos (*weights*) como de la función de activación de cada neurona. Por lo tanto cada neurona está caracterizada por (i) la entrada, que es la suma del flujo que viene de las otras neuronas anteriores, (ii) la función de activación f o φ que codifica la no-linealidad del problema en la escala de las neuronas y (iii) la salida resultante de la transformación en la neurona o valor de activación (Pham & Xing, 1995).

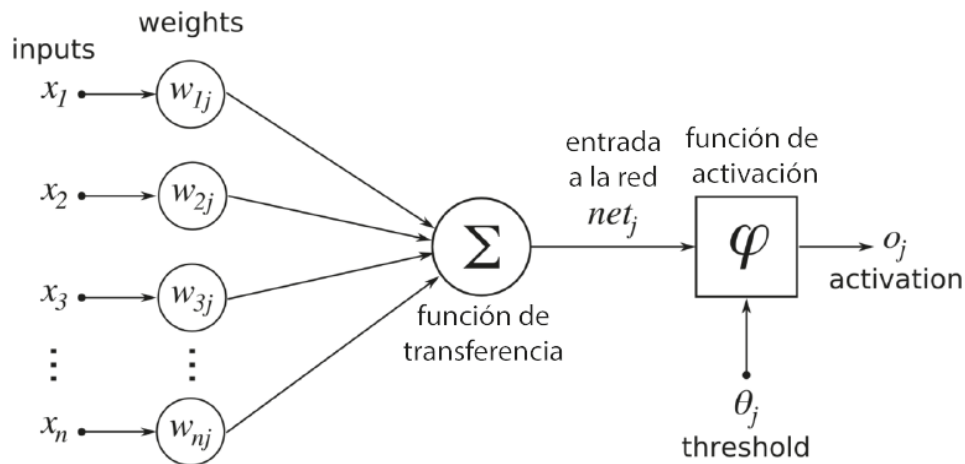


Figura 3.1: Diagrama de una Neurona Artificial

La red propaga el patrón de entrada de capa a capa hasta que se genera el patrón de salida en la capa de salida. Algunos ejemplos de funciones de activación más usadas son la función escalón, la función sigmoide, la función lineal o la función tangencial hiperbólica (Andries, 2002).

- Función lineal:
$$f(x) = x \tag{3.2.1}$$

- Función Sigmoide:
$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}} \tag{3.2.2}$$

- Función tangencial hiperbólica:
$$f(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} \tag{3.2.3}$$

Arquitectura de las ANN

La arquitectura (o topología) de la red hace referencia a la disposición de las neuronas en la red. Las neuronas están organizadas en grupos llamados niveles o capas, donde cada capa tiene su propia función de activación. Una red típica consiste en una secuencia de capas con conexiones entre capas adyacentes consecutivas y normalmente organi-

zadas en tres grupos principales: todas las neuronas de entrada forman la capa de entrada, las neuronas en capas intermedias forman las capas ocultas y finalmente, todas las neuronas de salida forman la capa de salida, como puede verse en la figura 3.2. (Nelson & Illingworth, 1991).

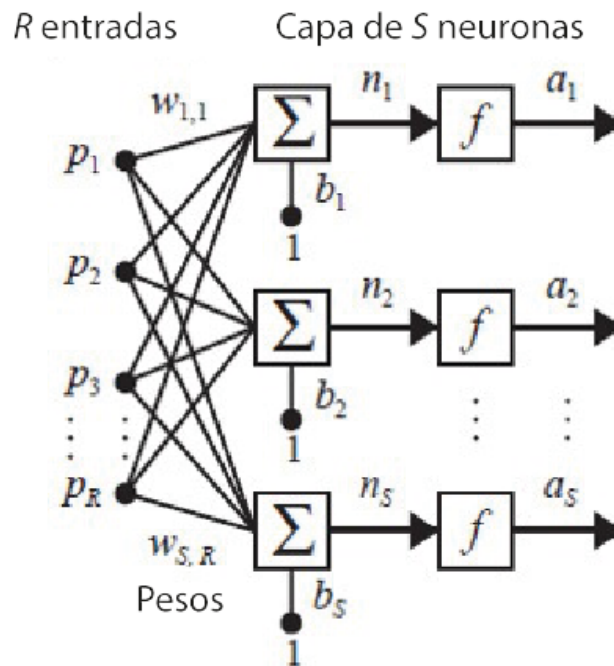


Figura 3.2: Arquitectura de una Red Neuronal Simple

Algunas de las arquitecturas de redes neuronales más populares son redes “*Back-propagation*”, “*Multi-layer perceptron*” (MLP), “*Radial basis function network*” (RBFN) y las redes *neuro-fuzzy* (o neuro-difusas) que usaremos en esta tesis. El uso de redes neuronales para realizar tareas de modelado e identificación de sistemas complejos es debido a su capacidad de adaptación y aprendizaje a partir de un set de datos de entrada y salida mediante un proceso iterativo, sin requerir un conocimiento previo de las relaciones entre las variables del proceso (O’Leary, 1998). En una red neuronal los parámetros que hacen funcionar la red para el problema específico son los pesos que se encuentran en las conexiones entre neuronas. Es por ello necesario ajustar el valor de cada uno de estos pesos una vez seleccionada la arquitectura de la red y el número de nodos.

Capacidades de las ANN

Las redes neuronales deben tener las siguientes capacidades:

- *Capacidad de aprendizaje de un set de datos experimentales.* Las ANN pueden cambiar su comportamiento en función del entorno para producir unas salidas consistentes, ajustándose ellas mismas usando un conjunto de entradas y salidas. El aprendizaje de la red consiste en ajustar los pesos y valores umbral hasta minimizar el error entre el patrón de salida deseado y el experimental por debajo de algún nivel definido (Bishop, 2007; Singh et al., 2012). En el desarrollo de una red neuronal no hay que programar ni el conocimiento ni las reglas del procesamiento del conocimiento, ya que las aprende ajustando las conexiones ponderadas entre las neuronas de distintas capas de la red. Luego las ANN, a diferencia de los algoritmos con instrucciones previamente programadas, deben ser previamente entrenadas. Esto significa que a la red se le muestra en su capa de entrada unos ejemplos y ella misma se ajusta en función de alguna regla de aprendizaje. Para programar una red neuronal artificial se utiliza una base de datos experimental dividida en tres diferentes subgrupos de datos para entrenamiento (determinación de pesos de la red (Attoh-Okine, 1999)), test (generalización de los resultados de la red (Reich & Barai, 1999; Reich & Barai, 2000)) y finalmente, validación de los diferentes parámetros de la red neuronal (arquitectura, número de neuronas, algoritmo de entrenamiento, etc.). Uno de los algoritmos de entrenamiento más común es "*back propagation*", el cual optimiza el valor de los pesos intentando minimizar la suma de las diferencias al cuadrado entre los valores deseados y los valores reales de las neuronas de salida (Bishop, 2007; Celikoglu, 2006).
- *Capacidad de generalización.* Las ANN se extienden o se amplían automáticamente debido a su propia estructura y naturaleza. Estas redes pueden ofrecer, dentro de un margen, respuestas correctas a entradas que presentan pequeñas variaciones debido a los efectos de ruido o distorsión. Las ANN son "asociativas", lo que significa que para una entrada parcial la red elegirá la entrada más parecida y generará una salida que corresponda a la entrada completa. La memoria o el conocimiento de estas redes está distribuida a lo largo de todas las conexiones ponderadas de la red y la naturaleza de la memoria de las ANN permite que la red responda adecuadamente cuando se le presenta una entrada incompleta o con ruido. Esta propiedad suele ser referida como la capacidad de "generalización".

- *Capacidad de abstracción.* Algunas ANN son capaces de abstraer la esencia de un conjunto de entradas que aparentemente no presentan aspectos comunes o relativos. Teniendo la habilidad de aprender a partir de datos de referencia, las redes neuronales son muy eficientes detectando patrones en un set de datos, aprendiendo de las relaciones y adaptándose a ellos. El conocimiento adquirido por la red neuronal artificial en el proceso de aprendizaje será posteriormente usado para predecir el resultado para una nueva combinación de datos.
- *La estructura de las ANN las hace robustas frente al fallo de unidades aisladas.* Otra característica de las ANN es la tolerancia a la falta (*Fault Tolerance*), ya que si varias neuronas resultaran destruidas, o se alteraran las conexiones el comportamiento de la red sería mínimamente modificado. El comportamiento varía pero el sistema no se descompone o deja de funcionar. Esta característica se debe a que las ANN tienen la información distribuida a lo largo de toda la red y no está contenida en un único lugar.

Aplicaciones de las ANN

Desde el punto de vista de la ingeniería en aplicaciones industriales las ANNs pueden ser vistas como un gran sistema dinámico que procesa en paralelo realizando transformaciones por medio de la respuesta de estado de la información de entrada. El modo en el que se lleva a cabo la transformación depende del modelo de la ANN y de su forma de aprender la transformación. El área de aplicación más natural de las ANNs son obviamente las tareas en las cuales se deben obtener las transformaciones apropiadas de ciertas entradas a ciertas salidas; pero las transformaciones no pueden ser descubiertas analíticamente debido a la variedad de factores involucrados en ellas. Por lo tanto no es sorprendente que la mayoría de las aplicaciones exitosas de ANN puedan ser encontradas en áreas como la visión de máquinas, reconocimiento de patrones, control de motores, procesamiento de señales, ingeniería aeroespacial (e.g. pilotos automáticos, simulaciones de trayectorias de vuelo, detección de fallo de componentes), automoción (e.g. sistemas de guiado automático, controladores, análisis de la garantía), finanzas (e.g. lectores automáticos de cheques, solicitudes de crédito, detección de fraude, calificación de bonos), defensa (e.g. seguimiento de objetos, reconocimiento facial, eliminación de ruido), medicina (e.g. análisis de células cancerígenas, diseño de prótesis, análisis de elec-

troencefalografía y electrocardiograma) o telecomunicaciones (e.g. reconocimiento y compresión de voz, compresión de imágenes y traducción en tiempo real de un idioma) (Ata, 2015; Bhardwaj & Tiwari, 2015; Burke et al., 1997; Cruz & Wishart, 2006; Delen et al., 2005; Du et al., 2014; Lisboa, 2002; Mohanraj et al., 2015; Suzuki, 2013; Szabo et al., 2002; Yoo et al., 2015).

Métodos neuro-difusos

El proceso de aprendizaje para las redes neuronales, cuyo conocimiento es adquirido automáticamente por el algoritmo “*backpropagation*”, es relativamente lento. Además, el análisis de la red entrenada es difícil al ser un modelo del tipo caja negra. En una red neuronal no es posible extraer el conocimiento estructural (reglas) ni integrar información especial sobre el problema para simplificar el proceso de aprendizaje. Los sistemas difusos (*fuzzy*) por el contrario son más favorables en explicar su comportamiento ya que se basan en reglas difusas y su funcionamiento puede ser ajustado modificando las reglas y las funciones de membresía (pertenencia). Debido a que la adquisición del conocimiento es difícil, suele estar restringido a áreas donde el conocimiento de un experto está disponible y el número de variables de entradas es pequeño.

En los sistemas de control basados en lógica difusa no es imprescindible partir de un modelo matemático del mismo, sino que como se ha explicado anteriormente el conocimiento de cómo funciona el sistema se explica mediante un conjunto de reglas tipo IF-THEN y la definición de las funciones de membresía. Las Redes Neuronales Artificiales por su propia naturaleza y comportamiento son incapaces de expresar de forma explícita el conocimiento adquirido, pero por el contrario presentan la capacidad de aprender y relacionar las variables del sistema a partir de datos obtenidos en experiencias anteriores.

La lógica difusa y los métodos metaheurísticos como los algoritmos genéticos, las redes neuronales o la búsqueda Tabú son métodos complementarios en la identificación y control de sistemas, y su combinación forma un sistema híbrido inteligente. Uno de los más utilizados son los sistemas híbridos neuro-difusos, que combinan los algoritmos de redes neuronales artificiales y la lógica difusa (Jang et al., 1997). La necesidad de un humano experto para crear las reglas difusas y la falta de capacidad de aprendizaje son algunas de las limitaciones de un FIS; es por ello que se combinan con las redes neuro-

nales, que proporcionan la capacidad de aprendizaje. En los sistemas neuro-difusos, la red neuronal con una estructura conexionista tiene la habilidad de reconocer patrones y adaptarse por si misma para enfrentarse con entornos cambiantes. Por otro lado, el FIS incorpora el conocimiento humano y lleva a cabo la inferencia y la toma de decisiones, teniendo en cuenta la imprecisión e incertidumbre de los sistemas complejos reales. El uso de sistemas híbridos inteligentes está creciendo rápidamente con aplicaciones exitosas en muchas áreas incluyendo el control de procesos, análisis de datos, diseño de ingeniería, comercio financiero, evaluación de crédito, diagnóstico médico, simulación cognitiva, etc.

El modelado por métodos neuro-difusos realiza la extracción del modelo a partir de datos numéricos que representan el comportamiento dinámico del sistema (Chiu, 1996; Jang, 1996; Jang & Sun, 1995; Lin & Cunningham, 1995). A partir de este modelo derivado se puede predecir el comportamiento del sistema y puede ser utilizado para el diseño de un controlador (Abrahamand & Nath, 2001; Kamiya et al. 2005; Thangavel et al., 2006). Una técnica inteligente basada en un sistema neuro-difuso tiene la habilidad de aprender y tiene la capacidad de explicar las decisiones. Por ejemplo las redes neuronales son buenas en el reconocimiento de patrones pero no pueden explicar cómo toman sus decisiones. Los sistemas de lógica difusa, los cuales pueden razonar con información imprecisa, son buenos explicando sus decisiones pero no pueden adquirir las reglas que usan para tomar decisiones automáticamente. Estas limitaciones han sido el motivo principal para el desarrollo de los sistemas neuro-difusos. Los sistemas neuro-difusos son una herramienta muy eficiente cuando se tiene sistemas muy complicados, en los cuales existe información lingüística e información en forma de sets de datos. La cooperación de ambas tecnologías en los sistemas neuro-difusos se realiza en los siguientes pasos:

- A partir del conocimiento que tienen los expertos del sistema a controlar se infieren las funciones de membresía y las reglas difusas que definen el modelo de sistema de inferencia difusa (FIS).
- Se establecen las conexiones y el valor inicial de los pesos de la red neuronal de acuerdo con el modelo difuso.
- Se aplica dicha Red Neuronal al sistema objeto de estudio.

- La red neuronal es entrenada con los datos obtenidos para mejorar su precisión.
- Después del entrenamiento, las conexiones y los pesos de la red neuronal son interpretados como funciones de membresía y reglas difusas. De esta manera queda explicitado el conocimiento adquirido por la red neuronal y el modelo difuso del sistema representa con mayor precisión al sistema real.

Aunque los FIS pueden codificar conocimiento de experto directamente usando reglas con etiquetas lingüísticas, normalmente se necesita mucho tiempo para diseñar y ajustar las funciones de membresía que cuantitativamente definen dichas etiquetas. Las técnicas de aprendizaje de redes neuronales pueden automatizar este proceso y reducir sustancialmente el tiempo de desarrollo y coste, además de mejorar el rendimiento. En general los sistemas neuro-difusos pueden ser clasificados en tres tipos, dependiendo como se realice la combinación entre las redes neuronales y los sistemas difusos:

- *Sistemas neuro-difusos cooperativos*: La red neuronal es usada en la fase inicial para determinar el set difuso y/o reglas difusas (e.g., usado en el algoritmo “*clustering*”, usando “*self-organising feature map*”) y entonces el sistema difuso es totalmente utilizado para ejecución.
- *Sistemas neuro-difusos concurrentes*: Las redes neuronales son usadas para proporcionar las entradas para un sistema difuso o para cambiar las salidas del sistema difuso. En este método los parámetros del sistema difuso no son cambiados por el proceso de aprendizaje.
- *Sistemas neuro-difusos híbridos*: Se emplea un algoritmo de aprendizaje inspirado por las redes neuronales para determinar sus parámetros a través de un proceso de aprendizaje. En los sistemas híbridos neuro-difusos las redes neuronales se utilizan para ajustar las funciones de membresía de los sistemas difusos previamente programados.

En esta tesis, se utiliza el sistema neuro-difuso híbrido para mejorar la precisión del modelo difuso que identifica automáticamente las partículas en imágenes para cryo-EM. La mejora se realiza gracias al proceso de aprendizaje usando imágenes de referencia. Para conseguir esto se usa una arquitectura de red neuronal “*feedforward*” con cinco capas conocida como sistema de inferencia neuro-difusa adaptativa (ANFIS) que explicaremos en la sección 3.2.5.

3.2.2 Introducción a la búsqueda Tabú

En problemas de programación lineal complejos, donde dado un conjunto de variables de entrada y un objetivo final fijado, existe una amplia variedad de combinaciones válidas de las variables de entrada para llegar al objetivo final, es necesario utilizar un método de optimización combinatoria que consiga salir de los mínimos locales y encuentre la mejor solución posible (la más óptima). Los problemas de optimización combinatoria, cuya finalidad es sencilla, suelen ser fáciles de entender pero debido a la amplia variedad de posibilidades es difícil resolverlos. Para resolver este tipo de problemas se utilizan los algoritmos heurísticos (Melián et al., 2003), que son algoritmos diseñados para encontrar buenas soluciones aproximadas de problemas difíciles que de lo contrario no pueden resolverse usando un riguroso análisis formal. Los algoritmos heurísticos son eficientes con respecto al tiempo de cómputo y al espacio de memoria, y tienen el objetivo final de llegar a una solución lo mejor posible mediante el análisis de sólo un pequeño subconjunto de soluciones del número total. El principal problema de algunos algoritmos heurísticos es la dificultad de escapar de los óptimos locales. Es por ello que en este trabajo hemos utilizado un algoritmo metaheurístico conocido como la Búsqueda Tabú (Glover, 1989; Glover, 1990), cuyo principal objetivo es poder escapar si se encuentra atrapado en un óptimo local, al permitir movimientos inferiores si es necesario. También existen las metaheurísticas evolutivas que establecen estrategias para conducir la evolución en el espacio de búsqueda de conjuntos de soluciones con el objetivo de acercarse a la solución óptima. La metaheurística más conocida perteneciente a este género son los Algoritmos Genéticos.

La búsqueda Tabú (TS) es una técnica metaheurística de optimización combinatoria y de tipo iterativo, que proviene de la inteligencia artificial. Está basada en una estructura de memoria adaptativa que le permite explorar un espacio de soluciones de manera eficiente a través de la estructura de vecindad de una solución inicial, creando o relajando las restricciones en forma de una tabla tabú con la finalidad de realizar la búsqueda en áreas no factibles (*a priori*) pero que de alguna manera nos pueden llevar a una solución de buena calidad. Es importante definir diferentes conceptos que se utilizan en la Búsqueda Tabú.

- *Espacio de soluciones (X)*: está formado por todas las posibles soluciones del problema en las que soluciones parecidas se encuentran próximas entre sí. La búsqueda tabú trata de optimizar la función $f(x)$ en un conjunto X .
- *Solución Inicial*: la búsqueda debe comenzar desde una solución inicial que podría ser cualquier solución admisible que satisfaga las restricciones del problema.
- *Movimiento*: es un procedimiento aleatorio o determinista por el que se genera una solución admisible a partir de la solución inicial. El objetivo es moverse paso a paso desde una solución factible inicial hacia una mejor solución.
- *Vecindad*: dada una solución x perteneciente a X , la vecindad $N(x)$ es el entorno de X que forma el conjunto de todas las soluciones adyacentes que pueden ser generadas por la ejecución de un movimiento sobre la solución actual x .
- *Lista tabú*: es un mecanismo de memoria adaptativa que trata de evitar que la búsqueda entre en un ciclo o quede atrapada en un óptimo local. Se crea una lista de movimientos no permitidos (tabú) en cada iteración, de forma que se excluyen los movimientos que hagan volver a una iteración anterior. Una vez que un movimiento, que genera una nueva solución, es aceptado, su movimiento inverso se añade a la lista tabú y permanece en ésta un número determinado de iteraciones. Luego una lista tabú es una memoria de corto plazo que contiene las soluciones que fueron visitadas en las últimas n iteraciones.
- *Criterio de parada*: en general, la búsqueda termina después de un número determinado de iteraciones, después de un tiempo de computación predefinido cuando se considere que el valor obtenido es cercano al óptimo esperado.
- *Criterio de aspiración*: es cuando ocurre una excepción a la lista tabú, ya que un movimiento imposibilitado conduce a una condición mejorada. La eliminación de ciclos no es la última meta en el proceso de búsqueda. En algunos casos, una buena trayectoria de búsqueda resultará al visitar una solución encontrada anteriormente. Cuando un movimiento tabú proporciona una solución mejor que cualquier otra previamente encontrada, su clasificación tabú puede eliminarse.

La búsqueda Tabú utiliza estructuras de memoria flexible, la cual se actualiza en función del tiempo y el análisis de la vecindad, recuerda los movimientos de la búsqueda

anterior y los deshabilita durante un periodo de tenencia especificada. De esta forma cuando el algoritmo encuentra una solución potencial, la marca como tabú y no la vuelve a visitar. La información guardada en esta memoria se usa para comenzar con la búsqueda desde otra solución inicial de acuerdo a dos filosofías distintas (Glover & Laguna, 1993):

- Intensificar la búsqueda, volviendo a visitar zonas del espacio prometedoras (que contenían buenas soluciones), ya exploradas parcialmente.
- Diversificar la búsqueda, visitando nuevas zonas no exploradas aún.

El algoritmo de la Búsqueda Tabú funciona de la siguiente manera, ver figura 3.3:

Paso 0. Se selecciona una solución de inicio $x_0 \in X$ y se inicia la lista tabú $L_0 = \emptyset$. La búsqueda debe comenzar desde una solución inicial que podría ser cualquier solución admisible que satisfaga las restricciones del problema. Una buena solución inicial podría acelerar la búsqueda con el consiguiente ahorro de tiempo. Se selecciona un esquema para especificar el tamaño de la lista tabú y se establece el inicio como $k=0$. Si el tamaño de la lista tabú es pequeño, entonces la búsqueda se intensifica en un determinado área del espacio, mientras que si el tamaño de la lista es grande se enfatiza la búsqueda en diferentes regiones del espacio de soluciones.

Paso 1. Se determina una vecindad factible $N(x_k)$ que excluya miembros de la lista tabú L_k . El paso básico del procedimiento consiste en empezar desde un punto factible x_k y generar un conjunto de soluciones en $N(x_k)$. Una vez que el vecindario es definido, cada vecino es evaluado para determinar el valor de su función objetivo y si cumple o no con las restricciones planteadas. Los vecinos son clasificados en una lista de acuerdo al valor de la función objetivo y el proceso selecciona el mejor candidato sin tener en cuenta los que están en la lista tabú. De éstas se elige la mejor x_k^* y se posiciona en este nuevo punto. La búsqueda entonces progresa moviéndose iterativamente de una solución x_k^* hacia otra solución x'_{k^*} en $N^*(x_k^*)$.

En este trabajo se utiliza un método de descenso para la búsqueda del óptimo local, donde el objetivo es minimizar $f(x)$, de forma que solo se permiten movimientos a las soluciones vecinas que mejoren la función objetivo actual. Un pseudo-código genérico de un método de descenso es como sigue,

- Se elige una solución x a X para comenzar el proceso.
- Se encuentra x' a $N(x)$ tal que $f(x') < f(x)$.
- Si x' no puede ser encontrada, x será el óptimo local y el proceso finaliza.
- Si no, se asigna x' como el nuevo x y avanza al Paso 2.

Paso 2. Se selecciona el siguiente movimiento x_{k+1} a partir de $N^*(x_k^*)$ y la búsqueda entonces progresa moviéndose iterativamente de una solución x_{k+1} hacia una solución x'_{k+1} . Si L_k ofrece una mejor solución que $N^*(x_k^*)$ puede usarse para el siguiente movimiento. Finalmente se actualiza la lista tabú L_{k+1} . En cada iteración del proceso es almacenada la mejor solución.

Paso 3. Si se llega a una condición de terminación se detiene. Si no, se establece $k=k+1$ y vuelve al Paso 1 (se trata de un proceso iterativo).

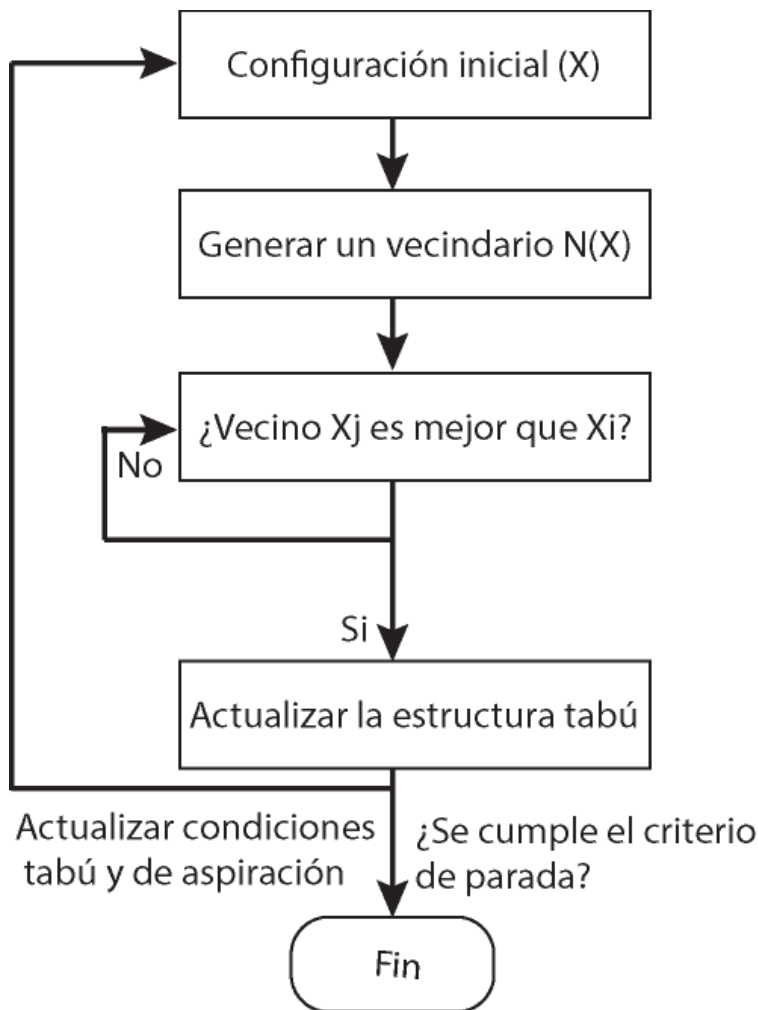


Figura 3.3: Esquema de un algoritmo básico de búsqueda Tabú

El algoritmo de búsqueda tabú podría alcanzar una solución factible partiendo desde cualquier solución inicial aleatoria. Sin embargo, el hecho de partir desde una buena solución inicial hace que el tiempo y los recursos empleados para llegar hasta una solución factible se reduzcan drásticamente. En este proyecto se ha optado por aportar al algoritmo una solución inicial de la mayor calidad posible. De esta forma se ha conseguido que los mejores movimientos posibles de cada paso de la búsqueda tabú se encuentren en un área muy limitada y concreta del enorme espacio de soluciones global. La búsqueda Tabú ha sido aplicada exitosamente en multitud de problemas complejos en diferentes áreas científicas (Glover & Marti, 2006), y su filosofía se puede resumir como: "Es mejor una mala decisión basada en información que una buena decisión al azar, ya que, en un sistema que emplea memoria, una mala elección basada en una estrategia proporcionará claves útiles para continuar la búsqueda. Una buena elección fruto del azar no proporcionará ninguna información para posteriores acciones".

3.2.3 Algoritmos basados en lógica difusa

La contribución principal de la lógica difusa es su capacidad para modelar un sistema complejo procesando palabras de forma que puede adaptarse a la imprecisión de los sistemas reales. El cerebro humano puede interpretar y procesar la información incompleta e imprecisa que recibe de los órganos que funcionan como sensores. De forma análoga, la teoría difusa proporciona un método sistemático para poder procesar este tipo de información lingüísticamente y realiza procesamiento numérico gracias a las funciones de membresía para cada etiqueta lingüística. En vez de usar números (valores *crisp*) como en la teoría clásica, donde un elemento es miembro o no de un set de datos, la lógica difusa se caracteriza por términos lingüísticos en vez de números. Luego el método de trabajo de la lógica difusa es en esencia codificar el comportamiento deseado del sistema complejo en forma de reglas lingüísticas expresadas en un lenguaje cercano al lenguaje humano (lo cual tiene en cuenta la incertidumbre, imprecisión e imperfección de los datos reales).

Funciones de membresía

Para aplicar los conceptos de lógica difusa las entradas y salidas son inicialmente definidas como variables lingüísticas, donde cada variable es afectada por grados de mem-

bresía en varios niveles (fusificación). En lógica difusa el proceso de fusificación convierte los valores *crisp* de las variables de entrada en grados de membresía, de forma que la transición de membresía a no-membresía (valor *crisp*) sea gradual y no de forma abrupta. Para ello se definen una o varias funciones de membresía donde hay que considerar (i) cómo proceder para determinar la forma y (ii) cuantas funciones son necesarias y suficientes para identificar si una variable x es o no miembro de un set difuso A . La membresía $\mu_A(x)$ de x dentro de A está definida como:

$$\begin{aligned} \mu_A(x) &= 1 && \text{si } x \text{ está totalmente en } A; \\ \mu_A(x) &= 0 && \text{si } x \text{ no está en } A; \\ 0 < \mu_A(x) < 1 && \text{si } x \text{ está parcialmente en } A. \end{aligned} \quad (3.2.4)$$

Un set difuso A de un universo X (el rango sobre el cual la variable se expande) se caracteriza por una función de membresía $\mu_A(x): X \rightarrow [0, 1]$, la cual asocia con cada elemento x de X un número $\mu_A(x)$ en el intervalo $[0, 1]$, con $\mu_A(x)$ representando el grado de membresía de x en A . Las funciones de membresía son la esencia de los sets difusos, y son curvas que definen cómo cada punto en el espacio de entrada (valores *crisp*) es mapeado a un grado de membresía, siendo normalmente un número real en el intervalo $[0, 1]$. La elección de los tipos de funciones de membresía más adecuados para cada set difuso es normalmente determinado por expertos (Jang & Sun, 1995; MathWorks fuzzy, 2015). Existen diferentes tipos de funciones de membresía y los utilizados en este trabajo son los triangulares, trapezoidales, con forma gaussiana o forma de campana. La elección de la forma y el ancho de las funciones de membresía es subjetivo, pero deben ser suficientemente anchas para permitir ruido en las medidas. Además es deseable un cierto grado de solapamiento para evitar que el controlador o la toma de decisiones choquen con estados mal definidos que resulten en variables de salida mal definidas.

Reglas difusas

Los sets difusos en forma de expresiones lingüísticas son conectados usando un set de reglas difusas creadas con sentencias IF-THEN, que forman el bloque que contiene la base del conocimiento teniendo en cuenta los objetivos y el comportamiento del sistema (Mamdani, 1974; Negnevitsky, 2005). Formalmente la parte IF es llamada la condición y la parte THEN la conclusión, luego las reglas difusas se representan de la forma,

IF antecedentes THEN consecuencias (3.2.5)

Las reglas difusas pueden tener múltiples antecedentes conectados con diferentes operadores difusos, como son la intersección (AND), la unión (OR) y el complemento (NOT). Las reglas usan los valores de membresía de entrada como factores de ponderación para determinar su influencia en el set de salidas difusas de las conclusiones de salida finales (Mamdani & Assilian, 1975; Zadeh, 1973). Luego la estrategia de control es aislada en una base de reglas al contrario de usar una ecuación. Después de evaluar el grado de cada sentencia lingüística son combinados por operadores lógicos AND o OR. El proceso de salida es comparado con una referencia, y si hay una desviación, el controlador o la toma de decisiones realizan una acción de acuerdo a la estrategia de control.

Motor de inferencia

La función básica del motor de inferencia es computar el valor global de las salidas difusas basadas en la contribución individual de cada regla en la base de reglas. Cada contribución individual representa el valor de las salidas difusas procesando una sola regla. El grado de cumplimiento de cada regla es usado para calcular su activación de la salida. Sin embargo, varias reglas pueden ser activadas simultáneamente y existir acciones recomendadas con varios grados de validez. Para solucionar esto las funciones de membresía de salida de cada regla son combinadas por los operadores Min (*minimum*) y Max (*maximum*) (Eker & Torun, 2006).

Defusificación

Una vez que las funciones son inferidas, escaladas y combinadas, son defusificadas en un valor *crisp*. La defusificación consiste en extraer el valor *crisp* a partir de un set difuso, como un valor representativo (Jang & Sun, 1995). Entre los métodos más comunes de defusificación están el centro de gravedad (COG), media de máximo (MOM), bisector de área (BOA), la técnica “*centroid*”, menor y máximo (SOM), etc. (Cox, 1999; Fraichard & Garnier, 2001; Kanta et al., 2008). Desde la introducción de los conceptos de lógica difusa (Zadeh, 1965), se ha continuado investigando para aplicar la teoría de los sistemas difusos en la identificación de sistemas complejos y mal definidos, donde modelos matemáticos precisos son difíciles de construir (Czogala & Pedrycz, 1981; Pe-

drycz, 1984; Tong, 1978). La definición de las funciones de membresía y las reglas difusas para expresar el comportamiento del sistema son programadas a partir del conocimiento de un experto humano. Los modelos difusos son relativamente fáciles de obtener, reflejan la incertidumbre del sistema apropiadamente y ofrecen la capacidad de convertir los datos en conocimiento entendido por humanos.

Controladores de lógica difusa (FLC)

El control difuso puede ser descrito simplemente como un “control con frases en vez de ecuaciones” (Liang et al., 2003), que imita las características del razonamiento y toma de decisiones humano. Un controlador difuso puede incluir reglas empíricas, y es especialmente útil en plantas controladas por un operador experto (Ogaji et al., 2005).

En contraste con técnicas de control convencionales, el control por lógica difusa (FLC) es sobre todo utilizado en procesos complejos mal definidos (es decir, donde no existe un modelo matemático que pueda identificar el sistema) que pueden ser controlados por un operador humano experimentado sin necesidad de conocer su dinámica fundamental. La idea básica detrás de un FLC es incorporar la experiencia de un operador humano en el diseño del controlador para controlar un proceso cuya relación entre entradas y salidas está descrita por una colección de reglas de control difuso como son las reglas IF-THEN, incluyendo las variables lingüísticas en vez de un complicado modelo dinámico. Un FLC consiste en un set de reglas de la forma,

IF (un set de condiciones a cumplir) THEN (un set de consecuencias inferidas)

Luego la utilización de variables lingüísticas, reglas de control difuso, y razonamiento aproximado proporcionan un medio de incorporar la experiencia de un operador humano en el diseño de controladores. En la Figura 3.8 se muestra una arquitectura típica de un controlados de lógica difusa, el cual tiene cuatro etapas diferentes (Lee, 1990):

- El interfaz fusificador: mide las variables de entrada y transforma los datos *crisp* de entrada en valores lingüísticos (set difusos) apropiados usando las funciones de membresía.
- Una base de reglas lingüísticas (difusas): contiene el conocimiento empírico de un experto en cada operación del proceso y es usado para llevar a cabo el control deseado.

- Un motor de inferencia: es el núcleo de un FLC y tiene la capacidad de simular la toma de decisiones de un humano realizando un razonamiento aproximado para conseguir la estrategia de control deseada. Esto se consigue gracias a usar el set difuso y las reglas de inferencia de lógica difusa para inferir las acciones de control difuso.
- El interfaz defusificador: se utiliza para producir una decisión no difusa o acción de control a partir de una acción de control difusa inferida por el motor de inferencia.

Las reglas IF-THEN difusas obtenidas a partir de la experiencia de un operador humano contienen el conocimiento estructurado que representa a un sistema de inferencia difuso, pero esto no proporciona la capacidad de adaptabilidad a cambios en el entorno que sí contienen las redes neuronales. Como la información difusa es capaz de contener conocimiento incierto, ambiguo o impreciso, es útil para el control o modelado de sistemas complejos donde se representan ciertos elementos como miembros de sets difusos con cierto grado de membresía. Existen numerosas aplicaciones de FLC en procesos industriales (Babu et al. 1995; Dadios, 2012; Flores et al. 2005; Lie et al. 1995; Mamdani, 1977; Saez & Cipriano, 1999; Sala et al., 2005), donde el funcionamiento del controlador difuso está definido por la interpolación de una base de reglas difusas proporcionadas por un experto operador (humano).

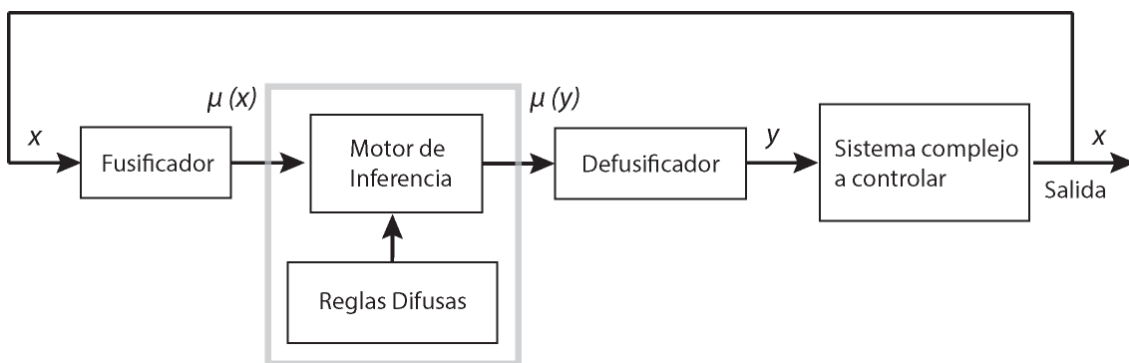


Figura 3.4: Arquitectura general de un controlador de lógica difusa (FLC)

3.2.4 Sistemas de inferencia difusa

Un sistema de inferencia difusa (FIS) es un proceso que genera una salida a partir de un mapa de entradas, usando los conceptos de la teoría de sets difusos, reglas IF-THEN difusas, y razonamiento difuso como se ha explicado anteriormente. La estructura básica

de un sistema de inferencia difusa consiste en cinco bloques funcionales (Hishammuddin, 2008), como se ve en la siguiente figura 3.4.

- El interfaz de fusificación transforma cada variable de entrada crisp en un grado de membresía basándose en las funciones de membresía definidas;
- Una base de datos que define las funciones de membresía de las reglas difusas;
- Una base de reglas difusas formadas por reglas IF-THEN;
- El motor de inferencia es un mecanismo de razonamiento que lleva a cabo una inferencia de razonamiento difuso con respecto a las reglas y el set de entradas, para obtener una salida o conclusión razonable;
- El interfaz de defusificación, que transforma las salidas difusas en salidas crisp aplicando un método de defusificación específico.

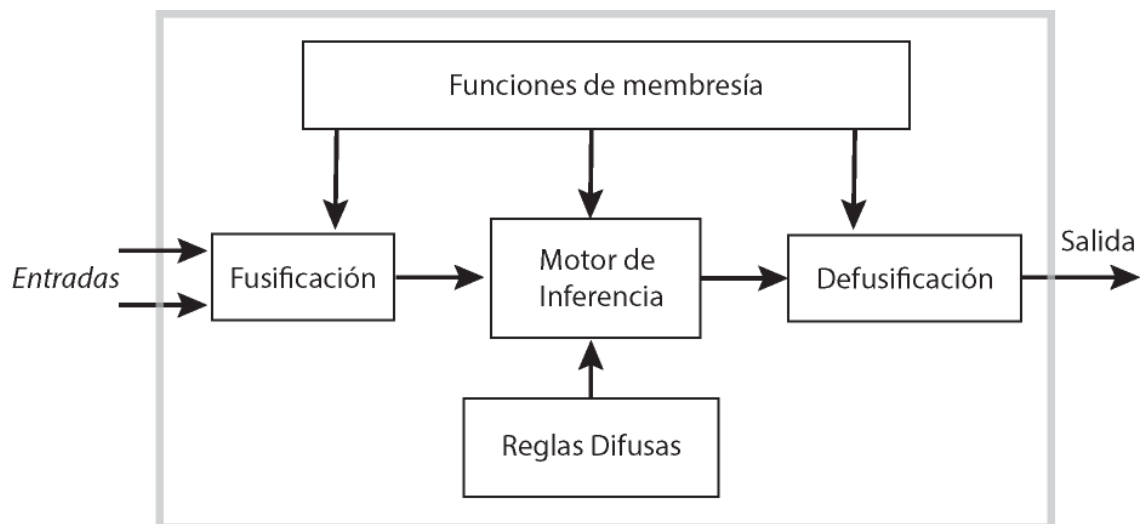


Figura 3.5: Estructura general de un sistema de inferencia difusa (FIS)

Existen tres tipos de sistemas de inferencia difusa (FIS):

- *FIS de tipo Mamdani*: Este tipo de sistemas son conocidos como sistemas difusos lingüísticos. En el FIS Mamdani la parte consecuente son sets difusos y la salida *crisp* final está basada en la defusificación de todas las salidas difusas usando varios tipos de métodos de defusificación. En este trabajo se utiliza un FIS de tipo Mamdani (Mamdani, 1976) para realizar una identificación de un sistema complejo como es el TEM y tomar decisiones en tiempo real en función de diferentes variables de entrada.

- *FIS de tipo Singleton*: La complejidad de defusificación del sistema difuso lingüístico es simplificado restringiendo las salidas a una sola función de membresía singleton. Ya que no es necesario hacer ninguna integración numéricamente se reduce la demanda de procesamiento en el aprendizaje y evaluación del sistema difuso. Estos sistemas son mayoritariamente utilizados en la industria.
- *FIS de tipo Takagi-Sugeno-Kang (Sugeno)*: Este sistema es una extensión del tipo singleton, donde la función f de salida no es un set difuso pero su premisa es lingüísticamente interpretable (Sugeno, & Kang, 1988; Takagi & Sugeno, 1985). Las primeras dos partes del proceso de inferencia difusa, la fusificación de las entradas y la aplicación del operador difuso es igual que en un sistema Mamdani. Por el contrario, en un FIS Sugeno la parte consecuente son números reales, que pueden o seguir una función lineal o ser constantes. La salida final es la media ponderada de cada salida de las reglas y por lo tanto en un sistema Sugeno las funciones de membresía de salida son o lineales (primer orden) o constantes (orden cero). Normalmente se utilizan sistemas de primer orden para modelar procesos dinámicos (Jang & Sun, 1995) donde las reglas difusas tienen la forma,

$$\text{IF } x \text{ is } A \text{ AND } y \text{ is } B \text{ THEN } z = ax + by + c \quad (3.2.6)$$

A y B son los sets difusos en el antecedente, mientras $ax + by + c$ es una función matemática en la parte consecuente, la cual es lineal. Cuando la función f de salida es elegida una constante, con $a=b=0$ se trata de una expansión de la serie de Taylor de orden cero de la función f , y forma un FIS de tipo Sugeno de orden cero (Sugeno, 1985, Takana, & Sugeno, 1992).

En general, los pasos a seguir en el desarrollo de un sistema difuso son como sigue:

- Especificar el problema y analizar el propósito (control o toma de decisiones);
- Definir las variable lingüísticas para determinar los sets difusos para antecedentes y consecuencias;
- Construir las reglas difusas;
- Identificar y aplicar apropiadamente métodos para fusificación, inferencia difusa y defusificación;

Los sistemas de inferencia difusa FIS han sido aplicados en varias áreas de ingeniería, medicina, matemáticas, ciencias naturales, ciencia social, análisis político, etc., para la clasificación de datos, el control automático, los sistemas expertos, toma de decisiones, robótica, análisis de series temporales, clasificación de patrones, sistemas de identificación, etc., pero sobre todo ha sido aplicado en control difuso de sistemas complejos (Abbod et al. 2001; Babuska & Verbruggen, 1996; Barro & Marín, 2002; Dorf & Bishop, 2001; Hirota, 1993; Jamshidi, 1997; Nauck & Kruse, 1999; Singh et al. 2012; Suganthi et al. 2015; Zimmermann, 1999).

3.2.5 Sistemas de inferencia neuro-difuso adaptativo

Como acabamos de explicar la ventaja de un FIS es su capacidad de trabajar con expresiones lingüísticas y la ventaja de una red neuronal es su capacidad de aprendizaje y mejora por si misma. Los sistemas de inferencia neuro-difuso adaptativos (ANFIS) (Jang, 1993) combinan la estructura de una red neuronal y la metodología de inferencia difusa para crear un sistema que representa el conocimiento en una manera interpretable. Este tipo de sistemas tienen capacidad de aprendizaje para ajustar los parámetros de las funciones de membresía y las reglas lingüísticas directamente a partir de datos de referencia entrada-salida para mejorar el rendimiento del sistema (Wang et al., 2006).

ANFIS es un sistema neuro-difuso híbrido, basado en redes adaptativas, que implementa un FIS de tipo Sugeno (Denai et al. 2004; Sugeno & Kang, 1988; Takagi & Sugeno, 1985) y generaliza las reglas difusas a partir de un set de datos de referencia entrada-salida (Azeem et al., 2000; Negnevitsky, 2005). Para usar este método híbrido, el primer paso es crear un FIS inicial de tipo Sugeno usando el conocimiento de un experto. Después el proceso de entrenamiento de la red neuronal se usa para afinar de forma precisa las funciones de membresía del modelo difuso inicial para producir el modelo ANFIS final. Las técnicas de aprendizaje neuro-adaptativo proporcionan un método para el procedimiento de modelado difuso que aprender a partir de un set de datos. En el proceso de aprendizaje se ajustan los parámetros de las funciones de membresía que mejor permitan seguir los datos de entrada-salida al FIS de tipo Sugeno previamente programado. Uno de los métodos de aprendizaje propuesto por Jang usa una combinación del método del gradiente (GD) y la estimación de mínimos cuadrados (LSE). Desde su aparición ANFIS ha sido utilizado aplicado satisfactoriamente a tareas de clasificación como en

esta tesis, control de procesos basados en reglas, reconocimiento de patrones y problemas similares.

La arquitectura de ANFIS contiene una red neuronal “*feedforward*” con cinco capas como se ve en la figura 3.6 y se describe a continuación. Por simplicidad, se asume que el sistema de inferencia difusa bajo consideración tiene dos entradas y una salida. La base de reglas contiene las reglas difusas IF-THEN del tipo Takagi-Sugeno-Kang (Takagi, & Sugeno, 1983) como sigue:

$$\text{If } x \text{ is } A \text{ and } y \text{ is } B \text{ then } z \text{ is } f(x, y) \quad (3.2.7)$$

donde A y B son los conjuntos difusos de los antecedentes y $z = f(x,y)$ es una función *crisp* de consecuencia. Normalmente $f(x,y)$ es un polinomio de las variables de entrada (x, y) . Cuando $f(x,y)$ es constante se forma un modelo difuso Sugeno de orden cero, donde cada regla consecuencia es especificada por un singleton difuso (Mamdani, & Assilian, 1975). Si $f(x,y)$ es un polinomio de primer orden se forma un modelo difuso de tipo Sugeno de primer orden.

En este sistema de inferencia la salida de cada regla es una combinación lineal de las variables de entrada más una constante. La salida final es la media ponderada de las salidas de cada regla. La correspondiente estructura de ANFIS equivalente se ve en la figura 3.6.

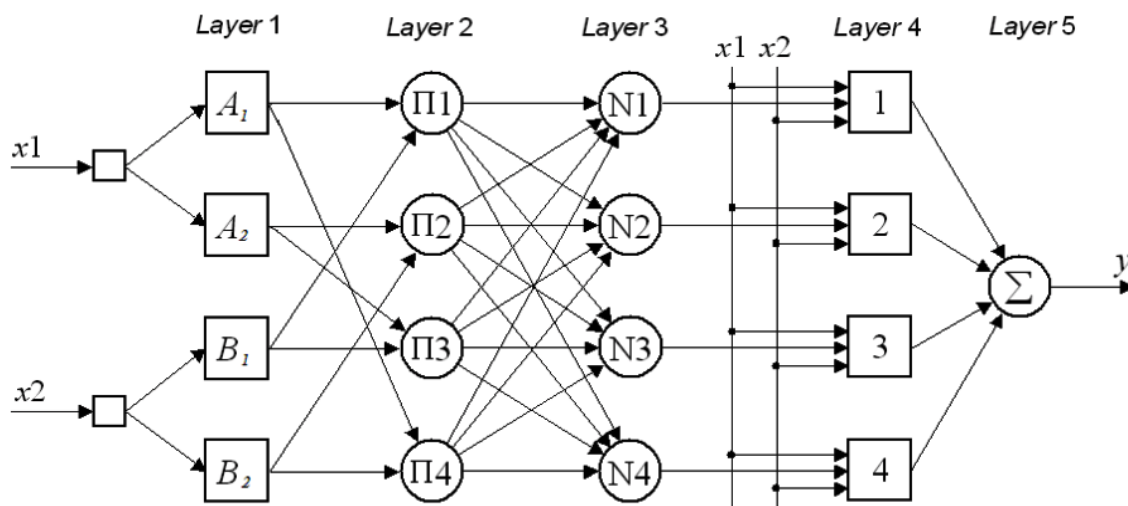


Figura 3.6: Arquitectura general de un modelo ANFIS con dos entradas y una salida

Por ejemplo para un FIS Sugeno con dos reglas, las dos reglas se pueden expresar como:

$$\text{Rule 1: } \textit{If } x \textit{ is } A_1 \textit{ and } y \textit{ is } B_1 \textit{ then } f_1 = p_1 x + q_1 y + r_1 \quad (3.2.8)$$

$$\text{Rule 2: } \textit{If } x \textit{ is } A_2 \textit{ and } y \textit{ is } B_2 \textit{ then } f_2 = p_2 x + q_2 y + r_2 \quad (3.2.9)$$

A continuación se definen cada una de las capas individuales del modelo ANFIS:

Capa 1: Conocida como capa de fusificación, que define los grados de membresía para cada set de entrada y depende de las funciones de membresía elegidas. Cada nodo i^{th} en esta capa es adaptativo con una función de nodo:

$$O_i^1 = \mu_{A_i}(x) \quad O_i^2 = \mu_{B_i}(x) \quad (3.2.10)$$

donde, x es la entrada al nodo i , A_i es la variable lingüística asociada con esta función nodo y μ_{A_i} es la función de membresía de A_i . Normalmente las más utilizadas son la función en forma de triangular:

$$\mu_{A_i}(x) = \left\{ \begin{array}{ll} 0 & \textit{if } x < a_i, \\ \frac{x - a_i}{b_i - a_i} & \textit{if } a_i \leq x \leq b_i, \\ \frac{d_i - x}{d_i - b_i} & \textit{if } b_i \leq x \leq d_i, \\ 0 & \textit{if } x > d_i. \end{array} \right\} \quad (3.2.11)$$

o una función trapezoidal:

$$\mu_{A_i}(x) = \left\{ \begin{array}{ll} 0 & \textit{if } x < a_i, \\ \frac{x - a_i}{b_i - a_i} & \textit{if } a_i \leq x \leq b_i, \\ 1 & \textit{if } b_i < x < c_i, \\ \frac{d_i - x}{d_i - c_i} & \textit{if } c_i \leq x \leq d_i, \\ 0 & \textit{if } x > d_i. \end{array} \right\} \quad (3.2.12)$$

o una función con forma de campana:

$$\mu_{A_i}(x) = \frac{1}{1 + \left[\left(\frac{x - c_i}{a_i} \right)^2 \right]^{b_i}} \quad (3.2.13)$$

o una función gaussiana:

$$\mu_{A_i}(x) = \exp \left\{ - \left(\frac{x - c_i}{a_i} \right)^2 \right\} \quad (3.2.14)$$

donde x es la variable de entrada y $\{a_i, b_i, c_i, d_i\}$ es el set de parámetros premisa. En el caso de la función de membresía gaussiana a_i es el centro y b_i es el ancho del set difuso A_i , ver figura 3.7.

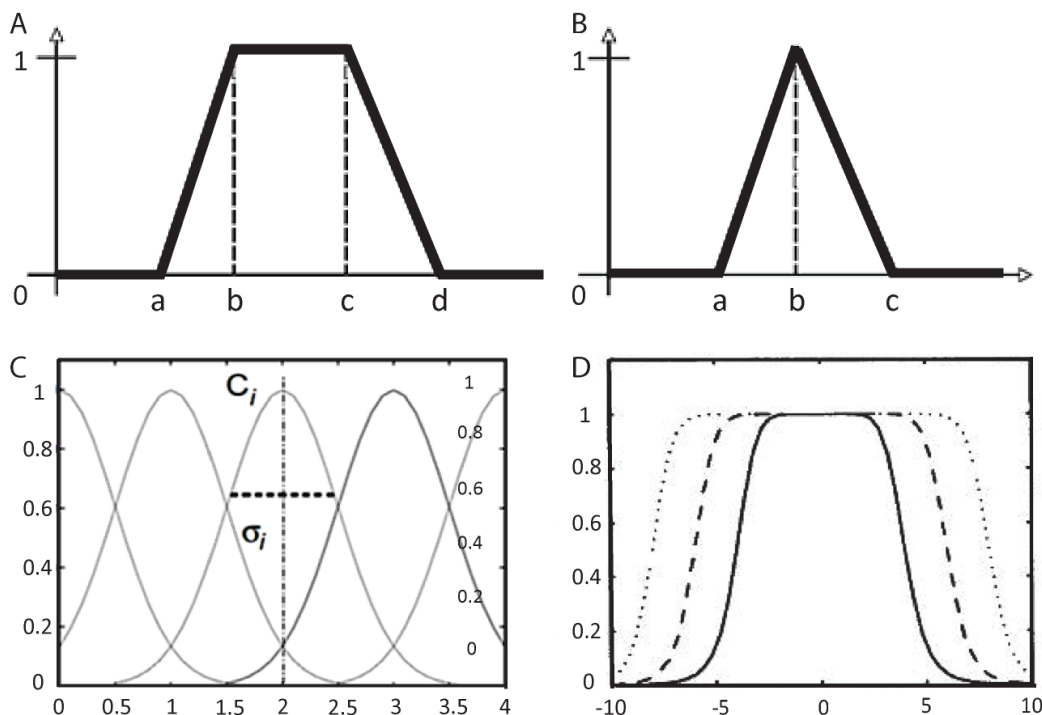


Figura 3.7: Funciones de membresía. (A) Trapezoidal; (B) Triangular; (C) Gaussiana con centro C_i y ancho σ_i ; (D) con forma de Campana

Capa 2: Cada nodo en esta capa es un nodo fijo que calcula los *firing strength* w_i de una regla como el producto de los grados de membresía. La salida de cada nodo es el producto de todas las señales entrantes a él y está dado por,

$$O_i^2 = w_i = \mu_{A_i}(x) \times \mu_{B_i}(y), \quad i=1,2 \quad (3.2.15)$$

Capa 3: Cada nodo en esta capa es un nodo fijo. Cada nodo i^{th} calcula el ratio del *firing strength* de la regla i^{th} con la suma de los *firing strength* de todas las reglas. La salida del nodo i^{th} es el *firing strength* normalizado dado por,

$$O_i^3 = \bar{w}_i = \frac{w_i}{w_1 + w_2}, \quad i=1,2 \quad (3.2.16)$$

Capa 4: Cada nodo en esta capa es un nodo adaptativo con una función de nodo dado por,

$$O_i^4 = \bar{w}_i f_i = \bar{w}_i (p_i x + q_i y + r_i), \quad i=1,2 \quad (3.2.17)$$

donde w_i es la salida de la capa 3 y $\{p_i, q_i, r_i\}$ es el set de parámetros consecuencia, los cuales pueden ser identificados usando la estimación de mínimos cuadrados (LSE).

Capa 5: Esta capa contiene solamente un solo nodo fijo que calcula la salida total como la suma de todas las señales de entrada como sigue,

$$O_i^5 = \text{salida total} = \sum_i \bar{w}_i f_i = \frac{\sum_i w_i f_i}{\sum_i w_i} \quad (3.2.18)$$

En la estructura ANFIS, dados los valores de los parámetros premisa, la salida final puede expresarse como una combinación lineal de los parámetros consecuencia. La salida f de la figura 3.6 puede ser escrita como,

$$\begin{aligned} f &= \frac{w_1}{w_1 + w_2} f_1 + \frac{w_2}{w_1 + w_2} f_2 \\ &= \bar{w}_1 f_1 + \bar{w}_2 f_2 \\ &= (\bar{w}_1 x) p_1 + (\bar{w}_1 y) q_1 + (\bar{w}_1) r_1 + (\bar{w}_2 x) p_2 + (\bar{w}_2 y) q_2 + (\bar{w}_2) r_2 \end{aligned} \quad (3.2.19)$$

donde f es una combinación lineal de los parámetros consecuencia $\{p_1, q_1, r_1\}$ y $\{p_2, q_2, r_2\}$.

Al diseñar un modelo ANFIS el primer paso es crear un FIS de tipo Sugeno y preparar un set de datos entrada-salida con los que se pueda entrenar el sistema. ANFIS usa dos

sets de parámetros, un set de parámetros premisa y un set de parámetros consecuencia. El proceso de actualización de parámetros usa dos pasos con dos tipos diferentes de algoritmos de aprendizaje,

- Paso hacia delante (*forward pass*): usando este algoritmo las neuronas de salida son calculadas capa por capa y los parámetros consecuencia son identificados por un estimador de mínimos cuadrados (LSE) para obtener la salida final única. Los parámetros consecuencia son identificados mediante un algoritmo de estimación de mínimos cuadrados (*LSE*) (Chiu, 1996; Wang & Mendel, 1992) para minimizar el error cuadrático $\|AX - B\|^2$, donde A son las salidas producidas por la capa 3, B es la salida objetivo (*target*) y X es el valor del set de parámetros consecuencia desconocidos, los cuales pueden ser obtenidos usando la pseudo-inversa de X, $X^* = (A^T A)^{-1} A^T B$. El proceso de aprendizaje del modelo ANFIS termina cuando se llega criterio de error mínimo mediante la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE) que se calcula de la forma,

$$E = \sqrt{\frac{\sum E_p}{P}} \quad (3.2.20)$$

- Paso hacia atrás (*backward*), las señales de error, las cuales son las derivadas del error al cuadrado con respecto a cada nodo de salida, se propagan hacia atrás desde la capa de salida a la capa de entrada. En este paso hacia atrás, los parámetros premisa de las funciones de membresía son actualizados por la red neuronal usando un método de aprendizaje "*back propagation*" utilizando el algoritmo de descenso de gradiente (GD) (Hagan et al. 1996; Haykin, 2003; Zurada, 1999). Para una búsqueda más efectiva de los parámetros óptimos y para acelerar el proceso de aprendizaje, Jang propuso combinar los dos métodos de aprendizaje: un algoritmos de descenso de gradiente (GD) y un algoritmo de mínimos cuadrados (LSE). Si la estructura de la red adaptativa se reduce en cuatro capas, donde la salida de cada regla es inducido conjuntamente por la función de membresía de salida y el valor de "*firing strength*", esta estructura se conoce como ANFIS de tipo 1 (Jang, 1993).

3.3 Introducción a la visión artificial

La visión artificial es un sub-campo de la inteligencia artificial (AI), en la que se extrae información de las características de una imagen. Usando algoritmos de visión artificial es posible automatizar el procesamiento de imágenes del mundo real para extraer e interpretar información en tiempo real. También se define como la ciencia y tecnología de las máquinas que ven, donde ver significa que la máquina es capaz de extraer información de la imagen para resolver alguna tarea, o conocer el entorno en el caso de los robots. Los sistemas con visión utilizan diferentes algoritmos para convertir las imágenes en información que pueda utilizar un sistema inteligente para interpretar el entorno que les rodea, y algunos de sus objetivos típicos incluyen:

- La detección, segmentación, localización y reconocimiento de ciertos objetos en imágenes (e.g., como es el caso del desarrollo para la identificación del tipo de partículas individuales en imágenes de cryo-TEM, presentado en esta tesis).
- La evaluación de los resultados (e.g., validación de los datos en tiempo real).
- Seguimiento de un objeto en una secuencia de imágenes.
- Mapeo de una escena para generar un modelo tridimensional de la escena; este modelo podría ser usado por un robot para navegar por la escena.

Estos objetivos se consiguen por medio de reconocimiento de patrones, aprendizaje estadístico, geometría de proyección, procesamiento de imágenes, teoría de grafos y otro tipo de algoritmos. Las aplicaciones de la visión artificial son muy variadas, desde el desarrollo de sistemas de visión en maquinaria industrial, por ejemplo para inspeccionar el producto rápidamente en líneas de producción, hasta la investigación dentro de la inteligencia artificial (AI) para que ordenadores y/o robots puedan comprender el mundo que las rodea de forma similar a un humano. La visión por computador se define como el núcleo de tecnologías para automatizar el análisis de imagen utilizado en muchas otras áreas. Por el contrario, la visión de máquina se refiere al proceso de combinar el análisis automático de imagen con otros métodos y tecnologías para proporcionar sistemas de inspección automática y/o guiado de robots en aplicaciones industriales.

3.3.1 Preprocesamiento digital de imagen

En ingeniería y ciencias de la computación, el procesamiento de imagen es cualquier forma de procesamiento de señal para el que la entrada es una imagen, como puede ser una fotografía o un video (formado por una secuencia de fotogramas). La salida del procesamiento de imagen puede ser tanto una imagen (e.g., cuando se filtran las imágenes para mejorar su relación señal/ruido (SNR)) o un set de características o parámetros relativos a la imagen (e.g., las características discriminatorias que permiten clasificar diferentes tipos de objetos). En esta tesis se utilizan diferentes algoritmos de procesamiento de imagen con el objetivo final de segmentar e identificar automáticamente objetos 2D en imágenes con poca SNR en experimentos de cryo-EM. La segmentación de las imágenes se utiliza para extraer características discriminatorias que permiten identificar el tipo de complejo biológico al que corresponde cada partícula segmentada en las imágenes cryo-TEM. El sistema de identificación se basa en modelos ANFIS como se describirá en el siguiente capítulo. Antes de realizar la segmentación es necesario eliminar ruido y añadir contraste en estas imágenes. La mayoría de técnicas de procesamiento de imagen implican tratar las imágenes como señales bi-dimensionales (2D) y aplicar técnicas de procesamiento de señal estándar. En este trabajo los diferentes algoritmos utilizados han sido programados usando matlab (Gonzalez et al., 2003; Gonzalez & Woods, 2008; MathWorks image, 2015).

Las imágenes que se adquieren por la técnica de cryo-TEM son imágenes 2D en escala de grises que se pueden definir como una función 2D $f(x, y)$, donde x e y son coordenadas en el plano y la amplitud f es la intensidad (nivel de gris en ese punto). En secciones cryo-TEM con un TEM las imágenes 2D son el resultado de una proyección en perspectiva de objetos 3D embebidos en una fina capa de hielo. En matlab las imágenes se representan por medio de una matriz 2D de $m \times n$ elementos, en donde n representa el número de píxeles de ancho y m el número de píxeles de largo. La cámara CCD, modelo 895 US4000 de Gatan, instalada en el microscopio electrónico bajo estudio tiene un tamaño de 4096×4096 píxeles, donde cada píxel tiene un tamaño físico de $15 \mu\text{m}$ (*micras*). Por motivos de limitación en memoria del PC se va a trabajar con imágenes escaladas y con un tamaño de 2048×2048 píxeles, donde $f(0,0)$ corresponde al elemento de la esquina superior izquierda de la imagen. Si se trabaja con imágenes de 8 bits cada elemento de la matriz f tendrá un valor entre 0 (negro) y 255 (blanco), luego estas

imágenes tendrán una profundidad de píxel de 256 tonos de gris. Por otro lado, las imágenes binarias creadas en el proceso de segmentación tienen una escala de 1 bit, luego solamente utiliza dos valores de gris (blanco o negro) para representar los píxeles de una imagen.

Para determinar la calidad de una imagen hay que tener en cuenta tres factores: el tamaño del píxel (resolución espacial), la profundidad del píxel (resolución del brillo definido por el número de bits que se usen) y el ruido. Por lo tanto para conseguir mayor resolución necesitamos disminuir el tamaño del píxel, aumentar el número de bits para conseguir más tonos de gris y reducir el ruido al máximo. Generalmente el ruido se manifiesta como píxeles aislados que toman un nivel de gris diferente al de sus vecinos y se puede clasificar en tres tipos. El ruido Gaussiano produce pequeñas variaciones en la imagen y es causado principalmente por los componentes electrónicos que producen diferentes ganancias en la cámara, ruido en los digitalizadores, ruido producido en la transformación de electrones a fotones en una emulsión de fósforo (*scintillator*), perturbaciones en la transmisión de fibra óptica, etc. Por otro lado el ruido impulsional (sal y pimienta) produce puntos blancos y/o negros causados por la saturación del sensor, la contaminación en el *scintillator*, un cálculo imperfecto de la referencia de ganancia (*gain reference*) durante la calibración de la CCD, por un valor de intensidad mínimo captado, por pérdida de la señal en algunos píxeles de la cámara, píxeles saturados producidos por los electrones dispersados hacia atrás (*back-scattered*) o señales de rayos-X generadas en el choque de los electrones en el detector, etc. Por último el ruido que sigue una distribución uniforme es el ruido frecuencial (cuando en la imagen aparece una interferencia de señal periódica, como es un senoide, cosenoide...) o ruido multiplicativo (cuando la señal obtenida es fruto de la multiplicación de dos señales). Normalmente en una CCD aparece ruido frecuencial cuando la calibración de los cuadrantes o la referencia de ganancia están mal calculadas.

En el caso particular de las imágenes generadas en experimentos cryo-TEM el tamaño real del píxel ($\text{\AA}/\text{pixel}$) depende de la magnificación seleccionada en el TEM y ésta se suele encontrar en un rango entre $\times 40,000$ y $\times 60,000$ aumentos. La magnificación elegida depende de la muestra biológica estudiada. En esta tesis utilizamos una profundidad de píxel de 256 tonos de gris, ya que el software JEM Toolbox de la compañía TEMography.com, que utilizamos para conectar matlab con el TEM y la cámara CCD, trabaja

con 8 bits. Las imágenes de cryo-TEM son muy ruidosas (el origen del ruido en las imágenes de cryo-TEM es tratado en profundidad por (Baxter et al., 2009)) debido a que los objetos biológicos embebidos en una fina capa de hielo fino no ofrecen mucho contraste respecto al fondo (*background*) y además es necesario utilizar baja dosis de electrones para no dañarla (Lee et al. 2014). Para segmentar estas imágenes de forma adecuada por tanto resulta fundamental utilizar diferentes algoritmos de filtrado y mejora del contraste que permitan disminuir el ruido y aumentar el contraste de las partículas respecto al fondo (*background*).

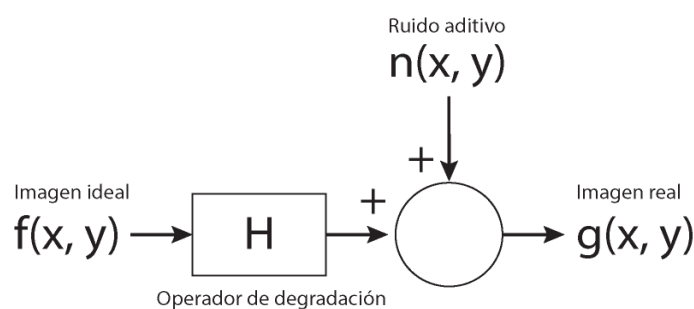


Figura 3.8: Esquema general de la formación de una imagen no-ideal

Mejora del contraste

El primer paso del preprocesamiento de imagen antes de un proceso de segmentación es la mejora del contraste mediante una ecualización local del histograma de la imagen. En esta tesis usamos la ecualización del histograma adaptativa y limitada en contraste (CLAHE) (Zuiderveld, 1994). Este algoritmo opera en pequeñas regiones de la imagen llamados azulejos (*tiles*). El histograma de cada una de estas regiones es ajustado por un parámetro de distribución y las regiones vecinas son entonces combinadas usando interpolación bilineal. El contraste es limitado para evitar amplificar el ruido presente en la imagen, especialmente en áreas homogéneas. Otra forma más sencilla de aumentar el contraste es ajustando la intensidad de la imagen a un rango igual al promedio de intensidad \pm la desviación estándar.

Filtrado espacial

El filtrado espacial es una de las operaciones más comunes en el procesamiento de imagen, ya sea para reducir el ruido, suavizar, agudizar la imagen, o bien para detectar bordes. Como hemos explicado anteriormente las imágenes de cryo-TEM son ruidosas y resulta difícil distinguir las regiones de las partículas de interés frente al fondo debido al

ruido generado por la cámara CCD, pero sobre todo por la baja dosis utilizada en la adquisición de las imágenes en el TEM y el poco contraste que generan las muestras biológicas. El filtrado espacial incluye operaciones que trabajan localmente de forma que el valor de cualquier píxel dado en la imagen de salida se determina aplicando algún algoritmo a los valores de los píxeles vecinos al correspondiente píxel de entrada. Existe una amplia variedad de tipos de filtros espaciales y se pueden clasificar entre filtros lineales y no lineales.

Filtrado lineal: el valor de un píxel de salida es una combinación lineal de los valores de los píxeles vecinos al píxel de entrada, realizando una convolución (barrido) de un kernel cuadrado de $n \times n$ (o máscara de convolución) sobre la imagen. Cada píxel de salida se obtiene mediante el sumatorio de la multiplicación del kernel por los píxeles contiguos,

$$g(i, j) = \sum_{k,l} f(i-k, j-l) w(k, l) = \sum_{k,l} f(k, l) w(i-k, j-l) \quad (3.3.1)$$

donde $w(k, l)$ es el kernel o máscara.

En este trabajo utilizamos filtros paso bajo para suavizar las imágenes eliminando ruido y pequeños artefactos. Estos filtros solo afectan a regiones con cambios bruscos y la frecuencia de corte se determina por el tamaño del kernel y sus coeficientes (Kalman, 1960). Existen diferentes tipos entre los cuales:

- El filtro promedio hace un promedio de píxeles vecinos (kernel de unos).
- El filtro gaussiano hace una aproximación a la distribución gaussiana de los píxeles vecinos, modificando la señal de entrada mediante un proceso de convolución con una función gaussiana. En un filtro gaussiano de dos dimensiones su respuesta impulso es una función gaussiana de la forma,

$$g(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.3.2)$$

donde σ (sigma) es la desviación estándar de la distribución gaussiana, que se define como la raíz cuadrada de la varianza de una variable aleatoria X con un valor medio μ , luego es la raíz cuadrada del valor promedio de $(X - \mu)^2$. Si

por ejemplo X tiene valores en un set de datos finito x_1, x_2, \dots, x_N y cada valor con su valor de probabilidad correspondiente p_1, p_2, \dots, p_N , entonces la desviación estándar es,

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^N p_i (x_i - \mu)^2} \quad \text{donde} \quad \mu = \sum_{i=1}^N p_i x_i \quad (3.3.3)$$

Filtrado lineal adaptativo: El objetivo del filtro adaptativo es ofrecer un modelo lineal de un sistema desconocido a partir de medidas (posiblemente ruidosas), realizadas en la entrada y salida del sistema real. Para ello el filtro adaptativo minimiza la diferencia entre su salida y la del sistema que pretende modelar. El Filtro de Wiener es un filtro adaptativo de mínimos cuadrados que utiliza un método basado en una estimación estadística a partir de los vecinos locales de cada píxel para la eliminación de ruido en imágenes. El algoritmo calcula la media y desviación estándar de los vecinos usando un kernel de tamaño $m \times n$, y los coeficientes del filtro se calculan para minimizar la varianza (potencia) del error: donde la varianza es grande el Filtro de Wiener lleva a cabo poco filtrado y donde la varianza es pequeña este filtro hace más suavizado (Jin et al. 2003; Lim, 1990). Este filtro es bueno para eliminar ruido aditivo blanco de tipo gaussiano y consigue preservar los bordes y otras partes de alta frecuencia de las imágenes.

Los esquemas adaptativos permiten aproximar la solución óptima sin un conocimiento previo de la estadística del problema de filtrado. Es un sistema al que le llegan dos señales, la señal de entrada $X(r)$ y el error $e(r)$. A los coeficientes del filtro se les llama $w(r)$, que son multiplicados por la entrada $X(r)$ para obtener la salida. Estos filtros son adaptativos porque hacen uso de los datos de entrada para aprender los datos estadísticos requeridos. De esta forma consiguen ajustar su estructura tiempo-frecuencia a las características tiempo-frecuencia de la señal que se desea estimar y obtener así una reducción selectiva del ruido. Utilizan un combinador lineal adaptativo, que es un sistema lineal cuyos pesos $w(r)$ son adaptativos y son modificados hasta que el error entre la salida $y(r)$ y la respuesta deseada $d(r)$ alcanza el mínimo de una función de coste. Luego el objetivo del proceso adaptativo es encontrar el mejor sistema lineal capaz de aproximar la señal de entrada $X(r)$, contaminada por un ruido $n(r)$, a otra señal dada $d(r)$ de referencia. Esta señal de referencia puede ser cualquier señal. El Filtro de Wiener determina la respuesta impulsional de forma que el error sea lo más pequeño posible. Para minimizar

el error de forma determinista se aplica el método del error cuadrático medio mínimo (LMS) que persigue la solución de Wiener mediante una minimización por descenso del error cuadrático medio definido de la siguiente forma,

$$y(r) = w(r)X(r) \text{ , donde } e(r) = d(r) - y(r) \text{ es el error} \quad (3.3.4)$$

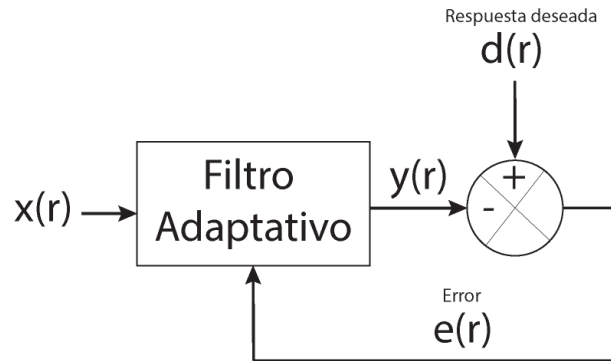


Figura 3.9: Esquema de un filtro de Wiener adaptativo

Filtros No lineales: en estos filtros se realiza una operación no lineal con los píxeles del entorno de vecindad. El filtrado Mediana es un filtrado no lineal usado principalmente para reducir el ruido sal y pimienta, y es bueno preservando los bordes. Este filtro sustituye el valor de cada píxel por el valor de la mediana de los píxeles vecinos, de forma que homogeneiza los píxeles de intensidad muy diferentes con respecto a la de los vecinos. El algoritmo del filtro de mediana toma un entorno de un píxel de la imagen y ordena los niveles de gris del entorno de menor a mayor, obteniendo aquel que sea la mediana estadística de la muestra de valores (Arce, 2005; Huang et al., 1997).

$$g(m) = MED\{f[m-k], f[m-k+1], \dots, f[m], f[m+k-1], f[m+k]\} \quad (3.3.5)$$

3.3.2 Algoritmos de segmentación de imagen

La segmentación de imágenes es una técnica de procesamiento que se refiere a la extracción de información útil de una imagen para facilitar su observación y análisis. Luego el objetivo final de la segmentación será asignar a cada objeto detectado una etiqueta que indique la región a la cual pertenece. Una región, es el conjunto de píxeles (generalmente conectados) que comparten la etiqueta asignada. Después se miden las características morfológicas de estas regiones. En esta tesis utilizamos la segmentación para obtener información de los objetos localizados y aislados en imágenes cryo-TEM en forma

de características morfológicas discriminatorias, como paso previo a un sistema de identificación formado por modelos ANFIS. La segmentación de imágenes cryo-TEM tiene el problema principal de la baja SNR entre las partículas individuales y el fondo (*background*), lo cual dificulta la clasificación de píxeles por intensidad a pesar del preprocesamiento de las imágenes. Para resolver esto en esta tesis se propone combinar tres algoritmos diferentes de segmentación: un método clásico por umbral, un método Canny de detección de bordes y un proceso de segmentación por textura.

Por otro lado, la segmentación de imágenes de cryo-TEM también tiene el problema de la variedad de tipos de muestra en estudio. Luego el objetivo es lograr un algoritmo de segmentación (incluyendo el preprocesamiento) cuyos parámetros sean adaptables y optimizados para el tipo de muestra en estudio. En esta tesis se utiliza un algoritmo de Inteligencia Artificial (AI), la *búsqueda Tabu*, para optimizar automáticamente los diferentes parámetros del algoritmo de segmentación utilizando imágenes cryo-TEM de referencia. En cryo-TEM es posible trabajar con muestras extremadamente diferentes, como pueden ser virus icosaédricos, ribosomas o complejos de proteínas con un peso molecular en torno a ~ 300 kDa, los cuales muestran una SNR y características morfológicas muy diferentes, luego hay que optimizar el proceso de segmentación para identificar bien la muestra de interés. Dado que existe una gran variedad de métodos de segmentación, donde la selección del método depende en gran medida de la aplicación, del tipo de imagen y del objetivo final, únicamente se describirán brevemente los métodos de segmentación que se utilizan en este trabajo (Nixon & Aguado, 2008).

Segmentación por umbral

El primer paso del proceso de segmentación es separar los objetos de interés (e.g. las partículas en imágenes cryo-TEM frente al fondo (*background*)) transformando la escala de grises en imágenes binarias que indiquen las regiones de los objetos de interés. La forma más común de generar imágenes binarias es mediante la utilización de un valor umbral de la escala de grises de una imagen. El proceso de umbralización (*thresholding*) compara el nivel de intensidad píxel a píxel con un determinado umbral y convierte la imagen original (escala de grises) en una imagen binaria (en blanco y negro). Es decir se elige un valor límite a partir del cual todos los valores de intensidades mayores serán codificados como uno mientras que los que estén por debajo serán codificados a cero. Para establecer dicho umbral, es necesario analizar el histograma de la región de interés

que se desea aislar con el propósito de encontrar un nivel de gris característico y exclusivo que la defina. A través del histograma obtenemos una gráfica donde se muestran el número de píxeles por cada nivel de gris que aparece en la imagen. Existen diferentes métodos para automatizar la selección de este valor umbral. En nuestro trabajo se ha elegido el método Otsu (Otsu, 1979) que selecciona el umbral óptimo para binarizar las imágenes utilizando técnicas estadísticas. En concreto, se utiliza la varianza, que es una medida de la dispersión de valores de los niveles de gris. El método de Otsu calcula el valor umbral de forma que la dispersión dentro de cada segmento sea lo más pequeña posible, pero al mismo tiempo la dispersión sea lo más alta posible entre segmentos diferentes. Para ello se calcula el cociente entre ambas varianzas y se busca un valor umbral k para el que este cociente sea máximo $\max_{0 \leq k \leq L-1} \sigma_B^2(k)$ donde $\{0, 1, 2, \dots, L-1\}$ son los niveles de gris de la imagen $f(x, y)$ de tamaño $M \times N$. La varianza σ es una medida de la dispersión de valores de los niveles de gris y la varianza entre clases se calcula de la siguiente manera,

$$\sigma_B^2(k) = \frac{[m_G P_1(k) - m(k)]^2}{P_1(k)[1 - P_1(k)]} \quad (3.3.6)$$

$$P_1(k) = \sum_{i=0}^k p_i, \quad k = 0, 1, \dots, L-1 \quad (3.3.7)$$

es el computo de las sumas acumulativas e indica la probabilidad de que un píxel pertenezca a la clase C_1 ,

$p_i = \frac{n_i}{MN}$ es la probabilidad de que ocurra el nivel de intensidad i ; n_i es el número de píxeles con nivel de intensidad i .

$$m(k) = \sum_{i=0}^k i p_i, \quad k = 0, 1, \dots, L-1 \quad (3.3.8)$$

es el cómputo de las medias acumulativas y

$$m_G = \sum_{i=0}^{L-1} i p_i \quad (3.3.9)$$

es la media global.

Luego el valor $\sigma_B^2(k)$ mide la dispersión entre los valores de intensidad de dos clases C_1 y C_2 definidas al tomar como valor umbral un valor de intensidad k . Si fijamos un valor umbral T en el nivel de intensidad k ($k=T$), se dividiría el conjunto de píxeles de la imagen en dos clases: $C_1 =$ píxeles con nivel de intensidad en $[0, k]$; $C_2 =$ píxeles con nivel de intensidad en $[k+1, L-1]$.

Segmentación por detección de bordes

En visión computacional la detección de bordes es de utilidad para extraer los bordes de objetos que en teoría delimitan sus tamaños y regiones, luego permite hacer reconocimiento de objetos y segmentar regiones. Los bordes son aquellas zonas de la imagen donde el nivel de intensidad varía bruscamente. Cuanto más rápido se produzca el cambio de intensidad, el borde será más pronunciado y será más fácil de detectar por dichos algoritmos. Para detectar los bordes que delimitan a los objetos es necesario identificar aquellos puntos (píxeles) que los conforman. Esta detección es el paso más delicado del método y la razón por la que existe una gran variedad de algoritmos que tratan de satisfacer esta necesidad. Para determinar qué píxeles pertenecen al borde, las técnicas buscan una conectividad entre ellos y donde la intensidad cambia rápidamente, bajo las condiciones de ser vecinos y de cumplir con un criterio de similitud.

Los algoritmos localizan sitios donde la primera derivada de la intensidad es mayor a un umbral o sitios donde la segunda derivada de la intensidad tiene un cruce por cero. La forma más común de implementar la detección de bordes es mediante filtros u operadores. Un ejemplo es el operador Canny (Canny, 1986) usado en este trabajo. En nuestro proceso de segmentación se utiliza el método de detección de bordes Canny para evitar las partículas incompletas que con alta probabilidad son un artefacto de la segmentación por el método umbral. Canny utiliza el cálculo de variaciones, una técnica que encuentra la función que optimiza un funcional indicado. La función óptima en el algoritmo de Canny está descrita por la suma de cuatro términos exponenciales, pero se puede aproximar por la primera derivada de una gaussiana. En el método Canny se utilizan varios estimadores de derivada buscando tanto bordes horizontales, verticales y diagonales. Canny utiliza dos umbrales diferentes, para detectar bordes fuertes y débiles, e incluye los bordes débiles en la salida solo si están conectados a bordes fuertes. El proceso del

algoritmo de detección de borde de Canny se compone de 5 pasos diferentes (Hou & Wei., 2002):

- Se aplica un filtro gaussiano para suavizar la imagen y eliminar ruido. La ecuación para un filtro gaussiano con un kernel de tamaño $(2k+1) \times (2k+1)$ es dado por:

$$H_{ij} = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{(i-k-1)^2 + (j-k-1)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.3.10)$$

- Se busca el gradiente de intensidad en la imagen. Como los bordes pueden estar presentes en cualquier dirección se utilizan cuatro filtros para detectar los bordes horizontales, verticales y de las dos diagonales en la imagen (e.g., en los ángulos 0° , 45° , 90° y 135°). Si la primera derivada en la dirección horizontal es G_x y en la dirección vertical G_y , el gradiente del borde y la dirección están determina dos por,

$$G = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad \text{y} \quad \theta = \text{atan2}(G_y, G_x) \quad (3.3.11)$$

- Se aplica la supresión no-máxima para deshacer las respuestas erróneas de la detección de bordes. El resultado es un adelgazamiento del borde, ayudando a suprimir todos los valores de gradiente a cero excepto el máximo local, el cual indica la localización con los cambios de valor de intensidad más agudos.
- Se aplica doble umbral para determinar los bordes potenciales. Con el objetivo de eliminar algunos píxeles en el borde causados por ruido, se utiliza un valor umbral bajo para eliminar los píxeles del borde con valor de gradiente por debajo de este umbral, y se mantienen los bordes con un valor de gradiente alto. Si el valor del gradiente del píxel en el borde es mayor que un valor de umbral alto, son marcados como píxeles de borde fuertes. Los que se encuentren entre el umbral alto y el bajo se marcarán como píxeles de borde débiles.
- Finalmente se eliminan todos los bordes débiles y no conectados a bordes fuertes. Para rastrear la conexión entre los bordes, se aplica un análisis de objetos binarios grandes (blob) procesando cada píxel de los bordes débiles y sus píxeles vecinos con conexión 8. Si dentro del blob hay píxeles de un borde fuerte se da por válido.

Segmentación por textura

El proceso de segmentación utilizado en esta tesis combina la segmentación por umbral y la detección de bordes Canny. Posteriormente el resultado es combinado con un proceso de segmentación por textura, que mide el valor de entropía de los vecinos a cada píxel (Gonzalez et al., 2009). El proceso de segmentación de imágenes texturadas consiste en dividir una imagen de entrada en una serie de regiones mutuamente excluyentes, donde los píxeles pertenecientes a cada una de ellas poseen una propiedad uniforme y homogénea con respecto a la textura, y cuyos valores sean sensiblemente distintos a los sitios de las regiones vecinas. Se usa un método en el que se considera que los valores de cada uno de los píxeles de la imagen están regidos por una función de probabilidad, y el problema consiste en estimar los parámetros que los definen.

En este trabajo se utiliza el método de Lattice-Boltzmann (LB) caracterizado por matrices de transición construidas a partir de las imágenes originales (Chen & Doolen, 1998; Geist & Westall, 2011). LB es un método diseñado inicialmente para la simulación de fluidos. LB consiste en una representación discreta del espacio mediante una rejilla formada por celdas cuyo estado se expresa por un campo escalar, llamado función de distribución $f_i(\vec{x}, t)$ de cada celda \vec{x} en el paso temporal t . Se itera la transición de estados en el tiempo t utilizando la ecuación de Boltzmann (Geist et al., 2004) hasta llegar a una distribución estacionaria, donde la variación de la distribución $f_i(\vec{x}, t)$ es cercana a cero (convergencia). Se utiliza la distribución estacionaria $f_i(\vec{x})$ para definir imágenes transformadas usando la entropía en nuestro caso. Se calcula el valor de entropía de cada píxel junto con sus vecinos conectados 9×9 . La entropía es una medida estadística de aleatoriedad y la transformación de entropía se define de la forma,

$$H(\vec{x}) = - \sum_{i=0}^9 \frac{f_i(\vec{x})}{n(\vec{x})} \ln \left[\frac{f_i(\vec{x})}{n(\vec{x})} \right] \quad (3.3.12)$$

donde $n(\vec{x})$ es la densidad

$$n(\vec{x}) = \sum_{i=0}^9 f_i(\vec{x}) \quad (3.3.13)$$

3.3.3 Operaciones morfológicas

Las operaciones más utilizadas durante el proceso de segmentación son las operaciones morfológicas y se definen tal que el valor de cada píxel de la imagen binaria resultado está basado en el valor del correspondiente píxel de la imagen binaria de entrada (las operaciones morfológicas trabajan con imágenes previamente binarizadas) y los de sus vecinos. De esta forma, eligiendo apropiadamente la forma de los vecinos a considerar se pueden construir operaciones morfológicas sensibles a una forma en particular.

Las principales operaciones morfológicas son la *dilatación* y la *erosión*. La operación de dilatación se describe como un crecimiento de píxeles en las fronteras de los objetos, es decir, se marca con un 1 la parte del fondo de la imagen que toque un píxel que forma parte de la región del objeto. Por el contrario la erosión elimina píxeles en la frontera de los objetos. En ambas operaciones se utiliza un elemento estructural que determina qué vecinos serán tomados en cuenta para la determinación del píxel resultado. En el caso de la dilatación, si algún píxel del elemento estructural tiene valor uno coincidiendo con al menos uno de la imagen original el píxel resultado es uno. Por el contrario en la erosión todos los píxeles del elemento estructural están configurados como unos y deben coincidir con todos los de la imagen de entrada, y si esto no sucede el valor del píxel de salida es 0. Cuando el elemento estructurante B tiene un centro (por ejemplo, B es un disco o un cuadrado) y este centro se encuentra en el origen de E, entonces la erosión de A por B se puede entender como el lugar geométrico de los puntos alcanzados por el centro de B cuando B se mueve dentro de A. La dilatación binaria se define de la siguiente forma, dada una imagen A y un elemento estructural B, (ambos imágenes binarias con fondo blanco), la dilatación de A por B se define como:

$$A \hat{\cup} B = \{x \in E \mid (\hat{B})_x \cap A \neq \emptyset\} \quad (3.3.14)$$

donde (\hat{B}) denota la simetría de B, que es, $\hat{B} = \{x \in E \mid -x \in B\}$ y la operación erosión se define de la forma,

$$A \hat{\ominus} B = \{x \in E \mid (B)_x \subseteq A\} \quad (3.3.15)$$

Operaciones basadas en objetos

En una imagen binaria, puede definirse un objeto como un conjunto de píxeles conectados con valor 1. El resto de la imagen puede ser considerado como el fondo. Antes de definir la conectividad es importante entender la relación existente entre los píxeles vecinos. Un píxel p con coordenadas (x, y) tiene cuatro vecinos, dos horizontales y dos verticales, cuyas coordenadas son: $(x+1, y)$, $(x-1, y)$, $(x, y-1)$, $(x, y+1)$. A este conjunto de píxeles se llama vecindad 4 de $p=(x, y)$ y se denota por $N_4(p)$. Nótese que para cada uno de estos píxeles hay una distancia de 1 (uno) desde $p=(x, y)$ y en los bordes de la imagen algunos de estos píxeles quedarán fuera de la imagen. Existen también 4 vecinos diagonales de p con coordenadas: $(x+1, y+1)$, $(x+1, y-1)$, $(x-1, y-1)$, $(x-1, y+1)$ y se le denota por $N_D(p)$, ver la figura 3.10. Conjuntamente, $N_4(p)$ y $N_D(p)$ forman la vecindad 8 de p denotada por $N_8(p)$.

A			B		
	$(x-1, y)$		$(x-1, y-1)$		$(x-1, y+1)$
$(x, y-1)$	(x, y)	$(x, y+1)$		(x, y)	
	$(x+1, y)$		$(x+1, y-1)$		$(x+1, y+1)$

Figura 3.10: Relación entre los píxeles vecinos. (A) Vecindad $N_4(p)$; (B) Vecindad $N_D(p)$

La conectividad es un concepto utilizado para establecer los límites de objetos en regiones dentro de una imagen digital. Para determinar si dos píxeles están conectados se determina si son adyacentes en algún sentido y si sus niveles de gris satisfacen algún criterio de similitud. Por ejemplo, en una imagen binaria con valores de 1 y 0, dos píxeles pueden ser vecinos, pero se dice que están conectados sólo cuando tienen el mismo valor. La conectividad, que es la forma en la que se considera si dos píxeles tienen relación como para considerar que forman parte del mismo objeto, puede ser de dos tipos, de conexión-4 ó bien conexión-8, y la distinción de objetos depende del tipo elegido. En la conectividad conexión-8 se dice que el píxel rojo pertenece al mismo objeto si existe un

píxel de valor uno en las posiciones 1-8. Por su parte la conectividad conexión-4 relaciona solo a los píxeles 2, 4, 5 y 7.

Para las operaciones que consideran la conectividad como un parámetro es importante tener en cuenta que éste determina fuertemente el resultado final del procesamiento puesto que puede dar origen a objetos nuevos (es decir, no existirían si se hubiera elegido otra conectividad). En matlab existen procedimientos que calculan automáticamente la conectividad en una imagen binaria, resultado de un proceso de segmentación, donde la imagen resultado asigna a cada píxel perteneciente a un determinado objeto la etiqueta del número de objeto correspondiente según su conectividad, mientras que los píxeles con valor cero no tienen efecto en la operación.

Una vez que se han etiquetado los objetos de una imagen se pueden realizar operaciones como el cálculo de la distancia entre objetos y la medida de diferentes características morfológicas. La distancia proporciona una medición de la separación existente entre dos puntos dentro de una imagen. Dados dos píxeles p y q con coordenadas (x,y) y (s,t) , respectivamente, se puede definir una función de distancia euclidiana de la forma,

$$D(p, q) = \sqrt{(x-s)^2 + (y-t)^2} \quad (3.3.16)$$

En visión computacional es de particular interés encontrar mediciones de características tales como el área, *centroide* y otras de objetos previamente etiquetados o clasificados utilizando una determinada conectividad. Estos componentes conectados en una imagen binaria se llaman *blobs*. Con el objetivo de identificar la posición y medir las propiedades de cada *blob*, matlab dispone de una función denominada *imfeature*. La salida de esta función es un dato compuesto que contiene el resultado de la medición de cada *blob* contenido en la imagen binaria. Se utilizan tipos de datos indexados, donde podemos localizar mediante un índice la medición el *blob* que deseemos. Las mediciones pueden variar en función del criterio de conectividad elegido. En este trabajo se utiliza la imagen binaria, resultado del proceso de segmentación, como máscara para multiplicarla por la imagen original, obteniendo de esta forma una imagen en escala de grises segmentada y con *blobs* identificados. Por último se miden las propiedades de cada *blob* de la imagen en escala de grises, que proporcionan medidas de la forma y características de intensidad (valor de los píxeles) de los *blobs*.

Capítulo 4

Nuevo esquema de control inteligente para cryo-TEM

En esta tesis se presenta un novedoso esquema de control diseñado para automatizar la adquisición de datos en sesiones cryo-EM (ver Capítulo 1), con el valor añadido de utilizar técnicas de inteligencia artificial en su diseño. Este esquema de control ha sido diseñado para experimentos de cryo-EM descritos en el Capítulo 2, en los que el objetivo final es reconstruir la estructura 3D de un complejo biológico.

El esquema de control inteligente propuesto en esta tesis utiliza un sistema experto que toma decisiones en tiempo real. Este sistema se ha diseñado con la ayuda de las metodologías de *soft computing* descritas en el Capítulo 3. Para la toma de decisiones durante la adquisición de datos en modo automático en el TEM se programa un sistema de inferencia difusa (FIS) de tipo Mamdani, utilizando para ello la experiencia de un experto en cryo-TEM, que en este caso coincide con el ingeniero programador del FIS y con el autor de esta tesis. El objetivo principal de la programación del FIS es tratar de incluir el conocimiento extraído de la experiencia en el motor de inferencia, a través de la selección cuidadosa de las funciones de membresía y las reglas difusas. Como se describió en el Capítulo 2, en cryo-EM la selección de partículas es el primer paso importante después de la adquisición de datos y la corrección de la CTF. Además el sistema experto necesita conocer la calidad de las partículas y el nivel de contaminación en las imágenes. Para integrar esta capacidad al sistema experto se propone un nuevo método basado en diferentes sistemas de inferencia neuro-difuso adaptativo (*ANFIS*), que permite auto-

matizar la identificación y la selección de partículas en las imágenes. Este sistema híbrido combina el método cualitativo de la lógica difusa y la capacidad de aprendizaje y generalización de una red neuronal adaptativa para conseguir el mejor rendimiento posible. Este método de identificación necesita utilizar diferentes algoritmos de procesamiento de imagen normalmente dedicados a la detección de objetos. Es importante destacar el uso de un algoritmo basado en la búsqueda Tabú dedicado a optimizar el proceso de segmentación para la muestra de interés. En el Capítulo 5 se mostrará cómo este sistema de identificación de partículas ha sido exitosamente validado utilizando diferentes muestras biológicas.

4.1 Esquema de control inteligente para la adquisición automática de imágenes en sesiones para cryo-EM

Como ya se ha descrito anteriormente, la inestabilidad en el goniómetro, el uso de un porta-muestras externo y diferentes fenómenos de inestabilidad en las lentes hacen difícil el uso de esquemas basados en un *atlas* preliminar de toda la rejilla. Es por ello que para el caso del TEM modelo JEM-2200FS/CR se presenta un esquema de toma de decisiones en tiempo real durante la adquisición automática de imágenes. Las decisiones en tiempo real son tomadas gracias a un sistema experto que incluye distintos modelos difusos y neuro-difusos junto con algoritmos de visión artificial. A continuación se explicarán los diferentes módulos que forman el nuevo esquema de control inteligente, incluyendo los módulos dedicados a controlar algunos componentes del TEM durante una sesión cryo-TEM.

4.1.1 Módulo de adquisición en mínima dosis

En sesiones cryo-TEM con muestras sensibles a la radiación, es necesario mantener la dosis total de electrones sobre la muestra en unos valores mínimos. Una vez que la rejilla vitrificada es transferida a través del goniómetro dentro de la columna del TEM y se han realizado los alineamientos del haz a través de toda la columna, comienza la sesión en un régimen de mínima dosis. El TEM de Jeol tiene su propio sistema de mínima dosis (MDS) para minimizar el número de electrones por \AA^2 que inciden sobre las zonas de interés. De esta forma el agujero seleccionado en la rejilla solo es ex-

puesto a un haz intenso de electrones en la fase de adquisición (*Photo mode*), siendo el proceso de selección de agujeros en la rejilla realizado a baja magnificación con una mucho menor dosis de electrones por área (*Search mode*). Además, se define una tercera posición para el ajuste de diferentes parámetros ópticos, de los cuales el más importante es el subenfoco (*Focus mode*). Los tres modos de trabajo (*Search*, *Focus* y *Photo*) deben ser independientemente alineados antes de comenzar una sesión en mínima dosis y tienen que ser preconfigurados (magnificación, *spot size*, valor alpha, valor de CL1, valor de CL2, posición del *slit* del filtro de energía, *energy shift*, posición de aperturas y valor de lentes deflectoras/*stigmators*). El protocolo seguido durante un esquema de adquisición en mínima dosis puede verse en la figura 4.1. Inicialmente se realiza una búsqueda a baja magnificación del agujero o región de interés a irradiar, utilizando el modo “*Search*”, normalmente a una magnificación entre 1000× y 4000×. Un usuario experimentado en cryo-TEM identifica las mejores regiones de hielo uniforme (normalmente las mejores zonas son las que tienen el hielo lo más fino posible y que contienen una buena distribución de la muestra de interés). Utilizando el goniómetro es necesario mover la rejilla para centrarla en un nuevo agujero no-irradiado (región de interés (ROI)) utilizando las imágenes de *Search* en el modo continuo de la CCD. Después se cambia al modo “*Focus*” (configurado a una magnificación superior al modo “*Photo*”, y separado ~1-3 μm del área central de interés, utilizando una combinación preconfigurada de *beam shift* e *image shift*). Esto permite al usuario enfocar, evaluar el astigmatismo y estabilizar el goniómetro (esperando a que la deriva producida por la inercia del goniómetro disminuya), justo antes de adquirir la imagen final en modo *Photo*. En modo *Photo* se utiliza el valor de la lente OL previamente ajustado en el modo *Focus* y el usuario selecciona las condiciones finales de adquisición de imagen a alta magnificación, típicamente entre 40000× y 80000×.

Normalmente, en las sesiones cryo-TEM en modo automático que se han realizado para este trabajo se ha empleado una magnificación nominal de 50000× en el modo *Photo* (obteniendo un tamaño real de pixel en las imágenes finales en CCD de 2 Å/pixel) y un rango de subenfoco desde -3 μm hasta -1 μm . En el modo *Search* se ha empleado una magnificación nominal de 4000× aumentos y de 60000× en el modo *Focus*. Las lentes de condensadora y el tiempo de exposición de la CCD se configuran para que la dosis total de la exposición de los electrones sobre la muestra en una imagen final en modo *Photo* sea de $\sim 20 \text{ e}^-/\text{Å}^2$ en un segundo.

4. NUEVO ESQUEMA DE CONTROL INTELIGENTE PARA CRYO-TEM

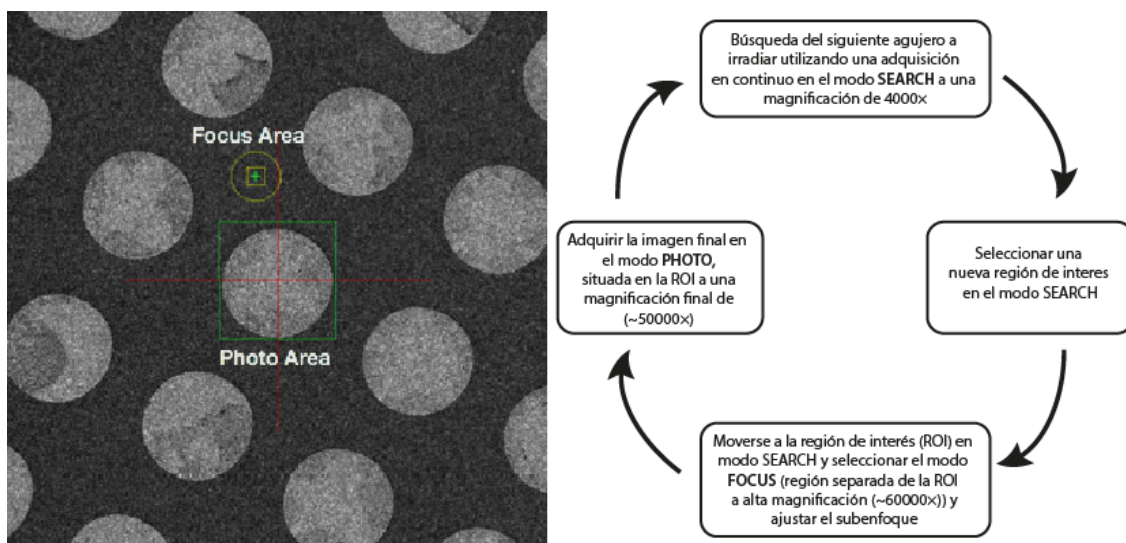


Figura 4.1: Protocolo para la adquisición de imágenes en mínima dosis en sesiones cryo-TEM

Rotación del sistema de coordenadas para la navegación automática en modo *Search*

Durante una sesión cryo-TEM, se navega secuencialmente a través de diferentes agujeros en la rejilla (regularmente espaciados y de la misma forma si se usan rejillas *holey* comerciales). En un modo de trabajo manual el usuario puede utilizar la cámara CCD en modo continuo y mover el goniómetro hasta el siguiente agujero (Sun & Li, 2010). En un esquema automático, es necesario encontrar las coordenadas del siguiente agujero no irradiado y mover el goniómetro convenientemente para la adquisición de imagen de esta nueva región a alta magnificación. Antes de navegar de forma automática con cualquier TEM es necesario transformar el sistema de coordenadas de las imágenes a baja magnificación del modo *Search* en el sistema de coordenadas del goniómetro que realiza los movimientos motorizados.

El esquema de control presentado imita el modo de trabajo manual de un usuario en una sesión cryo-TEM. En modo manual el usuario puede mover un *trackball* mientras observa el movimiento de la rejilla en una imagen en vivo ofrecida tanto por la cámara analógica ultra-rápida modelo *Hamamatsu* como por la CCD utilizando las imágenes en modo continuo a través de *DigitalMicrograph*. Para el modo continuo en la CCD se utiliza un tiempo de exposición muy pequeño y se reduce el tamaño de las imágenes a 1K×1K para de esta forma poder reducir lo máximo posible el tiempo de exposición. Nuestro esquema de control utiliza las imágenes en modo *Search* para navegar a través

de cada cuadrante de la rejilla, luego conoce la posición del siguiente siguiente agujero a irradiar utilizando un sistema de coordenadas cartesiano en la imagen en modo *Search* (donde el punto $(X, Y)=(0, 0)$ es el centro de la imagen).

Según la convención del TEM el eje X coincide con el eje de giro del goniómetro, el eje Z coincide con el haz de electrones, y el eje Y es ortogonal a los otros dos. El movimiento del goniómetro en las direcciones X e Y se transforman a coordenadas en la imagen usando una calibración de la relación entre el desplazamiento producido por los engranajes motorizados del goniómetro y el correspondiente desplazamiento en la imagen. Para realizar esa calibración las coordenadas de la cámara son convertidos a coordenadas del goniómetro usando el tamaño del pixel a esa magnificación y el ángulo del eje de giro en el plano de la cámara CCD. Debido a la configuración de fábrica de nuestro TEM, en las lentes electromagnéticas de magnificación y proyectoras, el sistema de coordenadas en las imágenes proyectadas sufre una rotación en el plano cuando la magnificación cambia entre $6000\times$ y $8000\times$ aumentos. Esto produce que al mover el goniómetro en las direcciones X e Y a una magnificación por ejemplo de $50000\times$ sí coincidan los movimientos en X e Y del goniómetro con el sistema de coordenadas cartesianas de la imagen. Por el contrario a una magnificación de $4000\times$ el eje de giro del goniómetro se encuentra rotado en la imagen, ver figura 4.6. Esta rotación entre el sistema de coordenadas en las imágenes en modo *Search* y el movimiento real del goniómetro en los ejes (X,Y) hace necesario una transformación de coordenadas, de forma que el goniómetro se mueva correctamente usando las imágenes en modo *Search* como referencia. El valor de la rotación γ es obtenido de forma experimental utilizando una muestra patrón, moviendo el goniómetro en una sola dirección y midiendo en la imagen en vivo (con la CCD en modo continuo) la dirección del movimiento. Las rotaciones entre los ejes cartesianos de dos sistemas de referencia 2D se puede considerar como la rotación alrededor del eje perpendicular al plano, en este caso Z, y la matriz de rotación se escribe de la forma,

$$\begin{pmatrix} X' \\ Y' \\ Z' \end{pmatrix} = R(\gamma) \begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\gamma) & \sin(\gamma) & 0 \\ \sin(\gamma) & \cos(\gamma) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \end{pmatrix} \quad (4.1.1)$$

4.1.2 Arquitectura de las comunicaciones entre cliente y servidor

El esquema de conexión entre un cliente con Matlab a dos servidores (el PC que controla la cámara CCD de Gatan y el PC que controla el TEM de JEOL) se realiza a través del interface JEOL TEMCON. Las imágenes digitales generadas por la cámara CCD son obtenidas a través del *plug-in COMExternalPlugIn.dll* instalado en el software *DigitalMicrograph™* (Gatan, Pleasanton, CA) que actúa como un servidor de tipo COM. En la figura 4.2 se muestra un esquema para la navegación automática a través de diferentes agujeros en la rejilla con acceso remoto a nuestro microscopio electrónico JEOL.

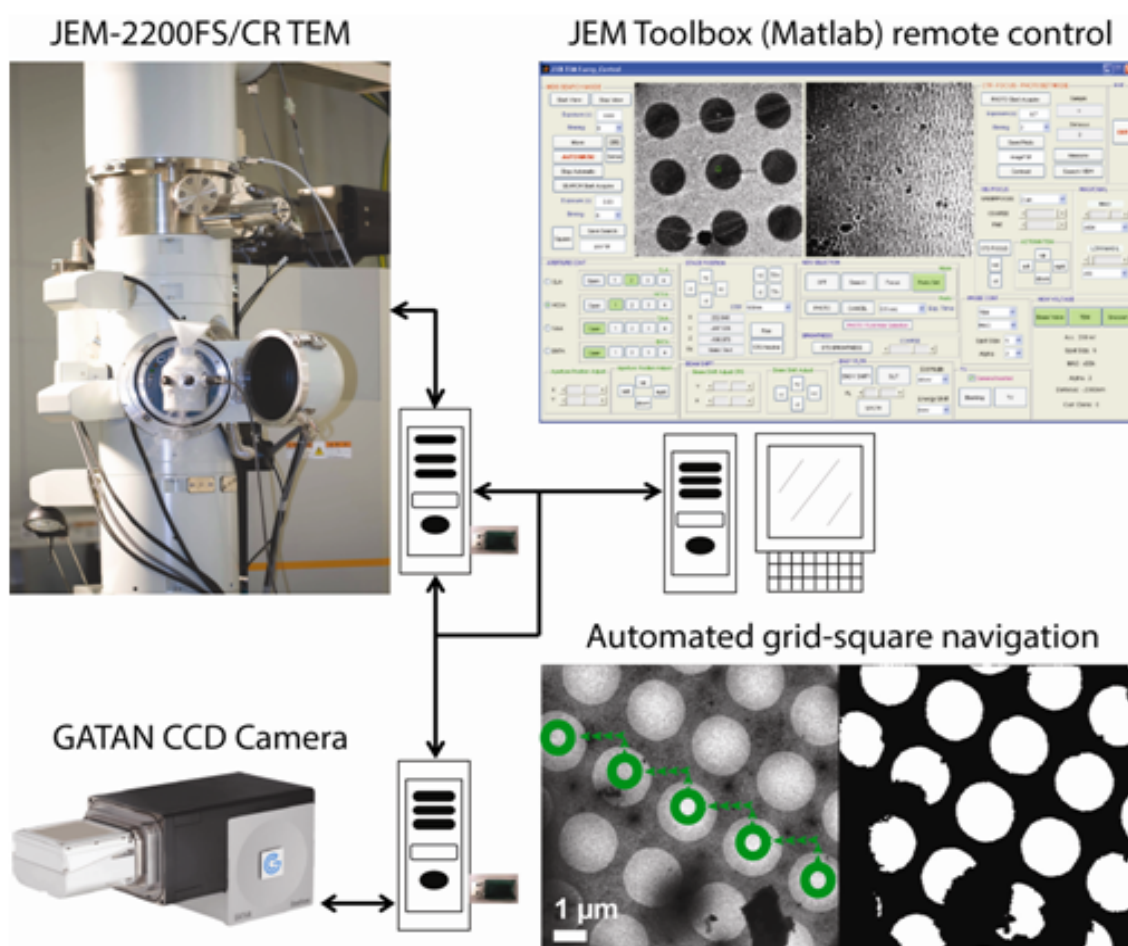


Figura 4.2: Esquema básico para la conexión en remoto al TEM del CIC bioGUNE y esquema de navegación a lo largo de diferentes agujeros en una rejilla Quantifoil R2/1 utilizando la adquisición de imágenes en modo *Search*

4.1.3 Monitorización y control remoto

Todos los componentes del TEM son controlados o bien a través de consolas de mando (ver figura 4.3), o a través del software de Jeol. El paquete de software *JEM toolbox* ofrece más de 100 operaciones predefinidas que pueden ser utilizadas para controlar remotamente desde matlab cada uno de los componentes de nuestro TEM descritos en el Capítulo 1, incluyendo el cañón de electrones, cada una de las lentes, el espectro del filtro de energía, todas las aperturas, algunas válvulas del sistema de vacío, los motores piezoeléctricos del goniómetro para mover la muestra en las direcciones (X, Y, Z), y la adquisición de imagen a través del detector (en nuestro caso una CCD de 4k×4k). La resolución en escala de grises está limitada a 8 bits/pixel por *JEM Toolbox*.

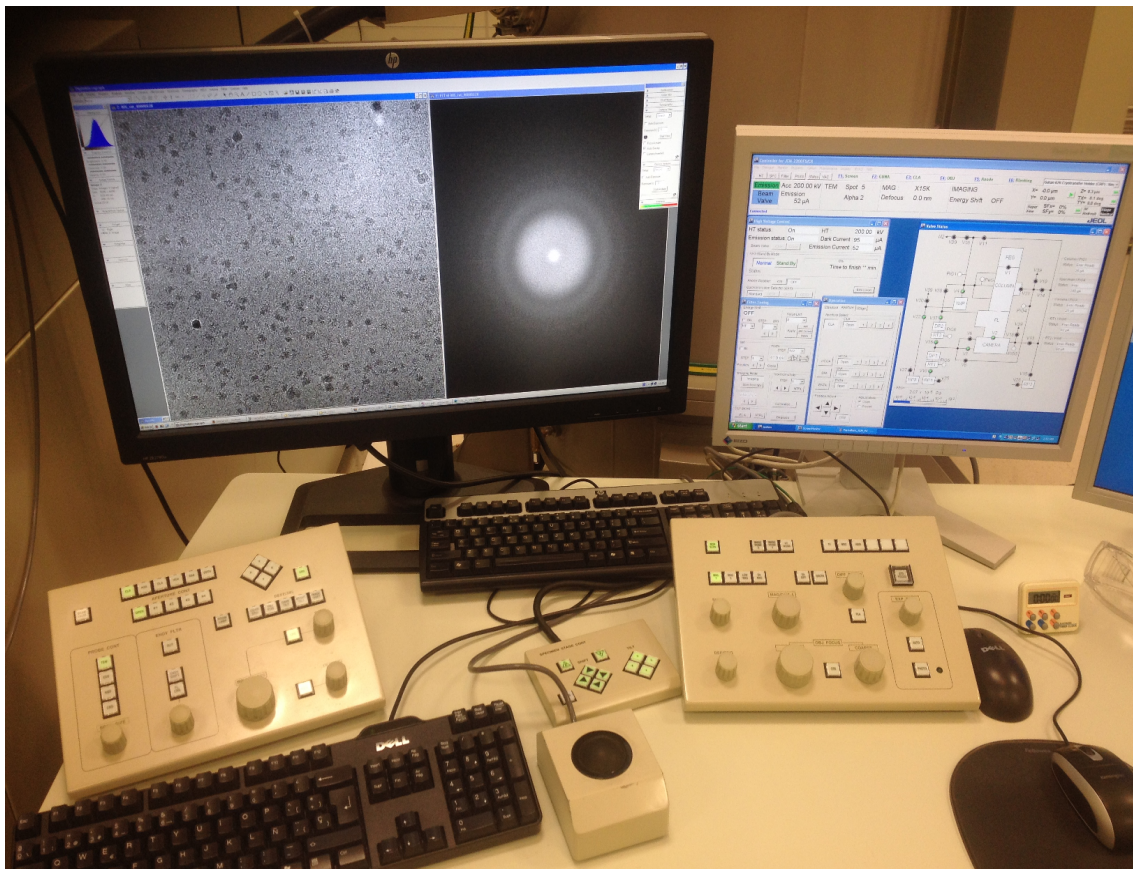


Figura 4.3: Consolas de mando del TEM JEM2200FS/CR de JEOL en frente del TEM

El proceso automático es monitorizado en remoto a través de un panel de control (GUI) que contiene en todo momento la información actualizada del proceso de adquisición automática y a través del cual el usuario puede actuar sobre el proceso conmutando entre el modo manual y el modo automático. Cada uno de estos módulos y la GUI son

4. NUEVO ESQUEMA DE CONTROL INTELIGENTE PARA CRYO-TEM

programados utilizando diferentes funciones dedicadas disponibles en diferentes paquetes de funciones (toolbox) de Matlab (e.g. *Image Processing*, *Fuzzy Logic*, *Optimization*, *Automated CTF Estimation* y *JEM Toolbox*). El diseño del interface gráfico (GUI) para interactuar con el usuario está formado por una colección de diferentes paneles, que permiten un control remoto total del TEM y la cámara CCD de forma muy similar a como lo haría en frente del microscopio un usuario familiarizado con las consolas de un Jeol de este modelo, ver figura 4.4.

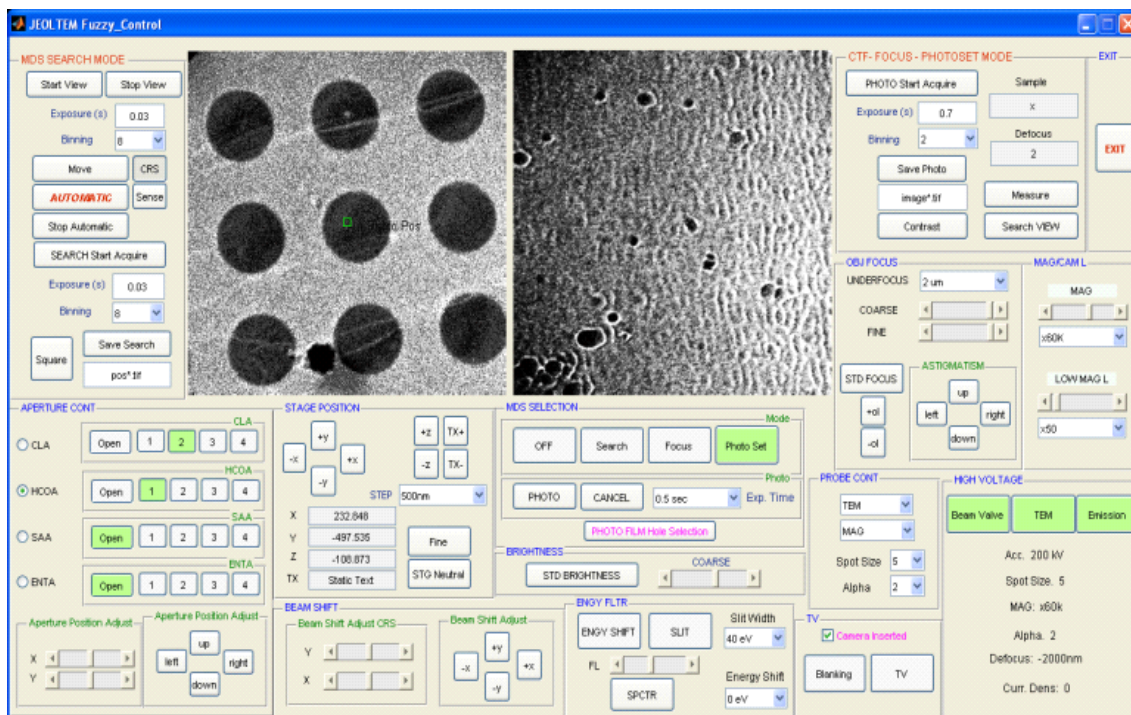


Figura 4.4: Diseño del panel central de la GUI para el control remoto del TEM modelo JEM-2200FS/CR de JEOL y la cámara CCD modelo UltraScan 4000 de Gatan

La GUI consta de una ventana principal que contiene todas las funciones de las consolas que utiliza un usuario en modo manual. Durante una sesión cryo-TEM en modo automático proporciona información básica en tiempo real sobre el estado del TEM y los resultados del esquema del control. En modo automático la GUI mostrará el próximo agujero a irradiar en la rejilla en una imagen del modo *Search*. La otra imagen mostrará el resultado del análisis de la CTF en tiempo real de la última imagen adquirida en modo *Photo*, la distribución de partículas identificadas y seleccionadas automáticamente y nos mostrará de forma gráfica el número de partículas de contaminación presentes en cada imagen.

4.1.4 Calibraciones preliminares al modo automático

Después de insertar la rejilla dentro de la columna del TEM es necesario esperar al menos durante ~30/60 minutos para estabilizar la rejilla dentro de la columna del TEM y evitar el efecto de deriva en las imágenes por vibraciones e inestabilidad térmica. A continuación un usuario experto debe realizar los alineamientos del haz de electrones a lo largo de toda la columna del TEM, utilizando las diferentes lentes deflectoras para conseguir las mejores condiciones ópticas, incluyendo la corrección del astigmatismo en las imágenes finales.

Posteriormente se debe inspeccionar la calidad del hielo en toda la rejilla a baja magnificación (en modo *low-mag* a una magnificación entre 100× y 400×). En estas condiciones de *low-mag* se preseleccionan los cuadrantes que ofrezcan las mejores condiciones de grosor y uniformidad del hielo. En la figura 4.5 se muestra una región a baja magnificación de una rejilla comercial donde los diferentes cuadrantes en la rejilla tienen diferentes tipos de grosor de hielo, zonas cubiertas por contaminación e incluso regiones con el carbón roto. El cuadrado verde muestra una región con un grosor y calidad de hielo aceptables para comenzar el procedimiento en modo automático.

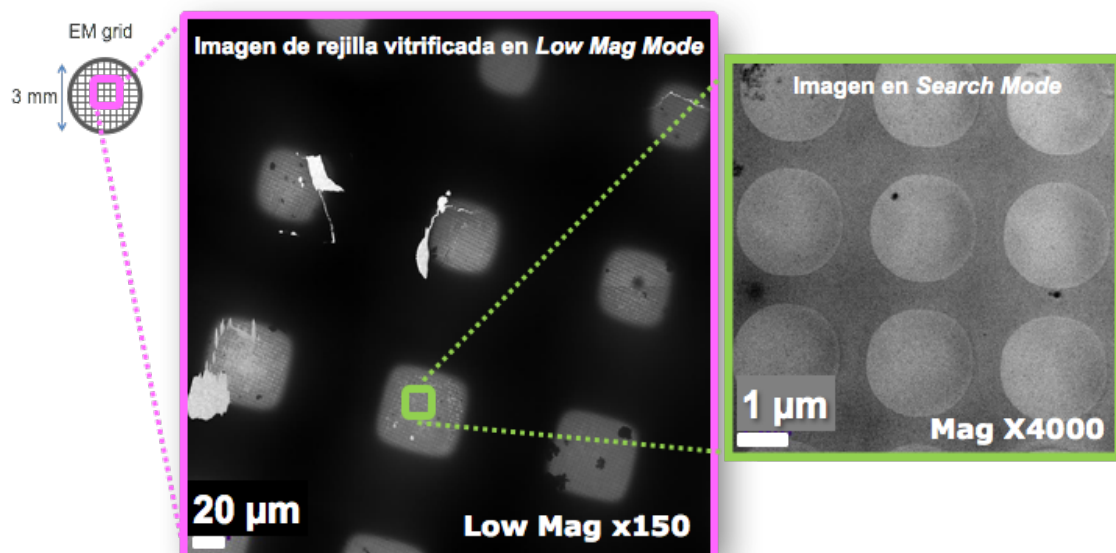


Figura 4.5: Imagen a baja magnificación (*low mag*) (150×) de una rejilla comercial Quantifoil y encuadre de una región válida para comenzar una sesión cryo-TEM

Los mejores cuadrantes deben tener un hielo lo más fino posible que contenga una buena distribución de la muestra y deje atravesar suficiente cantidad de electrones. Para ha-

4. NUEVO ESQUEMA DE CONTROL INTELIGENTE PARA CRYO-TEM

cer esto el usuario mueve manualmente el goniómetro hasta situarse en la parte inferior de cada cuadrante potencial y registra cada una de estas posiciones. En estas regiones se debe evaluar la posición eucéntrica de Z_{euc} modificando la altura Z del goniómetro hasta encontrar el plano focal (*in focus plane*). Antes de este proceso se ajusta la lente de objetivo OL en posición de foco estándar, para lo cual el TEM de Jeol tiene un botón en uno de los paneles de control manual. Es necesario registrar en una matriz cada posición (X_{cuad}, Y_{cuad}) del goniómetro con el haz centrado en la parte inferior de cada cuadrante seleccionado, más una tercera variable correspondiente al Z eucéntrico en cada uno de estos cuadrantes (corresponde a la posición Z del goniómetro, que con la OL configurada con un valor estándar, localiza el plano focal o condición de sub-enfoque ≈ 0).

Antes de comenzar el modo automático es necesario verificar y definir los parámetros del microscopio en los tres modos de trabajo en baja dosis de JEOL (*Photo*, *Focus* y *Search*), incluyendo la magnificación, el *spot-size*, el valor de *alpha*, brillo del haz, la posición de las aperturas y los parámetros del filtro de energía. En el modo *Photo* la magnificación (normalmente entre $40000\times$ y $60000\times$), la intensidad del haz y el tiempo de exposición de la cámara son ajustados para obtener las condiciones finales de adquisición de imagen, de forma que el valor medio de las cuentas medidas en las imágenes adquiridas en CCD estén en un rango entre $\sim 1000/2000$ cuentas.

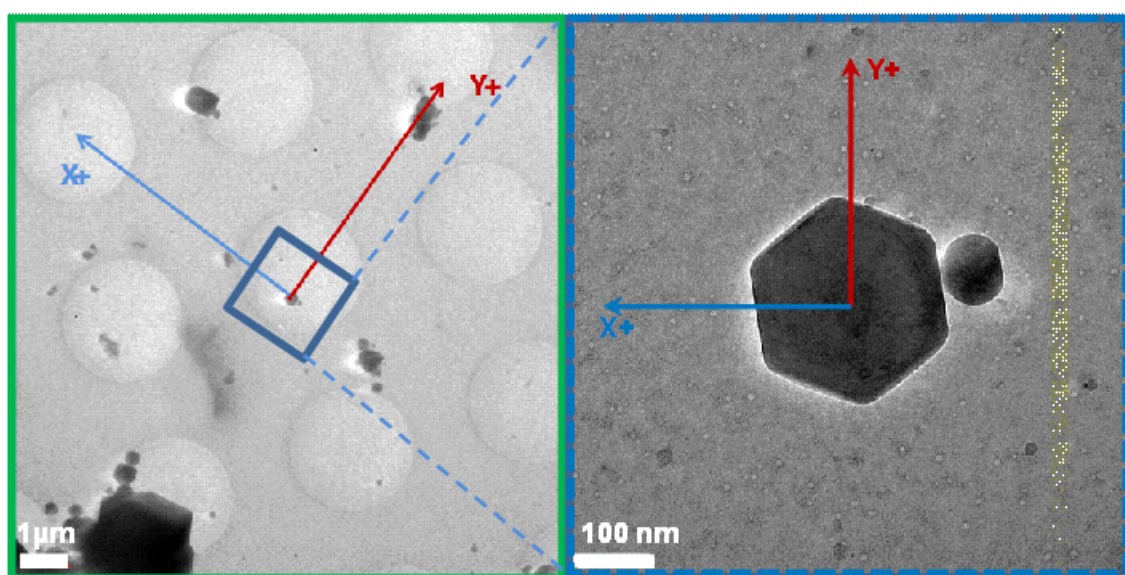


Figura 4.6: Imagen de una partícula de contaminación situada en el centro de la imagen en modo *Photo* (a una magnificación de $50000\times$) y la misma partícula situada en el centro de la imagen en modo *Search* (a una magnificación de $4000\times$)

Por último es de vital importancia que el usuario busque un objetivo (por ejemplo, una contaminación de hielo) y mueva el goniómetro de forma que esta referencia esté situada en el centro de la imagen en el modo *Photo*. Esa misma referencia debe estar centrada en la imagen en modo *Search* sin cambiar la posición del goniómetro, para lo cual se deben ajustar las lentes deflectoras correspondientes a “*beam shift*” e “*image shift*” en el modo *Search* (ver figura 4.6).

4.1.5 Diseño del nuevo esquema de control

El principal objetivo del nuevo esquema de control es imitar el modo de trabajo manual de un operador experimentado durante la navegación a través de una rejilla vitrificada (Ermantraut et al., 1998; Sun & Li, 2010). No obstante, en lugar de utilizar un esquema en forma de *atlas* de toda la rejilla, se propone crear un esquema de control que navega de la misma forma que lo haría un experto como se ve en el esquema de la figura 4.7.

Selección del modo de trabajo del esquema automático

Una vez que la muestra está insertada en el microscopio, se han realizado los alineamientos del haz y las condiciones de trabajo son estables, existen dos posibilidades de utilización del modo automático:

- En el primero el usuario debe navegar manualmente en “*low-mag*” utilizando el “*trackball*” a lo largo de toda la rejilla y guardar la posición de los mejores cuadrantes como se ha explicado en la sección anterior. La posición de estos cuadrantes tiene que tener asociada una posición del eje Z que coincidiendo con el modo estándar del valor de OL esté cerca al plano focal (subenfoco cero) en esa región. Esta sencilla matriz de tres columnas con unas pocas posiciones del goniómetro será suficiente para navegar durante horas sin intervención humana.
- La segunda posibilidad implica un modo de trabajo mixto en el que el usuario trabaja en modo manual y presiona el botón del modo automático para continuar navegando por ese cuadrante sin intervención humana. Esto permite una mayor flexibilidad y adaptabilidad al tipo de muestra y experimento respecto a un método basado en el atlas de toda la rejilla. El usuario puede comenzar la navegación en modo automático en cualquier región del cuadrante teniendo en cuenta la

posición en la que se configura la región del modo *Focus*, desviada con *image shift* respecto a la región del modo *Photo*.

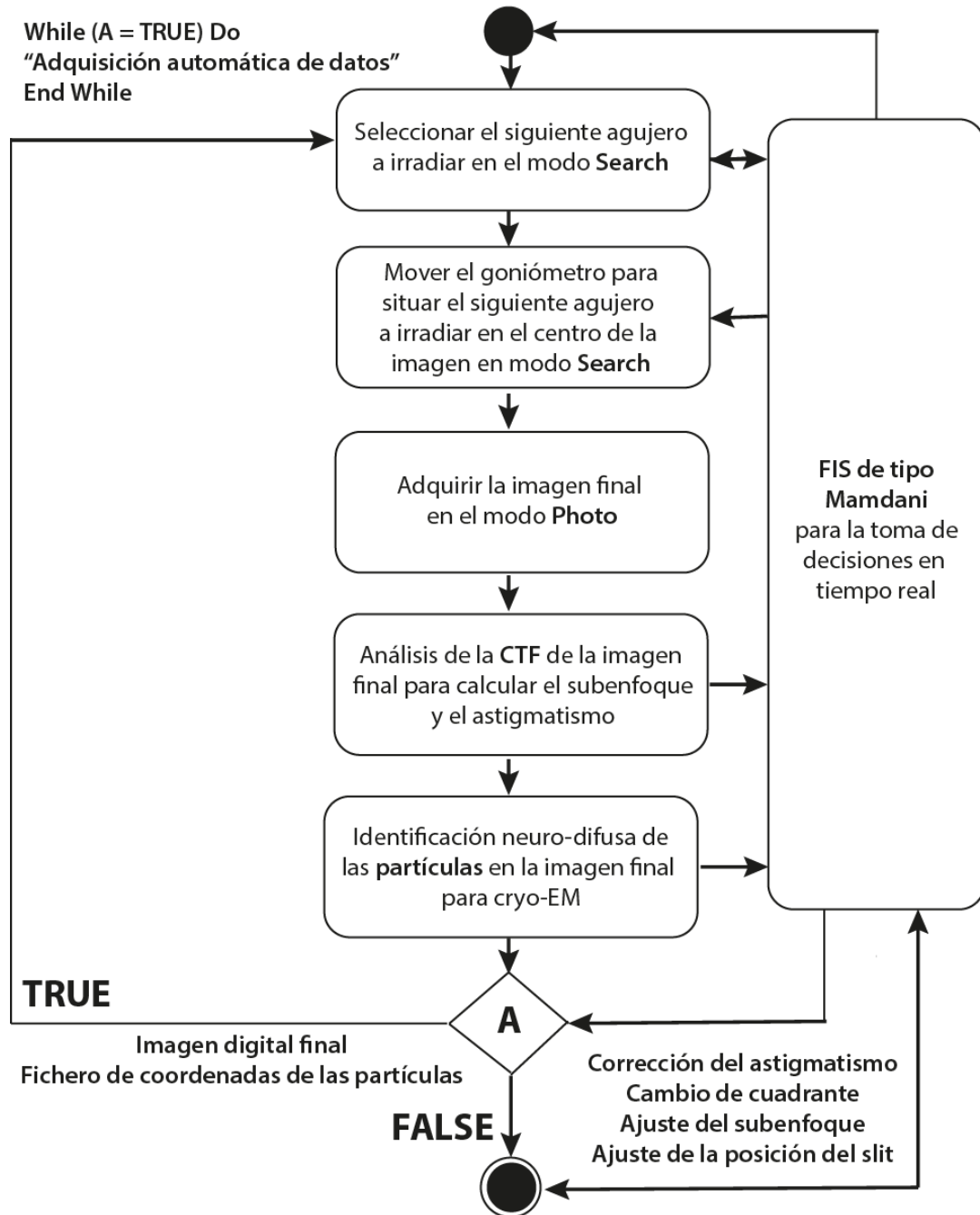


Figura 4.7: Representación esquemática de la secuencia seguida para la automatización de la adquisición de datos en una sesión cryo-TEM

Secuencia seguida por el ciclo de adquisición automática

Al presionar el botón del modo automático el esquema de control iniciará un ciclo de adquisición automática, utilizando una secuencia de procesos ejecutados de forma itera-

tiva y navegando a lo largo de los cuadrantes preseleccionados por el usuario. El programa navegará secuencialmente a lo largo de los agujeros segmentando la imagen en modo *Search* (adquirida a una magnificación de 4000×). Las imágenes en el modo Photo son adquiridas a alta magnificación, dentro de un rango de subenfoco predefinido y en condiciones de mínima dosis.

En nuestro diseño el programa debe comenzar la secuencia desde una zona inferior del cuadrante y navega automáticamente sin supervisión a través de todos los agujeros de este cuadrante de la misma forma que se haría de forma manual. Para automatizar la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM se utiliza una secuencia de diferentes procesos que trabajan en serie y son ejecutados de forma iterativa:

- *Selección del siguiente agujero a irradiar* utilizando las imágenes del modo *Search*. El FIS es el responsable de seleccionar el siguiente agujero. El algoritmo diseñado para detectar el siguiente agujero a irradiar utiliza las imágenes adquiridas en modo *Search* y sigue un esquema muy similar al descrito para el sistema de identificación de partículas: realiza un filtrado para eliminar ruido, normaliza los niveles de gris utilizando una ecualización del histograma y utiliza una segmentación basada en la búsqueda de características en las imágenes. Para poder identificar los agujeros en imágenes del modo *Search* (adquiridas a una magnificación nominal de 4000× aumentos) se utiliza una técnica morfológica para segmentar las imágenes de forma guiada, basándonos en una forma de disco predefinida (el elemento estructurante), siguiendo la técnica de “descomposición radial usando líneas periódicas” (Adams, 1993; Jones & Soille, 1996). Las rejillas comerciales de la compañía Quantifoil contienen agujeros de un diámetro prefijado (normalmente de 2 micrómetros) y regularmente espaciados, lo cual ayuda en el diseño de esta función del modo *Search*. El proceso de segmentación genera una imagen binaria que es multiplicada por la imagen original, de esta forma las características de los objetos detectados (*blobs*) nos darán la información del centro y extremos del agujero, y también nos permiten calcular el valor medio del nivel de grises dentro del agujero, (ver Anexo). Lo ideal es seleccionar el agujero consecutivo más cercano al centro de la imagen a no ser que no cumpla los criterios mínimos de calidad. Como se describirá en la siguiente sección un FIS de tipo Mamdani selecciona el mejor agujero a irradiar. El modelo

FIS controla que solamente los agujeros que cumplen ciertos criterios sean irradiados, y utiliza una base de datos que es generada durante la sesión automática cryo-TEM para conocer las características de los mejores agujeros a baja magnificación, es decir el área medida y el valor medio del nivel de gris. Los mejores agujeros serán los que tengan mejor distribución de partículas y menos contaminación. De esta forma el esquema de control puede adaptar los correspondientes parámetros del modelo FIS a estos nuevos rangos de valores obtenidos de forma experimental en esa misma sesión de la misma forma a cómo lo haría un usuario experto en cryo-TEM. En la siguiente sección se explicará en detalle el diseño del modelo FIS de tipo Mamdani, usado para tomar decisiones en tiempo real durante las sesiones cryo-TEM en modo automático con nuestro TEM.

- *Movimiento del goniómetro hacia la posición del siguiente agujero* seleccionado. Debido a la imprecisión del goniómetro en el movimiento a grandes distancias se hace un ciclo iterativo de aproximación automática al siguiente agujero.
- Si no hay una imagen de referencia, adquirida en el modo Photo en un agujero cercano al nuevo, *automáticamente se calcula y ajusta el subenfoco usando imágenes adquiridas en el modo Focus*, en un ciclo de cálculo con ACE toolbox y ajuste variando el valor de OL, hasta situarlo en el rango elegido.
- *Adquisición de la imagen a alta magnificación en el modo Photo* en condiciones de mínima dosis. Por defecto el esquema de control adquirirá las imágenes en el centro del agujero, pero si la distribución de partículas no es buena irá a un punto intermedio entre el centro y uno de los extremos del agujero.
- Una vez que se tiene la nueva imagen *se calcula automáticamente el subenfoco y el astigmatismo a través del análisis de la CTF utilizando el software ACE toolbox*, como se explicará más en detalle en la siguiente sección.
- *Cálculo del número de partículas válidas en la nueva imagen y detección del número de partículas de contaminación* (normalmente cristales de hielo). En la sección 4.4 se explicará el diseño de un sistema neuro-difuso para la identificación automática de partículas en las imágenes cryo-TEM y en el Capítulo 5 se presentarán dos casos prácticos del uso de este novedoso método de detección de partículas.

La salida del esquema de control serán las imágenes del modo Photo en formato MRC (únicamente se guardarán las imágenes de buena calidad) junto con los correspondientes ficheros de coordenadas de cada una de las poblaciones de partículas que puedan ser de interés en esa muestra (normalmente solo se busca una única población homogénea). Una vez terminada la secuencia de adquisición de datos se pueden utilizar directamente estas imágenes y estos ficheros de coordenadas para reconstruir la estructura 3D de este complejo. Cuando no se encuentran más agujeros en el cuadrante que cumplan con unos requerimientos mínimos de calidad (criterios de intensidad, área, distribución de partículas individuales y calidad del hielo), el esquema de control mueve el goniómetro hasta el siguiente cuadrante previamente definido por el usuario.

De acuerdo a nuestra experiencia, una rejilla vitrificada dentro del vacío de la columna del TEM se mantiene libre de contaminación durante aproximadamente 10 horas. Como ya se ha mencionado el TEM del CIC bioGUNE no está diseñado para ser totalmente automatizado, ya que el usuario debe rellenar cada ~3 horas el dispositivo anticontaminación (ACD) y el *dewar* del porta-rejillas con nitrógeno líquido. Por este motivo el diseño del esquema de control se ha adaptado a la no idealidad del TEM, y el resultado es un esquema eficiente y fácil de usar por cualquier usuario.

4.2 Sistema experto para la toma de decisiones

Siguiendo el nuevo esquema de control en modo automático descrito en la sección anterior, una secuencia de diferentes procesos es iterativamente ejecutada y un sistema de inferencia difusa (FIS) de tipo Mamdani (Cox, 1992; Mamdani, & Assilian, 1975) se encarga de tomar decisiones durante esta secuencia. El FIS de tipo Mamdani es programado usando Matlab (Mathworks fuzzy, 2015), definiendo las funciones de membresía y creando un set de reglas lingüísticas explícitas del tipo IF-THEN, como se describió en el Capítulo 3. Estas reglas difusas del tipo IF-THEN se han definido en base a la experiencia adquirida operando el TEM del CIC bioGUNE durante múltiples sesiones cryo-TEM; el objetivo final es que el sistema experto contenga el conocimiento de un microscopista experimentado. El FIS de tipo Mamdani interpreta los valores crisp de entrada en forma de vector y, basándose en una evaluación paralela de reglas, asigna los valores del vector de salida, que en este caso sirven para la toma de decisiones en tiempo real durante la sesión automatizada.

4.2.1 Definición de las variables del FIS

El primer paso fue definir todas las variables de entrada y los adjetivos que describen su estado, como se ve en la Tabla 4.1. Antes de ser utilizadas por el FIS las variables de entrada son normalizadas a un rango entre 0 y 1. En el FIS la información fluye desde los ocho parámetros de entrada hasta las seis variables de salida usadas para tomar decisiones.

<i>Parámetros</i>	<i>Variables lingüísticas</i>	<i>Rango</i>
Entradas		
<i>Posición del agujero</i> detectado en la imagen en modo <i>Search</i>	Muy cerca, centrado, muy alejado	0-350
<i>Area del agujero</i> localizado en la imagen en modo <i>Search</i>	Pequeño, medio, grande	0-10000
<i>Grosor del hielo</i> calculado en el agujero de la imagen en modo <i>Search</i> con EELS	Grueso, medio, fino	0-500
<i>Número de partículas de contaminación</i> detectadas en la última imagen adquirida en modo <i>Photo</i> en una zona cercana	Contaminado, medio, buen hielo	0-100
<i>Valor del astigmatismo</i> calculado a partir de la última imagen en modo <i>Photo</i>	Bajo, medio, alto	0-1
<i>Número de partículas válidas</i> , automáticamente detectadas en la última imagen adquirida en modo <i>Photo</i>	Pocas partículas, buena distribución, demasiadas	0-1000
<i>Valor del subenfoque</i> de la última imagen adquirida en modo <i>Photo</i>	Cerca de foco, en el rango foco, lejos de foco	0-10
<i>Valor de intensidad media</i> a partir de la media del valor de cuentas medidas en la última imagen en modo <i>Photo</i>	Oscura, correcto, saturada	0-5000
Salidas		
Resultado de la evaluación del agujero	Malo, regular, bueno	0-1
Corrección del astigmatismo	Correcto, malo, muy malo	0-1
Comando para cambiar de cuadrante	Si, No	0-1
Comando para cambiar el sentido	Si, No	0-1
Comando para el ajuste del subenfoque	No cambiar, incrementar, reducir	0-1
Selección del área dentro del agujero	Cerca del centro, cerca del borde	0-1

Tabla 4.1: Variables lingüísticas difusas y expresiones difusas para el estado de los parámetros de entrada y salida al FIS

Las variables de entrada son las siguientes:

- *La posición de cada agujero detectado* en la imagen en modo *Search*. Para la selección del mejor agujero es necesario conocer en qué coordenadas y distancia con respecto al centro se encuentra cada agujero para poder navegar a lo largo de un cuadrado de la rejilla sin repetir agujeros y siempre tratando de elegir el más cercano. Si no se detectan más agujeros en el sentido de navegación el sistema pasará automáticamente a la siguiente fila de agujeros. La configuración del modo *Focus* hace necesario navegar a lo largo del cuadrado desde una posición inferior a posiciones superiores.
- *El valor del área de cada agujero localizado* en la imagen en modo *Search*. Se seleccionan los agujeros con el área en un rango determinado. El área indica el tipo de hielo en el agujero (si es regular o tiene un gradiente brusco de grosor de hielo) y la presencia o no de grandes partículas de contaminación.
- *Grosor del hielo calculado* en cada agujero en la imagen en modo *Search*. Con una apertura de energía (*slit width*) de ~ 20 eV, la cual es insertada después del filtro de energía omega, es posible realizar una estimación del grosor de hielo en función de la intensidad media detectada en cada agujero. El pico “zero-loss” del filtro omega se centra en la apertura de 20 eV trabajando a una magnificación final en el modo *Photo* (entre $30000\times$ y $60000\times$ aumentos). Por el contrario en la magnificación del modo *Search* ($4000\times$) el “zero-loss” no está centrado en la apertura sino en el plasmón, luego la intensidad que se genera en la imagen del modo *Search* es invertida y proporcional a la diferencia entre el pico del plasmón y del “zero-loss”, que a su vez es proporcional al grosor del hielo, luego se puede establecer una relación entre el valor medio de los grises dentro de cada agujero con el grosor de hielo correspondiente de forma experimental.
- *Número de partículas individuales válidas*. Las partículas válidas son automáticamente detectadas en cada imagen adquirida en el modo *Photo*, usando el nuevo método basado en modelos ANFIS que se describió en la sección 4.4 de esta tesis y cuya aplicación se mostrará en el Capítulo 5.
- *Número de partículas de contaminación* detectadas en la última imagen adquirida en modo *Photo*. El método basado en modelos ANFIS también se

4. NUEVO ESQUEMA DE CONTROL INTELIGENTE PARA CRYO-TEM

configura para detectar partículas de contaminación en cada imagen adquirida en el modo *Photo*. Las partículas de contaminación normalmente corresponden a cristales de agua. Es posible que en la rejilla existan algunos cuadrantes o regiones dentro de un cuadrante donde hay más partículas de contaminación, luego hay que intentar evitarlas. En el caso de detectarse un exceso de contaminación el sistema experto cambia de zona hasta detectar que el nivel de contaminación sea aceptable. Las imágenes con muchas partículas de contaminación se guardan únicamente para evitar volver por las mismas. Si no se encuentran regiones sin contaminación la secuencia en modo automático termina.

- El *valor del astigmatismo* calculado a partir de la última imagen adquirida en modo *Photo*. El análisis de la función de transferencia del contraste de fase o CTF se consigue gracias a *ACE toolbox* (Mallick, 2005), que nos ofrece el valor del subenfoco, el valor del astigmatismo y un parámetro de precisión del resultado del algoritmo.
- De la misma forma se calcula el *valor del subenfoco* de la última imagen adquirida en modo *Photo*. En una rejilla de cryo-TEM es habitual tener diferentes regiones o cuadrantes de la rejilla con diferente altura, luego cada una de ellas tendrá un valor de *Z* eucéntrico diferente que es necesario calcular. Normalmente en los agujeros próximos entre sí en un mismo cuadrante el valor del subenfoco suele ser similar.
- *Intensidad media* calculada a partir de la media del valor de cuentas medidas en la última imagen adquirida en modo *Photo*.

Las variables de salida utilizadas para la toma de decisiones son como sigue,

- *Variable para la selección del agujero*. Cada agujero detectado en la imagen del modo *Search* tendrá asociado un valor *crisp* de esta variable y el sistema de control seleccionará el agujero con un valor máximo de esta variable. Normalmente se elige el agujero más cercano al centro de la imagen (el centro de la imagen corresponde a la región de interés del modo *Photo*) y en el sentido de navegación correspondiente. El agujero más cercano podría no ser adecuado por un mal grosor de hielo, por la rotura del carbón en ese área, por la presencia de contaminación, etc.

- *Comando para el ajuste del subenfoco.* Cuando el valor del subenfoco está fuera del rango, normalmente entre $-1.0\ \mu\text{m} \leq \text{sub-enfoco} \leq -4.0\ \mu\text{m}$ se ejecuta una función que utiliza imágenes adquiridas en el modo *Focus* y el análisis de la CTF hecho por ACE toolbox para modificar el valor de OL y ajustar el valor de enfoque dentro del rango.
- *Comando para la corrección del astigmatismo.* En caso de detectar astigmatismo en las imágenes finales se ejecuta una función que gracias al análisis de la CTF de ACE toolbox y un proceso iterativo que modifica el valor de las lentes de corrección del astigmatismo (*stigmators*).
- *Comando para cambiar el sentido de navegación.* Cuando no se detecten agujeros en el sentido de navegación es necesario moverse a la fila superior de agujeros y cambiar el sentido de navegación.
- *Comando para cambiar de cuadrante en la rejilla.* Si tras la búsqueda de un agujero adecuado en un cuadrante se agotan las filas de agujeros y no se encuentra ninguno, el sistema de control cambiará de cuadrante. El sistema de control mantiene un registro de memoria de todas las variables medidas por el FIS y usadas durante una sesión cryo-TEM, de forma que pueda decidir cambiar de cuadrante o incluso terminar la sesión en caso de no encontrar buenas zonas en los últimos n agujeros.
- *Comando para la selección del área dentro del agujero.* En caso de no detectar partículas válidas en el centro del agujero el sistema de control selecciona el borde del agujero en busca de una buena distribución de partículas válidas. Esto es debido a que en algunos casos el centro del agujero tiene un grosor de hielo demasiado fino como para poder contener ciertas muestra biológicas (grandes ensamblados macromoleculares como pueden ser los virus icosaédricos) y es necesario centrarse en las zonas cerca del borde, con un grosor de hielo mayor.

4.2.2 Registro de información durante una sesión supervisada por el sistema experto

Dependiendo del tipo de muestra biológica a estudiar es necesario buscar un grosor de hielo y un rango de subenfocos adecuados. Durante una sesión en modo automático el

El sistema de control es capaz de establecer una relación entre el grosor del hielo (valor medio de la intensidad de los agujeros segmentados en las imágenes adquiridas en el modo *Search*), el área del agujero, el subenfoco, el valor medio de cuentas en la imagen final y el número de partículas automáticamente detectadas. El sistema de control va guardando las imágenes validadas y genera una matriz dinámica con los valores correspondientes al número de partículas válidas, partículas de contaminación de hielo, grosor del hielo, subenfoco y astigmatismo calculados con el análisis de la CTF, promedio de cuentas en las imágenes finales y finalmente, área de los agujeros. Esta matriz dinámica será el registro de información durante una sesión en modo automático. Una vez que se tiene suficiente información en la matriz dinámica de la sesión inicial, esta puede utilizarse posteriormente tanto para seleccionar de forma más eficiente los agujeros como para ajustar el rango del subenfoco, esencial para una correcta identificación de las partículas.

4.2.3 Definición de las funciones de membresía y reglas

El siguiente paso es definir las sentencias IF-THEN y las funciones de membresía. Para fusificar las variables de entrada y poder usar la lógica difusa se utilizan funciones de membresía Gaussiana, con forma de campana, forma de Π y forma triangular para describir el set difuso, (ver figura 4.8). Para planificar el funcionamiento del FIS un set de 19 reglas lingüísticas IF-THEN fueron programadas utilizando la experiencia previa con el microscopio. Diferentes sesiones rutinarias cryo-TEM con el microscopio del CIC bioGUNE en modo automático ayudaron a diseñar y refinar las funciones de membresía y las reglas.

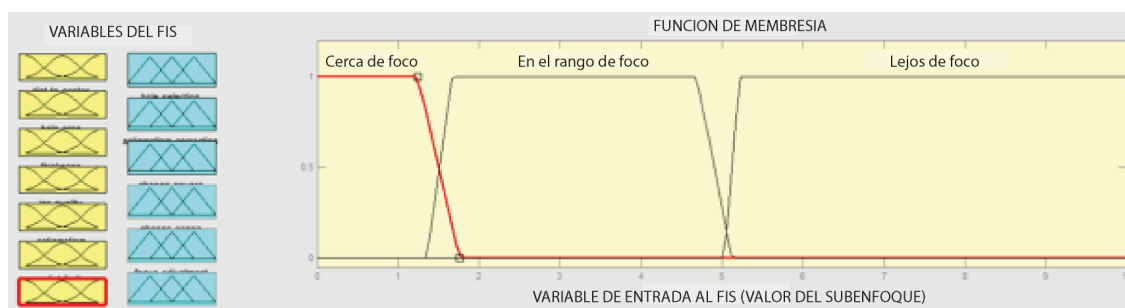


Figura 4.8: Ejemplo del modo gráfico para la programación en Matlab de las funciones de membresía del FIS

4.2.4 Lista de toma de decisiones

Las salidas crisp del FIS son utilizadas por el esquema de control para elegir la mejor estrategia y solucionar los problemas habituales que suelen surgir durante una sesión rutinaria de cryo-TEM. El sistema de control basado en FIS toma las siguientes decisiones durante una sesión cryo-TEM en modo automático:

- El esquema de control automático elige el siguiente agujero a irradiar y puede adquirir la imagen final tanto en el centro como en el borde del agujero, dependiendo de la distribución de las partículas individuales válidas detectadas.
- Se usa un valor mayor de subenfoco tanto en áreas con mayor grosor de hielo como en áreas donde inicialmente no se detectan partículas. Por el contrario, trabaja cerca de foco en áreas con hielo más fino si las partículas individuales válidas son claramente detectadas.
- Si el programa detecta un exceso de partículas de contaminación de hielo o el grosor del hielo no es el adecuado (demasiado fino o demasiado grueso) en un cuadrante de la rejilla, se moverá a otro cuadrante.
- En cuanto un valor alto de astigmatismo es detectado en las imágenes finales en modo “*Photo*”, el sistema de control ejecuta una rutina para corregir el astigmatismo. El software ACE toolbox genera un valor del ángulo de la elipse del astigmatismo que se utiliza para poder corregirlo más fácilmente.

Una de las características más importante del TEM del CIC bioGUNE es la posibilidad de poder usar una apertura (*energy slit*) centrada en el “*zero-loss*” del espectro de energía, pero debido a cambios de posición de la apertura con el tiempo, es necesario centrar la posición del espectro en la apertura cada ~15 minutos. Si el programa detecta la presencia de una sombra en la imagen final en modo *Photo*, se ejecutará una rutina para ajustar la abertura situada después del filtro de energía en el pico del “*zero-loss*”.

4.2.5 Salidas del esquema de control

Las salidas del esquema de control serán las imágenes digitales (en modo “*Photo*”) en formato MRC (Crowther et al., 1996), automáticamente validadas (i.e., valor de subenfoco en el rango adecuado, valor de astigmatismo bajo, sin deriva, sin contaminación y

con una buena distribución de partículas individuales válidas), junto con los correspondientes ficheros de coordenadas que localizan el centro de masas de cada una de las partículas individuales automáticamente detectadas en cada imagen. El formato de los ficheros de coordenadas será el mismo formato utilizado por el software Xmipp (Marabini et al., 1996). Estas coordenadas son automáticamente calculadas en tiempo real gracias al nuevo método neuro-difuso descrito en la siguiente sección de esta tesis.

4.3 Diferentes componentes del TEM a controlar durante una sesión en modo automático

En el Capítulo 1 se describieron los diferentes componentes que forman parte del TEM. La posición de las aperturas, las lentes para el control de la iluminación y las lentes de alineamiento deben ser preconfiguradas en cada uno de los modos de trabajo de mínima dosis antes de cada sesión. Además es necesario prefijar el tiempo de exposición utilizado en la cámara de adquisición de imágenes y es conveniente realizar una precalibración de su referencia de ganancia antes de cada sesión.

En esta sección se describen los diferentes módulos utilizados para controlar los componentes del TEM que necesitan ser ajustados constantemente durante una sesión en modo automático, es decir el goniómetro y el filtro de energía en columna. La lente que necesita ser ajustada constantemente durante una sesión cryo-TEM en modo automático es la OL y en ocasiones también las lentes correctoras del astigmatismo.

4.3.1 Control del goniómetro para mover la rejilla a lo largo del haz de electrones fijo

El usuario controla el desplazamiento del goniómetro a través de un *trackball*, un juego de botones o por software. La mecánica de los motores paso a paso, que componen la parte móvil del goniómetro, tienen un cierto juego en su engranaje (conocido como *backlash*), lo que implica que los movimientos son solamente precisos en un rango entre 300-500 nm. Por lo tanto, si se requiere un movimiento preciso es necesario refinar iterativamente la posición. Además, una vez que el porta-muestras integrado en el goniómetro se para en una nueva posición, la muestra sufre deriva durante algún tiempo debi-

do a la masa inercial. Esta deriva limita la resolución alcanzable en una imagen por TEM, por lo que es necesario esperar un tiempo hasta que el porta-muestras se ha asentado y la deriva está por debajo de un cierto umbral (e.g., 1 \AA s^{-1}). Dependiendo del tipo de goniómetro y la distancia recorrida, esta pausa necesaria puede durar hasta varios minutos. Un dispositivo piezoeléctrico permite ajustes precisos de movimiento en el rango de $\pm 0.2 \mu\text{m}$ utilizado en magnificaciones altas de trabajo.

4.3.2 Control automático del subenfoque y astigmatismo

El subenfoque y la forma de la CTF son evaluadas automáticamente utilizando una versión modificada del paquete de software *Automated CTF Estimation (ACE) Toolbox* (Mallick et al., 2004). El programa es modificado para ajustarlo a la configuración de nuestro TEM (fuente de 200kV y una aberración esférica de $C_s=2 \text{ mm}$) y a la magnificación de trabajo de $50000\times$ (que genera imágenes a un tamaño de pixel de 2 \AA/pixel). ACE utiliza un método basado en difractogramas para determinar el subenfoque y el astigmatismo. El algoritmo identifica los anillos Thon en la densidad espectral de potencia (PSD) y los usa para estimar los valores de astigmatismo y subenfoque, junto con los valores de incertidumbre, ver figura 4.9.

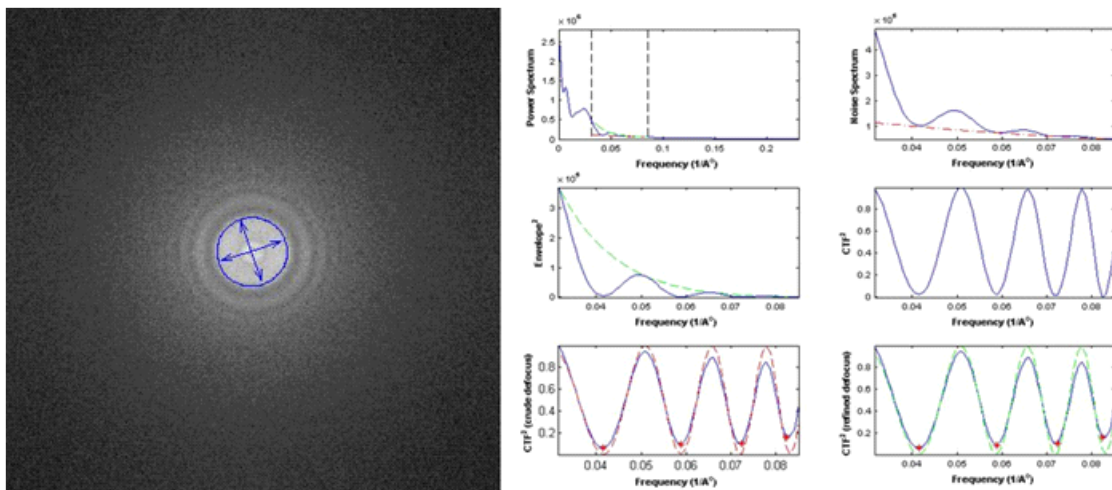


Figura 4.9: Información de salida del algoritmo que estima los parámetros de la CTF gracias a *ACE toolbox* en Matlab

El programa para el análisis de la CTF basado en ACE utiliza las siguientes entradas: la imagen a alta magnificación (del modo *Photo*) en formato MRC, el tamaño real del pixel en \AA/pixel a esa magnificación, el valor de la aberración esférica de nuestro

microscopio $C_s=2\text{ mm}$, el tipo de medio (*ice* para una sesión cryo-TEM) y un factor de potencia (normalmente igual a 0.3 para imágenes cryo-TEM). Este programa devuelve un vector de parámetros resultado del análisis de la CTF: subenfoque, contraste de amplitud, ratio de astigmatismo, ángulo del astigmatismo, parámetros de ruido, parámetros de la envolvente y un valor de incertidumbre (*confidence in results*). Tres de estos valores (el valor del subenfoque, el ratio de astigmatismo y el valor de confianza en el resultado) son entradas al modelo FIS de tipo Mamdani para tomar la decisión de lanzar las rutinas de corrección del subenfoque y/o astigmatismo.

El sistema experto mantendrá el valor del subenfoque de las imágenes en un rango entre $-1\ \mu\text{m}$ y $-3\ \mu\text{m}$. Para ello se ha programado una rutina que utiliza las imágenes adquiridas en modo *Focus* (en zonas de carbón) para calcular y ajustar de forma automática el subenfoque durante una sesión cryo-TEM en modo automático. De la misma forma si el sistema experto detecta un valor inadecuado de astigmatismo, lanzará una rutina que emplea las lentes deflectoras de corrección del astigmatismo, utilizando el ángulo del astigmatismo calculado por ACE toolbox para ayudar en la corrección del mismo.

Estimación de los valores de astigmatismo con ACE toolbox

A continuación se describirá brevemente el cálculo automático del desenfoque y el astigmatismo por parte del software *ACE toolbox*, dado que es uno de los procesos clave para el control de calidad de las imágenes y para poder corregir automáticamente la CTF en un esquema de reconstrucción 3D automático. Para realizar esto una vez adquirida la imagen se realiza la transformada de Fourier, de forma que la formación de imagen en un TEM en el espacio de frecuencias-espaciales y en coordenadas polares se puede aproximar con la siguiente ecuación de la forma,

$$\mathcal{F}\{I(\vec{r})\} = \mathcal{F}\{\Phi(\vec{r})\} \cdot A(s, \theta) \cdot E(s, \theta) \cdot \sin(\gamma(s, \theta)) + N(s, \theta) \quad (4.3.1)$$

donde $s = \sqrt{s_x^2 + s_y^2}$ y $\theta = \arctan(s_y/s_x)$, donde la fase es dada por,

$$\gamma(s, \theta) = 2\pi \left(\frac{-C_s \lambda^3 s^4}{4} + \frac{z(\theta) \lambda s^2}{2} \right) \quad (4.3.2)$$

donde λ es la longitud de onda del haz de electrones en el microscopio, C_s es la aberración esférica de OL y z es el desenfoque (siempre se utiliza negativo para la forma-

ción de imagen, luego es subenfoco). En la presencia de astigmatismo el desenfoque dependiente de θ se puede describir por la siguiente ecuación,

$$z(\theta) = \frac{z_2 + z_1}{2} + \frac{z_2 - z_1}{2} \sin(2(\theta - \phi)) \quad (4.3.3)$$

donde z_1 y z_2 son el valor de desenfoque mínimo y máximo respectivamente. ϕ es el ángulo entre el eje mayor de la elipse formada por los anillos Thon en la CTF y el eje x. Como se explicó en el Capítulo 2 la función de envolvente es el resultado de diferentes fenómenos como son la dispersión de energía del haz, la inestabilidad de la corriente en las lentes, la deriva de la muestra, etc, y se puede aproximar de una forma empírica de la forma,

$$E(s) = e^{-(k_1 + k_2 \sqrt{s} + k_3 s + k_4 s^2)} \quad (4.3.4)$$

Además una forma paramétrica empírica que describe el espectro de ruido aditivo está descrito por,

$$N^2(s) = e^{-(n_1 + n_2 \sqrt{s} + n_3 s + n_4 s^2)} \quad (4.3.5)$$

ACE toolbox reduce el problema del análisis de la CTF de cada imagen al cálculo de los siguientes 12 parámetros; el desenfoque z_2 , el ratio entre los ejes mayor y menor de los anillos Thon elípticos, el contraste de amplitud C_a , el ángulo de astigmatismo ϕ , los 4 parámetros de la función de envolvente $[k_1, k_2, k_3, k_4]$ y los 4 parámetros de la función ruido $[n_1, n_2, n_3, n_4]$. Para el cálculo de los parámetros de astigmatismo se realiza el análisis de los espectros de potencia (transformada de Fourier) de cada imagen experimental utilizando un algoritmo de detección de bordes Canny descrito en el Capítulo 3. En este algoritmo los bordes se definen como puntos de máximos locales de la magnitud del gradiente (por encima de un umbral dado) a lo largo de la dirección del gradiente. Después los bordes detectados en los anillos Thon experimentales de los espectros de potencia se ajustan (utilizando el algoritmo RANSAC) a una elipse teórica descrita por la siguiente forma paramétrica,

$$ax^2 + bxy + cy^2 = 1 \quad (4.3.6)$$

Los parámetros de astigmatismo (r, ϕ) pueden ser calculados a partir de los parámetros a, b y c de la elipse teórica ajustada a la forma de la CTF experimental.

$$l_1 = \frac{a+c}{2} - \frac{1}{2} \sqrt{(a-c)^2 + b^2} \quad (4.3.7)$$

$$l_2 = \frac{a+c}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{(a-c)^2 + b^2} \quad (4.3.8)$$

$$\phi = \arctan \left(\frac{2(l_2 - a)}{b} \right) \quad (4.3.9)$$

$$r = \sqrt{\frac{l_1}{l_2}} \quad (4.3.10)$$

4.3.3 Control del filtro de energía

Formación de imágenes “zero-loss”

En un análisis por TEM el grosor de la muestra y su densidad es un factor limitante debido a la fuerte interacción de los electrones con la muestra. Cuando los electrones pasan a través de una muestra, interactúan con los átomos que están siendo dispersados elástica o inelásticamente. La dispersión elástica es el principal mecanismo para formar el contraste de fase en un TEM debido a que los electrones elásticamente dispersados exhibirán un desplazamiento de fase débil y tendrán la misma energía que los electrones no dispersados. Esta diferencia de fase es el origen de la formación de imagen por contraste de fase en un TEM. Cuando un haz de electrones incide sobre una muestra más gruesa se produce un mayor número de dispersiones múltiples e inelásticas (*plasmon scattering*), lo que contribuye a la ionización de la muestra (daño por radiación) (Glaeser & Downing, 1992) y limita el contraste en las imágenes adquiridas. Los electrones inelásticamente dispersados tienen pérdida de energía cinética y contribuyen a emborronar la imagen final, dado que están fuera de foco y contribuyen al desenfoque cromático (producido por la aberración cromática). Sin embargo pueden ser filtrados después de la interacción con la muestra usando un filtro de energía para evitar que contribuyan a la formación de imagen en el detector.

Como se explicó en el Capítulo 1 el filtro de energía integrado en la columna de nuestro TEM y con forma de Omega permite filtrar los electrones inelásticamente dispersados (con pérdida de energía) y los elimina del proceso de formación de imagen en la CCD. Esto permite generar imágenes sin pérdida de energía (*zero-energy-loss images*) que

ofrecen mejor contraste y menor ruido con respecto a las no filtradas. Para realizar el filtrado de energía de cero pérdidas se posiciona el pico del espectro correspondiente a una pérdida de energía de valor cero (*zero-loss peak*) en el centro de una apertura (*energy slit*) situada justo después del filtro de energía con un ancho predeterminado en eV (*slit width*). Esta apertura tiene un rango de energía variable y para conseguir un buen filtrado se suele ajustar el ancho de la apertura del filtro de energía a un valor entre 10-20 eV (electrón voltios), de forma que los electrones que queden fuera de este ancho de apertura son eliminados en la formación de imagen en el detector.

Ajuste automático de la posición de la apertura del filtro de energía

Mientras que las lentes del filtro de energía son bastante estables en el tiempo, la posición de la apertura (*slit*), que hace la función de selector de energía, puede variar y tiene que ser re-alineada periódicamente. Además la posición del pico *zero-loss* está directamente relacionado con la estabilidad del sistema de alta tensión del TEM. Pequeños cambios en el voltaje de los electrones resultará en un ligero movimiento del pico *zero-loss*. Un movimiento adicional puede ser causado por un cambio grande de foco, luego durante una sesión con el TEM es necesario reajustar la posición del slit para centrarla en el *zero-loss* del espectro de energía después de un cambio de foco mayor a $\sim 5 \mu\text{m}$.

Cuando la posición del pico de pérdida de energía-cero (*zero-loss peak*) está descentrado de la apertura del filtro de energía se produce una sombra oscura en el centro o en los laterales de las imágenes. Para evitar de forma automática estas sombras no deseadas en las imágenes finales se ha desarrollado una rutina muy sencilla que ajusta la posición del *zero-loss peak* midiendo la intensidad media en la imagen en modo *Photo*, mientras se modifica la posición de la apertura (*slit offset*) hasta centrarla en el *zero-loss peak*. El objetivo es maximizar este valor medio de intensidad. Esta rutina se ejecuta cada 30 minutos; también es llamada por el sistema experto si detecta una sombra oscura en el centro de las imágenes o una pérdida de intensidad media en las imágenes finales en modo *Photo*, ver figura 4.10.

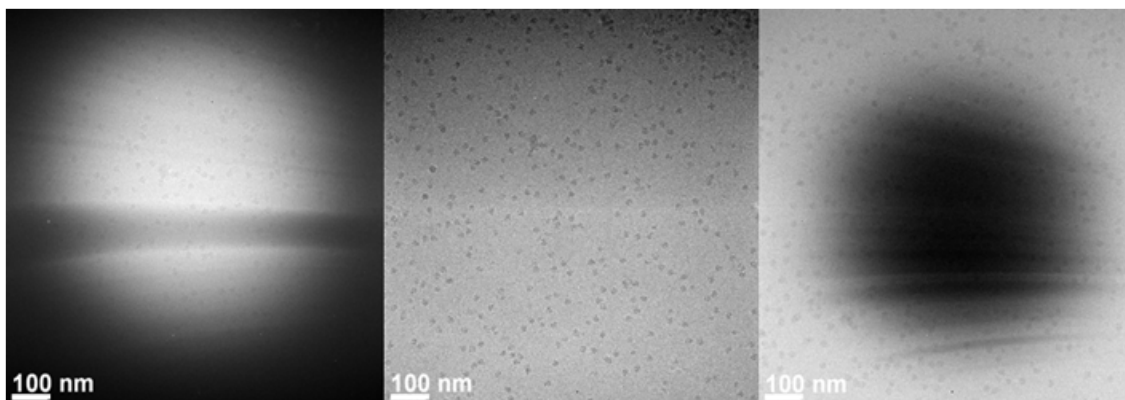


Figura 4.10: Apariencia de la sombra producida por un desplazamiento del pico *zero-loss* fuera del centro de la apertura (*slit*) del filtro de energía. La imagen central corresponde a una imagen cryo-TEM en modo *Photo* con la apertura (*slit*) del filtro de energía correctamente centrada en el pico *zero-loss* del espectro de energía

Estimación del grosor del hielo utilizando el filtro de energía

Un filtro de energía separa los electrones de acuerdo a su energía cinética y genera un espectro de pérdida de energía de los electrones transmitidos a través de la muestra en el TEM. El espectro muestra la intensidad dispersada como función de la disminución de la energía cinética de los electrones. La espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS) por tanto se basa en analizar la distribución de energía de electrones inicialmente mono-energéticos, después de que éstos interaccionan con una muestra.

Cuando los electrones atraviesan un material interaccionan con los átomos constituyentes a través de fuerzas electrostáticas (de Coulomb). Como resultado de estas fuerzas algunos electrones son dispersados cambiando la dirección de su momento (dispersión elástica) y en algunos casos transfieren una cantidad apreciable de energía a la muestra (dispersión inelástica). La dispersión elástica implica interacción de Coulomb con un núcleo atómico y con un intercambio de energía despreciable. La dispersión inelástica ocurre como resultado de una interacción de Coulomb entre los electrones del haz incidente y los electrones atómicos que rodean cada núcleo. Algunos procesos inelásticos se pueden interpretar según la teoría de bandas de energía como una excitación de un electrón atómico aislado a un nivel de energía mayor. Los picos de ionización en unos valores específicos en eV del espectro de energía se producen porque los electrones atómicos en una cierta capa interna de energía (*inner-shell*) necesitan una cantidad de energía cuantizada, igual a su energía de unión original. El resultado de esta transferencia de

energía cuantizada es un átomo en un estado ionizado (o altamente excitado), que en el caso de componentes orgánicos producen una ruptura permanente de los enlaces químicos, descrita como *daño por radiación* (ionización).

Existe otro modo de interacción de energía que involucra muchos átomos del sólido. Este fenómeno colectivo es conocido como resonancia de plasma u oscilación de la densidad de los electrones de valencia (el cual se encuentra en la última capa de energía del átomo llamada capa de valencia, que es la que determina las propiedades químicas del átomo) y toma la forma de una onda longitudinal. Esta excitación puede ser descrita por la formación de una pseudopartícula conocido como plasmón, cuya energía está dada por $E_p = \hbar \omega_p$ donde \hbar es la constante de Planck y ω_p es la frecuencia del plasmón (en radianes por segundo), el cual es proporcional a la raíz cuadrada de la densidad de los electrones de valencia. Para la mayoría de materiales E_p está en el rango de 5-30 eV. En un espectro de energía el primer pico elástico o *zero-loss* (ZLP) representa a los electrones que son transmitidos sin sufrir ninguna pérdida de energía medible. La dispersión inelástica de los electrones de la capa de valencia (*outer-shell*) es visible en forma de pico en la región entre 5-50 eV del espectro de energía, y es conocido como pico de plasmón. A mayores pérdidas de energía, la intensidad de los electrones disminuye rápidamente de forma que es conveniente utilizar una escala logarítmica para representar el espectro de pérdida de energía. En esta curva de intensidad descendente se encuentran superpuestos los picos de ionización que representan la excitación de capas internas y se encuentra en coordenadas de pérdida de energía iguales a la energía de unión de las correspondientes capas atómicas internas.

Existe una forma muy sencilla de medir el grosor de la muestra dentro de una región irradiada por un haz incidente de electrones utilizando el espectro de pérdida de energía generado por un filtro de energía (Egerton & Cheng, 1987). El grosor t se mide a partir de una sencilla integración (ver figura 4.11) que compara el área de intensidad I_0 bajo el pico *zero-loss* con el área total I_t bajo todo el espectro completo de la forma,

$$\frac{t}{\lambda} = \log_e \left(\frac{I_t}{I_0} \right) \quad (4.3.11)$$

donde λ es el camino libre medio (MFP) de plasmón o total para todas las dispersiones inelásticas.

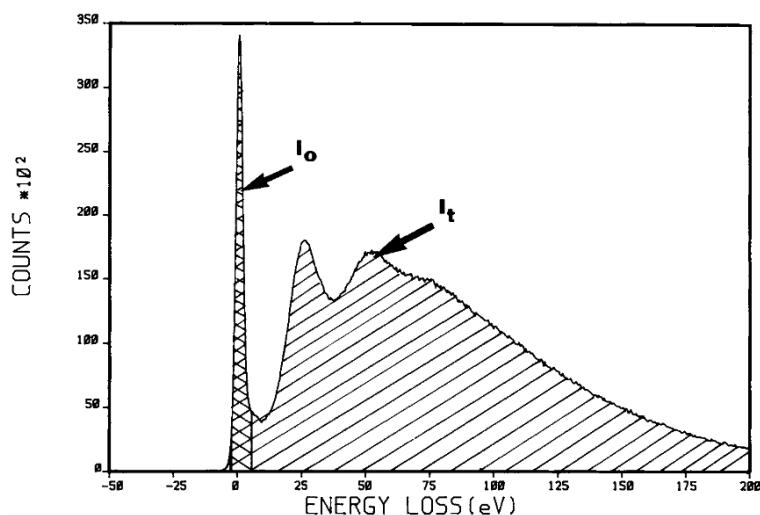


Figura 4.11: Imagen que muestra las integrales y energías involucradas en medir el grosor de la muestra utilizando el método *log-ratio*

Cuando se trabaja con el TEM en mínima dosis y se adquiere una imagen en *Search mode* la apertura se encuentra centrada en el pico del plasmón cuya intensidad integrada está relacionada con el grosor de la muestra de la forma,

$$I_n = (1/n!) (t/L)^n \exp(-t/L) \quad I_t = (1/n!) (t/L)^n I_0 \quad (4.3.12)$$

donde L es el camino libre medio (MFP) del plasmón, t es el grosor de la muestra, I_t es la integral de la intensidad total del espectro, incluyendo el componente *zero-loss* I_0 . Esta expresión está relacionada con la probabilidad P_n de n eventos de pérdida de plasmón en una muestra de grosor t siguiendo la estadística de Poisson (Egerton, 2009). Esto permite crear una relación aproximada entre el valor medio de la intensidad dentro de cada agujero situado en las imágenes en *Search mode* y el grosor del hielo dentro del mismo.

4.4 Nuevo sistema de identificación de partículas

Como se vio en la sección 2.5.1 muchas veces es inevitable tener heterogeneidad en las muestras. También suele ser inevitable la presencia de partículas de contaminación en algunas regiones de una rejilla vitrificada. En esta tesis se presenta una herramienta que incluye el conocimiento de un experto seleccionando partículas en experimentos de cryo-EM y que puede ser entrenada para mejorar su eficiencia gracias al uso de imágenes de referencia cuidadosamente seleccionadas. Este método permite identificar el tipo de

partícula en imágenes cryo-TEM con cualquier tipo de muestras, incluso con muestras heterogéneas. La ventaja de este método frente a otros basados en cross-correlación es su capacidad de identificar en tiempo real el tipo de partícula presente en las imágenes cryo-TEM. Esto permite obtener información en tiempo real sobre la distribución de las partículas válidas y conocer la calidad del hielo, calculando el número de partículas de contaminación en cada una de las imágenes cryo-TEM. Esta información puede ser utilizada por el sistema experto para tomar decisiones y cambiar la estrategia de adquisición de forma conveniente como se ha explicado anteriormente.

Para crear esta herramienta de identificación no-supervisada de partículas se utiliza un método neuro-difuso, el cual puede ser entrenado para trabajar con cualquier tipo de muestras, incluso con muestras heterogéneas como se demostrará en el Capítulo 5. La idea principal es obtener una metodología híbrida que combine algoritmos de procesamiento de imagen utilizados en visión artificial (Parker, 1997) y un esquema de inferencia difusa adaptativa (ANFIS) basada en redes neuronales (Azeem et al. 2000; Jang, 1993) que permite imitar el modo de trabajo de un investigador experto en cryo-TEM. La combinación de esta herramienta junto con el sistema experto descrito anteriormente convierte al esquema de control en más inteligente y permite mejorar los resultados de la adquisición de datos cryo-TEM en modo automático, tomando decisiones en tiempo real y pudiendo adaptar el esquema de control para optimizarlo con cualquier tipo de muestra.

Comparado con otros esquemas de control adaptativos (Amundarain et al., 2011; Garriido et al., 2012) las técnicas de aprendizaje neuro-difuso proporcionan un método para el modelado difuso del control y tiene capacidad de aprender de la información de un set de datos de referencia. En esta sección se presenta este nuevo método basado en diferentes algoritmos de procesamiento de imagen y modelos ANFIS para identificar y seleccionar en tiempo real las partículas individuales válidas en cada imagen cryo-TEM, evitando las partículas incompletas, los agregados y las partículas de contaminación. También se calcula el número de partículas de contaminación por imagen y esta información será utilizada por el modelo FIS de tipo Mamdani para que el sistema de control tome las decisiones oportunas en tiempo real durante una sesión en modo automático. El método general para la identificación de objetos en una imagen se basa en la secuencia de los siguientes pasos, normalmente utilizados en proyectos de investigación en

ciencia de materiales (Hernández et al., 2004; Johnsrud et al., 2013; Papa et al., 2013; Yang & Ahuja, 2014; Zapata et al., 2011), y sigue el esquema que puede verse en la figura 4.12.

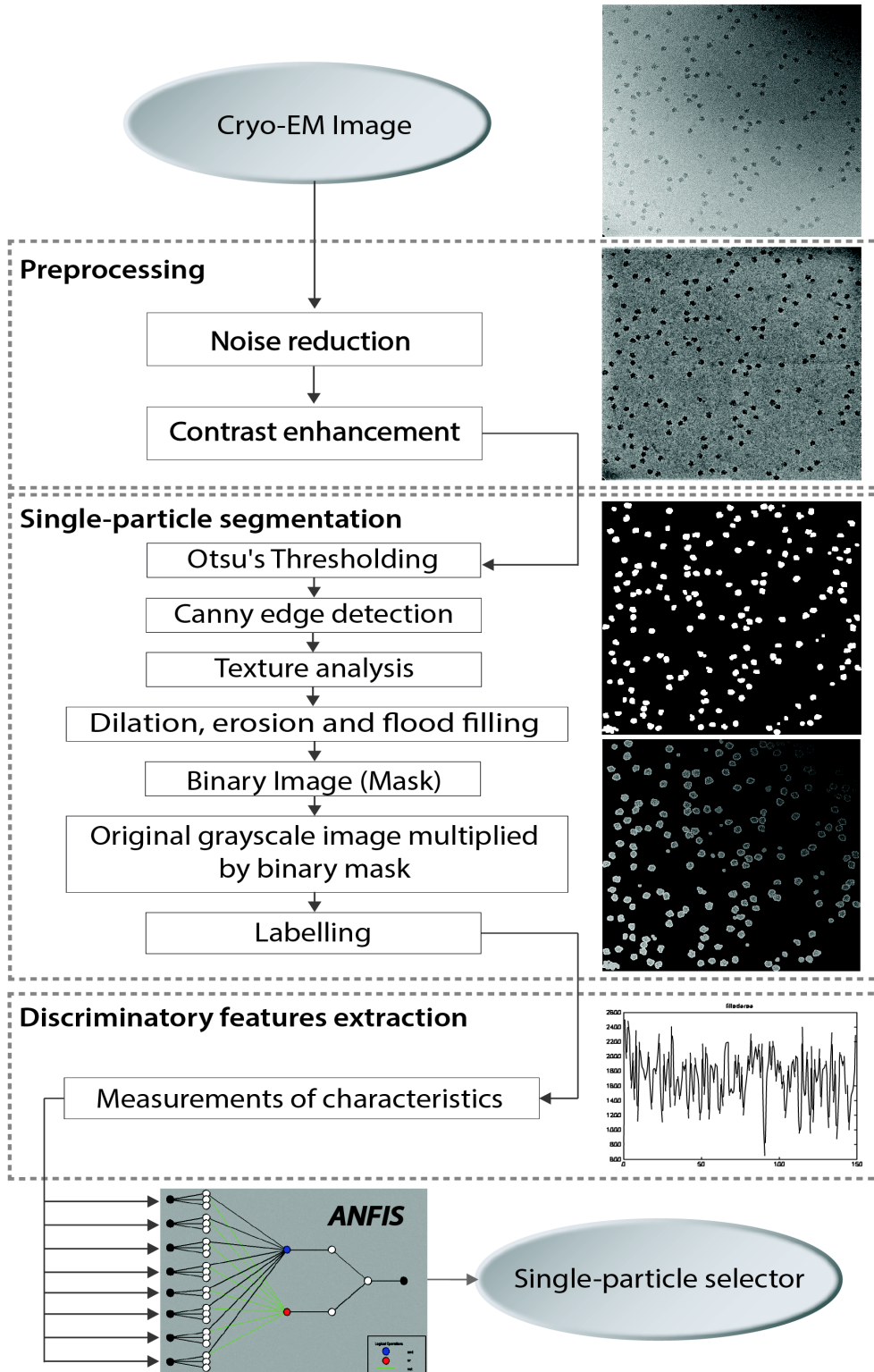


Figura 4.12: Procedimiento para la detección e identificación automática de partículas

4.4.1 Preprocesamiento de imagen

Con el objetivo principal de resaltar las regiones de la imagen correspondientes a las partículas individuales y hacerlas más aparentes frente al fondo (*background*, que corresponde a la proyección del hielo amorfo del buffer), se utiliza una combinación de filtros y se ajusta el histograma. Para *reducir el ruido* y suavizar las imágenes de cryo-TEM se combinan un filtro lineal adaptativo (filtro de Wiener) con un kernel de 7×7 (Lim, 1990; Parker, 1997), con un filtro no-lineal de mediana (Huang et al., 1997) y un filtro paso-bajo Gaussiano con un kernel de 5×5 . Para *mejorar el contraste* se realiza un proceso de normalización por expansión del histograma (o aumento del rango dinámico) más una ecualización adaptativa del histograma con contraste limitado (CLAHE) (Zuiderveld, 1994). CLAHE es útil para potenciar los detalles de una imagen y mejorar el contraste tanto general como local. Todos estos algoritmos de procesamiento de imagen han sido detallados en el Capítulo 3.

4.4.2 Segmentación de la imagen

El segundo paso en el proceso de identificación de objetos es la segmentación, que incluye la conversión de las imágenes originales en escala de gris a imágenes binarias y la extracción de las áreas de interés (áreas correspondientes a las partículas individuales frente al fondo que corresponde al hielo amorfo). Para optimizar el proceso de segmentación de partículas ruidosas en el que algunas partículas están al nivel del ruido se combinan tres tipos diferentes de procesos de segmentación:

- El *método del valor umbral* utiliza el histograma de la escala de grises de la imagen y un método de optimización conocido como método de *Otsu* (Otsu, 1979), para obtener automáticamente un valor umbral t adecuado, a partir del cual se “binariza” la imagen (convirtiendo una imagen en escala de grises a una imagen binaria); es decir se construyen dos segmentos: el fondo de la imagen (valor 0) y los objetos buscados (valor 1). Como se vio en el Capítulo 3 el método Otsu utiliza técnicas estadísticas y calcula la varianza (medida de la dispersión de los niveles de gris) para calcular este valor umbral t óptimo. Siguiendo este método uno de los segmentos tiene un valor medio de grises igual a

$$\mu_0 = \sum_{i=1}^t x_i p_i \text{ y probabilidad } w_0 = \sum_{i=1}^t p_i \quad (4.4.1)$$

mientras que la otra parte tiene un valor medio de gris igual a,

$$\mu_1 = \sum_{i=t+1}^n x_i p_i \text{ y probabilidad } w_1 = \sum_{i=t+1}^n p_i \quad (4.4.2)$$

El valor de umbral óptimo t (*threshold*) se calcula automáticamente minimizando la varianza intra-clase, definida como una suma ponderada de varianzas de las dos clases, calculada de la forma:

$$\sigma^2(t) = w_0(\mu_0 - \mu)^2 + w_1(\mu_1 - \mu)^2 = \frac{(\mu w(t) - \mu(t))^2}{w(t)(1-w(t))} \quad (4.4.3)$$

donde, $\mu_0 = \frac{\mu(t)}{w(t)}$ y $w_0 = w(t)$ tal que $\mu_1 = \frac{\mu - \mu(t)}{1-w(t)}$ y $w_1 = 1-w(t)$.

La imagen final es muy sencilla de calcular ya que para cada pixel solo hay que realizar una comparación numérica entre su nivel de gris g con el valor umbral t (*threshold*) y su regla de cálculo es como sigue,

$$T_{global}(g) = \begin{cases} 0 & \text{si } g < t \\ 1 & \text{si } g \geq t \end{cases} \quad (4.4.4)$$

- El *método de detección de bordes mediante el algoritmo de Canny*, que utiliza el cálculo de variaciones para localizar las discontinuidades en los niveles de gris de la imagen (Canny, 1986). Este algoritmo ayuda a evitar los objetos binarios generados por ruido o artefactos producidos en el proceso de binarización por umbral.
- Finalmente, los resultados anteriores se combinan con un proceso de *segmentación por textura* (Gonzalez et al., 2003), que mide el valor de entropía del vecindario, de forma que se consigue mejorar la eficiencia del proceso de segmentación total.

Durante el proceso de segmentación es necesario utilizar *operaciones morfológicas* como la *erosión* (Soille, 1999) para eliminar regiones demasiado pequeñas producidas

por el ruido, seguida por la *dilatación* combinada con un *algoritmo de relleno (flood-fill)* para ajustar el tamaño y la forma de los objetos segmentados de forma que se parezcan lo más posible al tamaño y forma de las partículas individuales de la imagen original. La imagen binaria resultante de todo el proceso se utiliza como máscara para ser multiplicada por la imagen en escala de grises original, de forma que se produce una versión enmascarada de la original, ver la fila inferior de la figura 4.13.

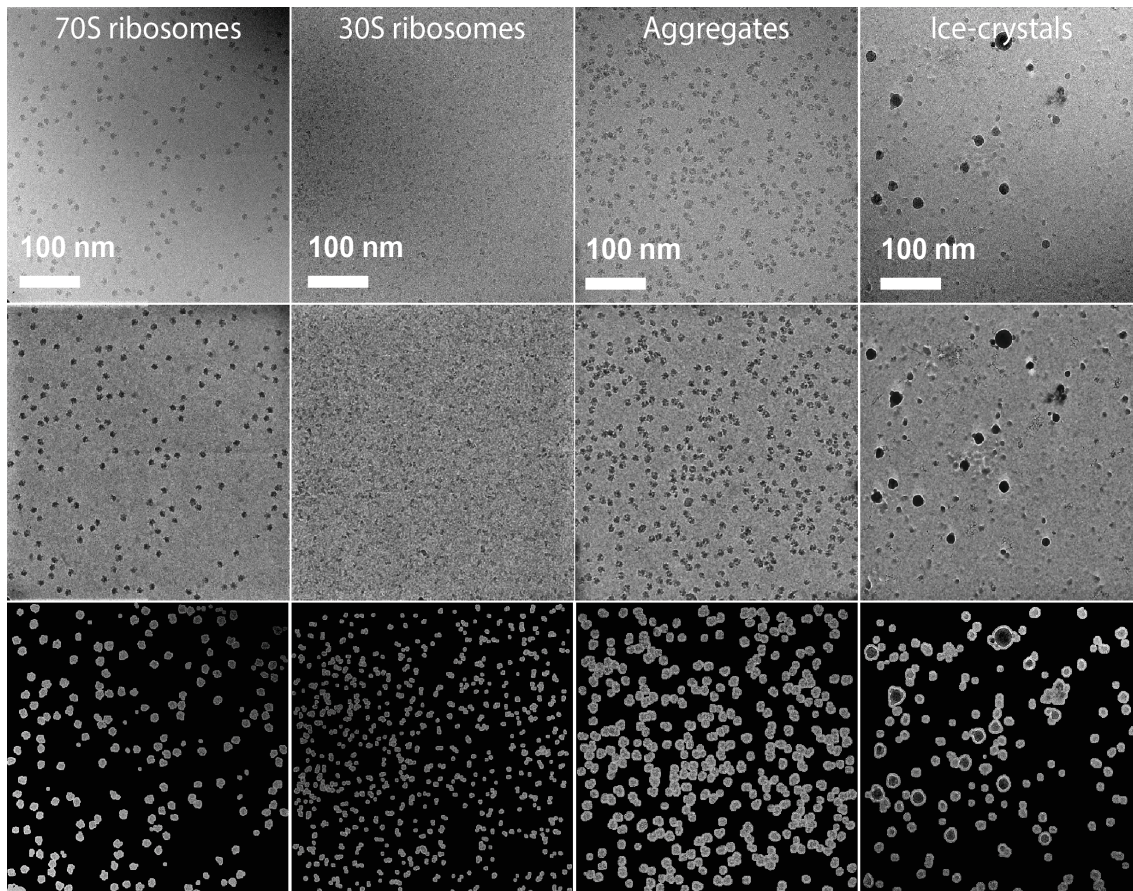


Figura 4.13: Ejemplo representativo del proceso de segmentación de partículas individuales de diferentes poblaciones de ribosomas (ribosomas bacterianos 70S, subunidades de ribosomas, agregados de ribosomas) y partículas de contaminación de hielo

En la fila superior de la figura 4.13 se muestran algunas imágenes originales cryo-TEM correspondientes a diferentes conformaciones de ribosomas bacterianos y contaminaciones de hielo. En la fila central se muestra el resultado del proceso de preprocesamiento de imagen y en la fila inferior se muestra el resultado de la multiplicación de una imagen binaria (resultado del proceso de segmentación) por la imagen en escala de grises original.

4.4.3 Optimización del proceso de segmentación

Cada parámetro modificable en cada algoritmo descrito del esquema completo de segmentación, incluyendo la etapa preliminar de preprocesamiento, fueron ajustados y optimizados de forma manual (prueba y error) para detectar correctamente las partículas individuales correspondientes a una población homogénea de interés. El objetivo final es conseguir que el proceso de segmentación genere objetos binarios con forma y área parecidos a las partículas originales.

Para poder generalizar el uso del esquema de segmentación a cualquier tipo de muestra con macromoléculas biológicas de diferentes tamaños (desde complejos proteicos con un peso molecular de 300 kDa hasta virus icosaédricos con un peso de 150 MDa), es necesario utilizar algún proceso de optimización que ajuste cada uno de los parámetros variables del proceso de segmentación, de forma lo más automática y eficiente posible. En esta tesis se ha utilizado un algoritmo conocido como *Búsqueda Tabú*. El objetivo principal de este algoritmo de optimización es ajustar los diferentes parámetros del proceso de segmentación, de modo que la forma de los objetos generados en la imagen binaria sean lo más parecido posible a las proyecciones 2D de la muestra homogénea en estudio. Como ejemplo, se verá en el Capítulo 5 cómo para optimizar los parámetros del proceso con el objetivo de estudiar la muestra de ribosomas bacterianos 70S se utilizaron simplemente 3 de las mejores imágenes de referencia (conteniendo proyecciones 2D de ribosomas 70S), donde se conoce el valor promedio y la desviación estándar del área de las proyecciones 2D de los ribosomas 70S y el número de partículas detectadas en cada imagen. La Búsqueda Tabú tiene como objetivo principal conseguir el valor más óptimo posible sin quedar atrapado en mínimos locales y ajusta los siguientes parámetros:

- Variables utilizadas en el proceso de segmentación por umbral: *umbral t* (threshold, previamente optimizado por el método *Otsu*) y la *cte_background* (utilizada en el proceso de normalización del *background*).
- Variable utilizada en el proceso de detección de bordes usando el algoritmo de Canny: *constante de Canny*.

- Variables utilizadas en las operaciones morfológicas: *noise_cte* (incluido en el proceso de limpieza de pequeños objetos en la imagen binaria), *las constantes de dilatación y erosión*.

La figura 4.13 muestra el resultado de la segmentación optimizada para el estudio de ribosomas 70S por cryo-TEM. Una vez optimizado el algoritmo para la muestra de interés se utilizan los mismos parámetros para el resto de poblaciones que pueden convivir en la misma muestra (e.g. subunidades, agregados, partículas de contaminación de hielo, etc).

4.4.4 Medición de las características discriminatorias de los objetos

En la tercera etapa del proceso de identificación se etiquetan los objetos detectados en las imágenes enmascaradas (imágenes originales en escala de grises multiplicadas por la máscara binaria resultado del proceso de segmentación), como se pueden ver en la fila inferior de la figura 4.13, y se realiza un análisis de *blobs* para *medir las características* de los mismos. Se etiquetan cada uno de los *blobs* detectados en la imagen enmascarada, donde los blobs son componentes conectados donde los píxeles tienen valor distinto de cero, y los píxeles con valor cero forman el fondo (*background*). Para la extracción de características de estos objetos etiquetados se tienen en cuenta diferentes medidas morfológicas y medidas de intensidad del nivel de gris. De entre las propiedades medibles en cada *blob* de la imagen en escala de gris y que proporcionan medidas de la forma y características de intensidad (valor de los píxeles) de los *blobs*, en este proyecto se han utilizado nueve, las cuales son capaces de describir el tamaño, la morfología, el contraste de la escala de grises y el estado de agregación (figura 4.14) :

- *Área del objeto* que especifica el número real de píxeles en la región.
- *Gray extent*. Calcula el ratio de píxeles en la región del objeto con respecto a los píxeles totales del rectángulo más pequeño que contiene la región (*boundingBox*).

$$Gray\ extent = \frac{Area}{Area\ of\ the\ boundingBox} \quad (4.4.5)$$

4. NUEVO ESQUEMA DE CONTROL INTELIGENTE PARA CRYO-TEM

- *Gray solidity*. Calcula la proporción de píxeles del polígono convexo más pequeño que puede contener la región (*convexHull*) y que también están en la región del objeto.

$$Gray\ solidity = \frac{Area}{Area\ of\ the\ convexHull} \quad (4.4.6)$$

- *Eccentricity*. Mide la excentricidad (ε *épsilon*) de la elipse que mejor se ajusta a la región del objeto. La excentricidad es el ratio de la distancia entre los focos de una elipse y la longitud de su eje mayor. En una elipse el valor está entre 0 y 1, $0 \leq \varepsilon \leq 1$. Una elipse cuya excentricidad es 0 es un círculo, mientras que si la excentricidad es 1 es una parábola. Si la ecuación cartesiana de una elipse tiene la forma,

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = 1 \quad (4.4.7)$$

el valor de excentricidad (ε *épsilon*) es igual a

$$\varepsilon = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}} \quad (4.4.8)$$

- *Major axis length*. Mide la longitud (en píxeles) del eje mayor de la elipse que mejor se ajuste a la región del objeto; *Minor axis length*: mide la longitud (en píxeles) del eje menor de la elipse que mejor se ajuste a la región del objeto.
- *Pixel value contrast*. Calcula el contraste restando el valor del pixel con mayor intensidad menos el valor de intensidad más baja de la región.
- *Distance with neighbouring particles*. Se mide la distancia euclídea entre los centros de masas de uno de los objetos con el resto de objetos detectados.

$$d_E(P_1, P_2) = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \quad (4.4.9)$$

- *Location (centroid, coordenadas X e Y)*. Se especifica el centro de masas de la región del objeto, siendo el primer elemento la coordenada horizontal (o coordenada x) y el segundo elemento es la coordenada vertical (o coordenada y).

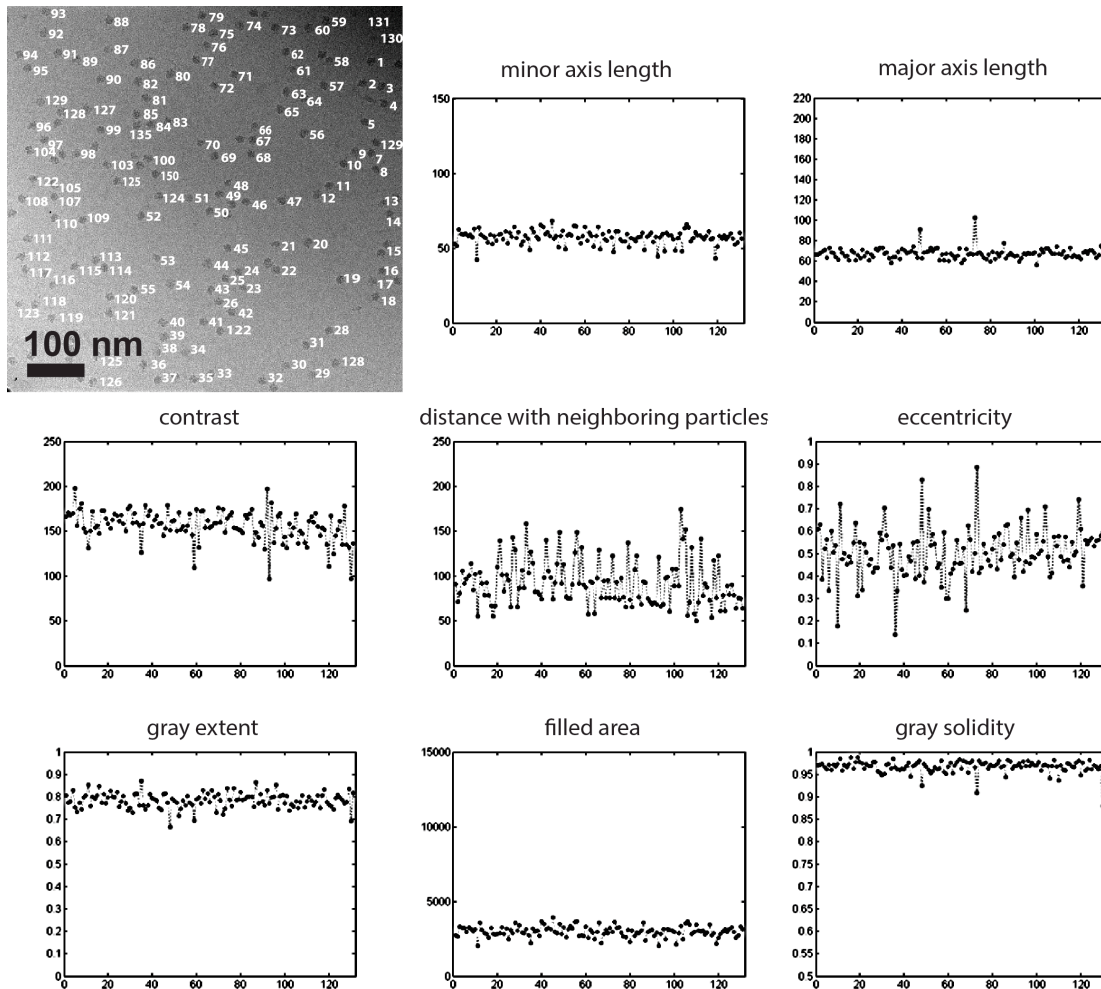


Figura 4.14: Ejemplo de 8 características discriminativas medidas a partir de una sola imagen cryo-EM conteniendo 320 partículas de ribosomas bacterianos 70S

Utilizando un set de imágenes de referencia como ésta se genera una matriz con el número de filas igual al número total de partículas detectadas en estas imágenes de referencia (donde todas las partículas corresponden al mismo complejo macromolecular), y 8 columnas que contienen el valor medido de cada una de las características discriminativas de cada objeto obtenido después del proceso de segmentación.

Las ocho características discriminativas forman el patrón de entrada para los diferentes sistemas adaptativos de inferencia neuro-difusa (ANFIS) que forman parte del nuevo sistema de identificación de partículas individuales para imágenes cryo-TEM. La novena característica es la variable *Location* y es utilizado para generar el fichero de coordenadas que localiza la posición de cada una de las partículas individuales detectadas en cada imagen cryo-TEM. El conjunto de las ocho características discriminativas produ-

cen una huella que caracteriza los diferentes tipos de objetos presentes en las imágenes cryo-TEM y permiten distinguir entre partículas completas válidas, subunidades, agregados y partículas de contaminación.

4.4.5 Modelo ANFIS para la identificación del tipo de partícula

Como se verá en el Capítulo 5 el sistema de identificación de partículas está compuesto por tantos modelos ANFIS como diferentes tipos de partículas resulten de interés en las imágenes cryo-TEM con una muestra purificada. Cada modelo ANFIS será diseñado y entrenado previamente para la identificación de un único tipo de partícula y la salida de cada modelo ANFIS será un valor *crisp* en un rango entre $\{-1 < p < 1\}$, que indica el valor de probabilidad de pertenecer al tipo de partícula asociado a ese modelo ANFIS.

Como se explicó en detalle en el Capítulo 3 un modelo ANFIS combina la teoría de lógica difusa y de redes neuronales artificiales (ANN); por un lado los sistemas de lógica difusa son buenos integrando el conocimiento de un investigador en cryo-EM, por otro, las redes neuronales ofrecen las capacidades de aprendizaje, adaptabilidad, tolerancia a fallos, paralelismo y generalización. Para diseñar cualquiera de los diferentes modelos ANFIS que forman el sistema de identificación es necesario realizar los siguientes pasos:

- El primer paso es definir un sistema de inferencia difuso inicial de tipo Sugeno (Takagi, & Sugeno, 1985; Sugeno, & Kang, 1988) basándonos en nuestra experiencia como expertos seleccionando partículas en imágenes para cryo-EM. En este diseño 6 de las entradas tienen asociadas 3 funciones de membresía y las otras 2 entradas tienen 2 funciones de membresía. Para las funciones de membresía se utilizan funciones Gaussianas y con forma de *S*. Cuanto mejor sea el modelo FIS de tipo Sugeno inicial, más fácil y eficiente será el ajuste de los parámetros del modelo ANFIS para llegar a la convergencia en el proceso de entrenamiento. Luego el diseño de las funciones de membresía y la buena elección de la lógica en las reglas es fundamental en este paso.

- El segundo paso es crear una matriz de datos que contenga las características discriminatorias de partículas del mismo tipo, segmentadas a partir de imágenes cryo-TEM de referencia cuidadosamente seleccionadas. Este matriz se divide en dos partes: el 80% se utilizará para el entrenamiento del FIS del tipo Sugeno, previamente diseñado. El 20% de esta matriz se utilizará para el proceso de generalización, chequeando el funcionamiento del modelo entrenado. Por ejemplo, para entrenar un modelo ANFIS destinado a detectar partículas de ribosomas 70S es necesario utilizar las características medidas a partir de un set de imágenes cryo-TEM de referencia. Si este set de datos se utiliza para entrenar el ANFIS que identifica partículas de ribosomas 70S se añade una novena columna con valores +1. De la misma forma hay que incluir las características del resto de clases. Es decir, las características medidas a partir de imágenes que contienen agregados, subunidades y partículas de contaminación. Esta vez el valor del vector en la novena columna tendrá valor negativo igual a -1. Esta matriz resultante conteniendo los pares de datos entrada/salida (con la salida tanto +1 como -1) permite completar los procesos de entrenamiento y chequeo del modelo ANFIS diseñado para identificar las partículas de ribosomas 70S, descartando el resto de poblaciones (agregados, subunidades y contaminación). La matriz de datos entrada/salida para entrenar en modelo ANFIS que identifica los ribosomas 70S se puede esquematizar de la forma,

$$\text{Datos de entrenamiento } 70S = \begin{array}{|l} \text{Discriminatory Features } 70S & +1 \\ \text{Discriminatory features (otros)} & -1 \end{array} \quad (4.3.10)$$

- El último paso incluye los procesos de entrenamiento y chequeo del modelo ANFIS, usando el set de datos entrada/salida creado a partir de las imágenes cryo-TEM de referencia. Esto creará un ANFIS más preciso y eficiente que el FIS de tipo Sugeno inicial. Gracias a la propiedad de red neuronal del modelo ANFIS, en el proceso de entrenamiento los parámetros de las funciones de membresía se ajustan automáticamente, de forma que permitan al modelo seguir mejor los datos de referencia entrada-salida. Por tanto, el objetivo del proceso de aprendizaje es actualizar los parámetros de las funciones de membresía de los modelos FIS de tipo Sugeno, previamente programados, de forma que el modelo ANFIS emule el set de datos usado en el entrenamiento. Como método de

4. NUEVO ESQUEMA DE CONTROL INTELIGENTE PARA CRYO-TEM

optimización de los parámetros de la estructura del modelo ANFIS, se elige un método híbrido para el proceso de aprendizaje que consiste de un método de descenso de gradiente por retropropagación (BPGD) más una estimación de mínimos cuadrados (LS) que hace converger la estructura cuando llega a un valor de error mínimo. El proceso de chequeo con datos de validación es necesario para probar la capacidad de generalización del ANFIS resultante. En la figura 4.15 se muestra la arquitectura del modelo ANFIS final, donde la entrada está formada por las 8 características discriminatorias extraídas de los objetos detectados después del proceso de segmentación.

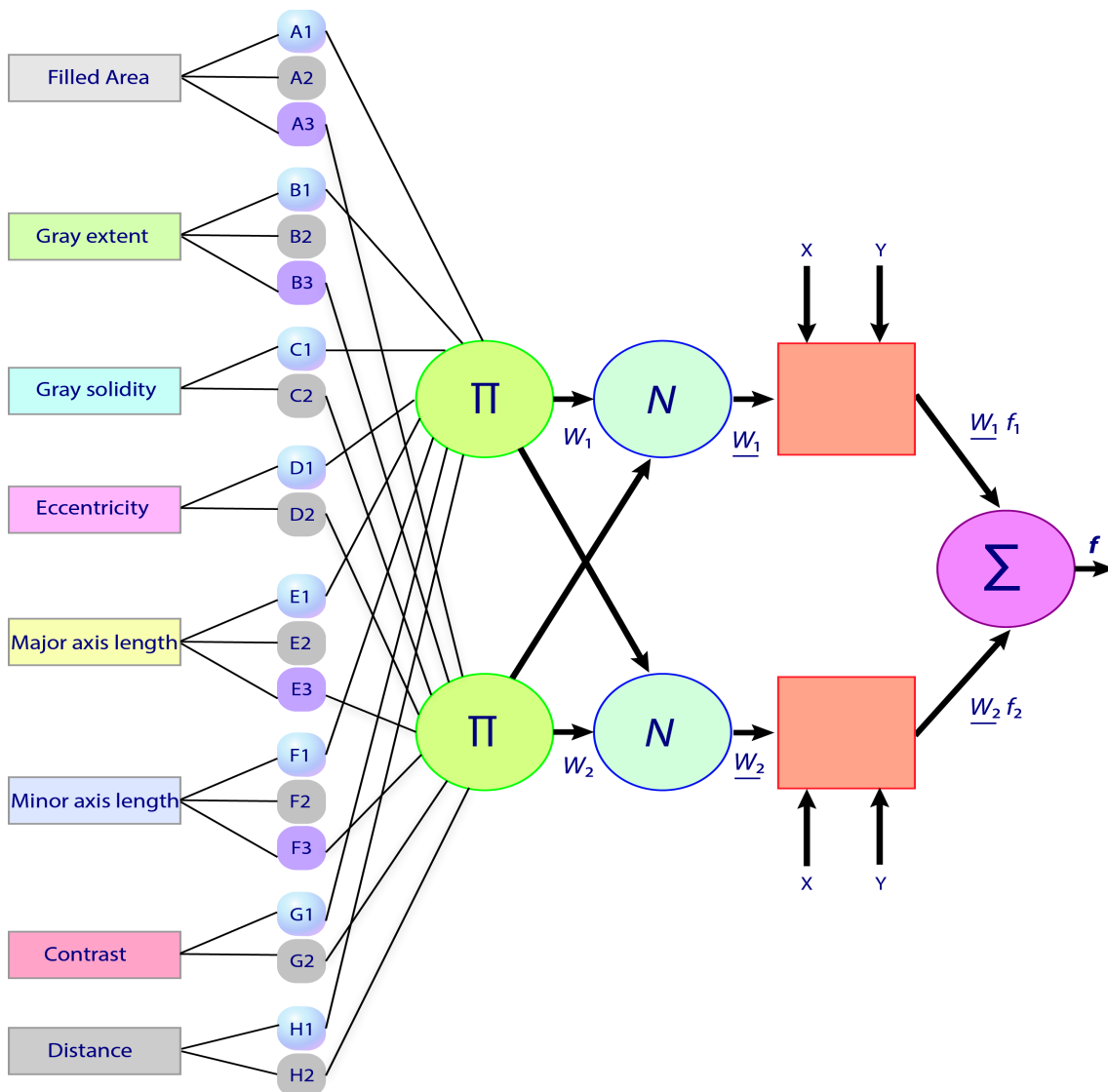


Figura 4.15: Arquitectura general de un modelo ANFIS que forma parte del sistema de identificación de partículas en imágenes para cryo-EM

Capítulo 5

Resultados experimentales

En este capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos con el nuevo esquema de control completo diseñado para la automatización de sesiones cryo-TEM en la plataforma de Microscopia de CIC bioGUNE. El objetivo ha sido crear un esquema automático de todo el proceso de reconstrucción 3D de complejos macromoleculares. El funcionamiento de cada uno de los diferentes módulos que forman el nuevo esquema de control ha sido validado como explicaremos a continuación. Las conclusiones obtenidas a partir de estos resultados serán descritas posteriormente en el Capítulo 6.

5.1. Resultados experimentales del nuevo esquema de control inteligente

Para la validación y chequeo del funcionamiento real del nuevo esquema de control inteligente se han utilizado rejillas vitrificadas de ribosomas 70S. De esta forma, se han optimizado manualmente las diferentes funciones de membresía del modelo FIS, que toma decisiones en tiempo real; también se ha comprobado el funcionamiento real del sistema de identificación de partículas basado en modelos ANFIS e integrado en el esquema de control. Durante este proceso se ha podido mejorar el funcionamiento de los diferentes módulos que facilitan la resolución de las diferentes dificultades encontradas durante una sesión automática de cryo-TEM.

El sistema tiene que funcionar de un modo similar a como lo haría un experto de forma manual. En la figura 5.1 se muestra una secuencia de imágenes donde se puede ver el

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

modo de trabajo del modo automático. La secuencia puede ser visualizada por el usuario en remoto y éste puede conocer en todo momento la posición del haz de electrones en la rejilla, la distribución de partículas y la calidad del hielo (grosor del hielo y número de cristales de hielo) en esa zona y el análisis de la CTF. El usuario puede cambiar a modo manual en cualquier momento, continuando con la sesión en modo manual o eligiendo nuevos cuadrantes en la rejilla para continuar con el modo automático.

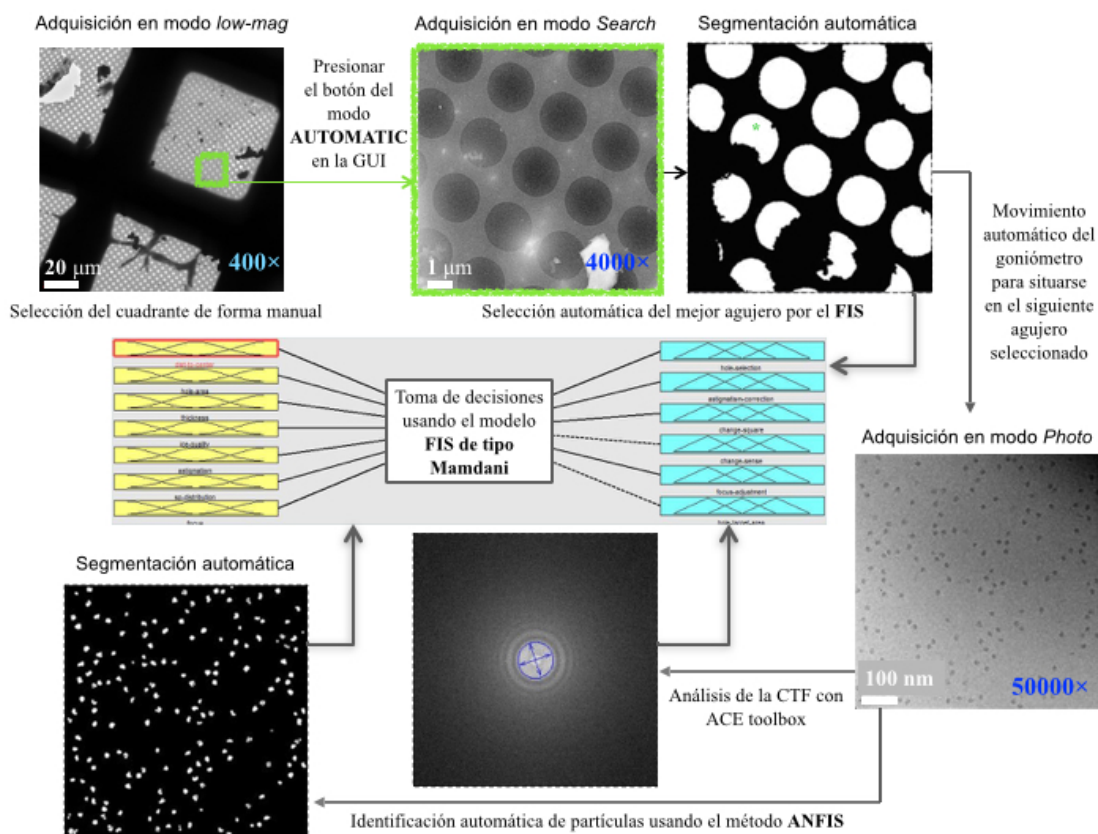


Figura 5.1: Secuencia de imágenes representando el modo de trabajo en automático del nuevo esquema de control inteligente

Volver al modo automático solamente supone hacer clic en un botón, lo cual ofrece una mayor flexibilidad de trabajo en comparación a los métodos basados en *atlas*, es decir, un mapa de toda la rejilla. Este tipo de aproximación, en la que los agujeros son seleccionados previamente a baja magnificación puede ser problemática debido a que no tiene en cuenta la distribución de la muestra, las zonas de contaminación, las mejores zonas en función del grosor de hielo, rotura de zonas de carbón en caso de utilizar una capa de carbón encima de los agujeros, la necesidad de un reajuste en el rango de subenfoco en función de la muestra u otro tipo de contingencias.

5.1.1. Validación del sistema experto para la toma de decisiones

Durante el proceso de diseño del modelo FIS con matlab se puede validar el funcionamiento de la toma de decisiones en función de la información de entrada. Para ello se emplea el simulador de matlab, el cual permite abarcar un abanico muy amplio de posibilidades.

En matlab la relación entre las entradas y las salidas a un FIS puede ser representada en forma de mapas de superficie para una inspección visual que ayuda en el diseño de las funciones de membresía y en la construcción de las reglas. Por ejemplo en la figura 5.2 se muestra el mapa de entrada-salida, en forma de superficie, resultado de utilizar las entradas (subenfoco y grosor del hielo) y una salida (selección del agujero). La forma de la superficie puede ser modificada ajustando las funciones de membresía y la base de reglas. Las superficies pueden ser más o menos desiguales. Las mesetas horizontales se producen por picos aplanados en los sets de entrada. Una meseta en torno al origen implica una baja sensibilidad a los cambios cerca de los datos de referencia. Esto es una ventaja si la sensibilidad al ruido debe ser baja cuando el proceso está cerca de la referencia.

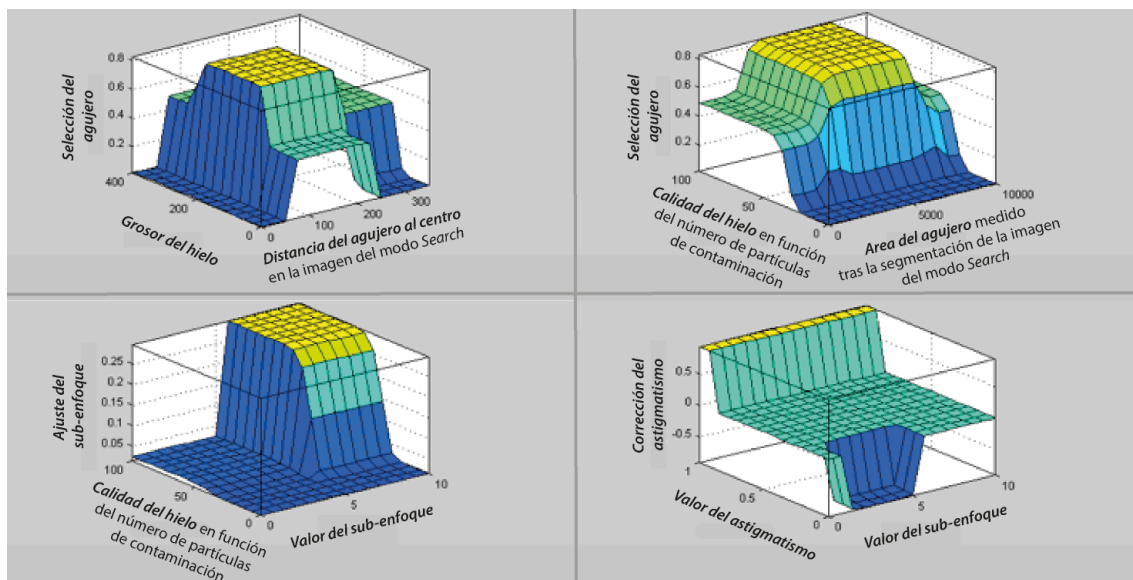


Figura 5.2: Mapas de superficie representando la relación entre algunas entradas y salidas al FIS. Estas representaciones son utilizadas en el proceso de programación del FIS de tipo Mamdani para tomar las decisiones correctas en tiempo real durante el control automático del TEM

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este punto las variables, las funciones de membresía y las reglas del FIS, necesarias para tomar decisiones apropiadas, ya se encuentran completamente definidas. En esta etapa se verifica que que todo se comporta como debe, para lo cual se puede utilizar una herramienta de matlab conocida como *Rule Viewer* que muestra un *roadmap* del proceso de inferencia difusa total, basado en el diagrama de inferencia difusa.

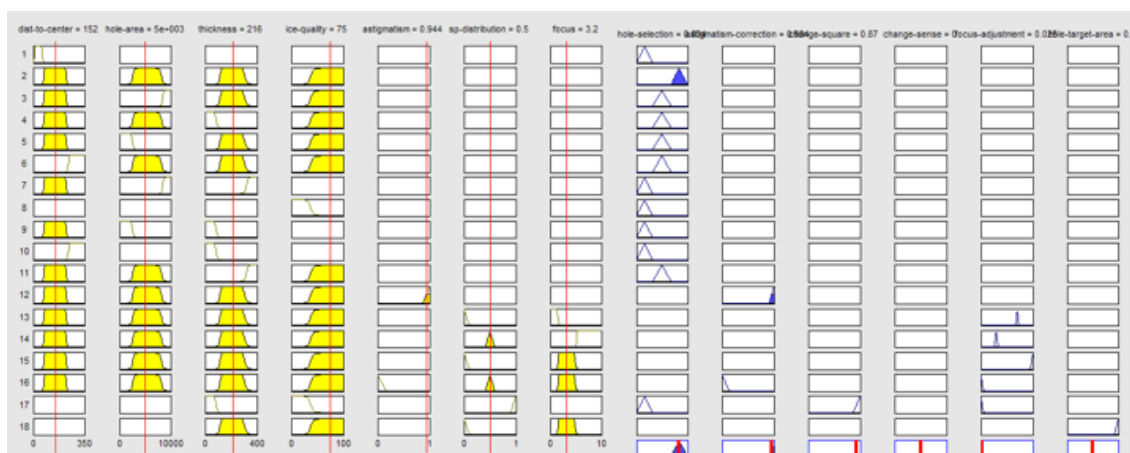


Figura 5.3: Ilustración *roadmap* que permite simular el funcionamiento del proceso de inferencia difusa total para la toma de decisiones

Finalmente las funciones de membresía y reglas del modelo FIS son actualizadas y mejoradas de acuerdo a entradas/salidas reales durante diferentes sesiones cryo-TEM utilizando la muestra de ribosomas bacterianos 70S y nuestro TEM no ideal.

5.1.2. Validación de los diferentes módulos del esquema de control

- La GUI diseñada para la monitorización del proceso y el control remoto con nuestro TEM es usada habitualmente en sesiones de cryo-TEM, y permite conectarse desde cualquier PC con matlab utilizando el interface de JEM toolbox. La experiencia adquirida durante el proceso de validación ha permitido re-diseñarlo y mejorar su facilidad de uso, siendo el resultado final muy similar a la mecánica de trabajo asociada a la utilización de la consolas del TEM. A través de esta GUI se pueden controlar todos los módulos del TEM y las lentes de corrección de astigmatismo, pero no las lentes deflectoras para el alineamiento del haz. El alineamiento del haz a través de la columna del TEM junto con la calibración de la ganancia de la CCD exigen un protocolo muy preciso y se deben

realizar antes de cada sesión para evitar aberraciones innecesarias en el proceso de formación de imagen.

- La navegación automática a través de los agujeros en un cuadrante de una rejilla vitrificada funciona de forma eficiente y solamente son necesarios dos ciclos en el proceso del movimiento del goniómetro para acercarse a la posición del siguiente agujero. Se ha comprobado experimentalmente (empleando para ello la muestra de ribosomas 70S) que lo mejor del nuevo método de navegación automática es la facilidad de uso y su capacidad de intercambiar el modo entre manual y automático simplemente pulsando un botón. El mayor problema de este esquema sin un mapa preliminar de toda la rejilla a baja magnificación es que si en una fila de agujeros existe una contaminación grande encima del agujero no solo se pierde ese agujero sino toda la fila de agujeros. Es por ello que este nuevo esquema de control tiene margen de mejora, quizás combinando la aproximación presentada en este trabajo con un método basado en un mapa del cuadrante a baja magnificación.
- Tras varias sesiones en modo automático se ha comprobado que es de vital importancia realizar correctamente cada uno de las calibraciones preliminares. La subóptima precalibración de la región en el centro de las imágenes del modo Photo y del modo *Search* por ejemplo ha sido causa de una mala navegación de forma recurrente. Como vimos en el capítulo anterior esta precalibración resulta sencilla dado que simplemente es necesario centrar una partícula de contaminación en el centro de las imágenes tanto en modo Photo como en modo *Search*, sin modificar la posición del goniómetro, empleando *beam shift* e *image shift*. Esta precalibración y el resto son muy sencillas pero es importante realizarlas siempre, justo antes de usar el modo automático.
- La experiencia con el módulo para la corrección del foco y el astigmatismo ha resultado positiva siempre que se tenga una buena estimación inicial del valor de Z eucéntrico en cada cuadrante a navegar. El método utilizado es sensible al cálculo de este valor inicial, ya que en caso de obtener imágenes sobre-enfocadas el cálculo de CTF de *ACE toolbox* es incorrecto. En estos casos si al disminuir el valor de OL el resultado es el contrario al esperado es posible recuperar el estado de sub-enfoque, pero al ser un proceso que necesita varios ciclos de adquisición

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

de imágenes en el modo *Focus* resulta lento. Además si estamos en condiciones muy alejadas del plano focal (*in focus plane*), el software automático no es capaz de corregir el sub-enfoque y pararía la adquisición. Por lo tanto, el proceso preliminar de búsqueda de los valores de *Z* eucéntrico en cada cuadrante a navegar, realizado manualmente antes de comenzar a navegar en modo automático, resulta crítico para el buen funcionamiento de este esquema de control.

- El control de la posición del espectro del filtro de energía para centrar el pico “*zero-loss*” en la apertura es sencillo y eficaz, aunque antes de comenzar el modo automático es muy importante centrarlos correctamente. De lo contrario, el módulo de control de la posición del espectro de energía respecto a la apertura (*energy slit*) es incapaz de realizar esta corrección y se para el modo automático.
- En las sesiones realizadas en modo automático en el TEM del CIC bioGUNE se han utilizado rejillas comerciales con agujeros circulares regularmente situados. No obstante, es posible adaptar el esquema de segmentación de las imágenes en modo *Search* a cualquier tipo de rejillas, incluso a rejillas con agujeros irregulares. Esto es debido a que el modo de trabajo propuesto no utiliza un atlas completo de la rejilla sino que toma decisiones en tiempo real. Es por ello que el proceso de segmentación y toma de decisiones se puede adaptar fácilmente a no solo cualquier tipo de rejillas, pero también a diferentes muestras biológicas o modelos de microscopio (siempre y cuando sea controlable desde Matlab).
- Si todos los cuadrantes son perfectos el esquema de control en modo automático solamente necesita la posición de ~10-20 cuadrantes para poder navegar durante más de ~10-12 horas en esta misma rejilla. El nuevo esquema de control tarda unos ~3-4 minutos en adquirir las imágenes finales en agujeros consecutivos, un ritmo de trabajo muy similar al realizado por un usuario experto. Es importante reseñar que no es aconsejable aumentar este ritmo de trabajo dado que el goniómetro necesita ~60-120 segundos para estabilizar las vibraciones mecánicas producidas por el motor del piezo-eléctrico durante el desplazamiento a una nueva posición.

5.2. Resultados experimentales para la identificación del tipo de partícula

La naturaleza y calidad de la muestra estudiada por cryo-EM varía dependiendo del experimento, por lo tanto la propiedad mas importante del método de identificación de partículas en imágenes cryo-TEM debe ser la adaptabilidad. Para demostrar la validez del método e integrarlo en el sistema experto para la toma de decisiones en tiempo real se ha diseñado un sistema de identificación de partículas para seleccionar poblaciones homogéneas de muestras de ribosomas, tanto bacterianos como eucariotas.

5.2.1. Resultados para el estudio de una muestra homogénea

Con el objetivo de desarrollar el sistema de identificación de partículas en imágenes para cryo-EM se utilizó como muestra objetivo de estudio una muestra purificada de ribosomas bacterianos 70S. Para identificar una única población homogénea de partículas, en este caso correspondientes a proyecciones 2D de ribosomas libres 70S se utiliza el sistema de identificación neuro-difuso mostrado en la figura 5.4. La arquitectura de este método automático basado en ANFIS para la identificación de una única población de partículas individuales válidas, consta de dos modelos ANFIS independientes, uno de ellos programado y entrenado para identificar las proyecciones 2D de los ribosomas libres 70S (evitando las sub-unidades, agregados y partículas de contaminación) y el otro dedicado a detectar las partículas de contaminación en cada imagen cryo-TEM analizada. Este sistema automático de identificación de partículas, diseñado para ribosomas 70S, se integra en el esquema de control de la adquisición de datos en modo automático, donde un sistema experto basado en un FIS de tipo Mamdani toma decisiones en tiempo real. Este sistema experto necesita la información de la distribución de partículas válidas y la calidad del hielo definido por el número de partículas de contaminación detectadas en cada imagen.

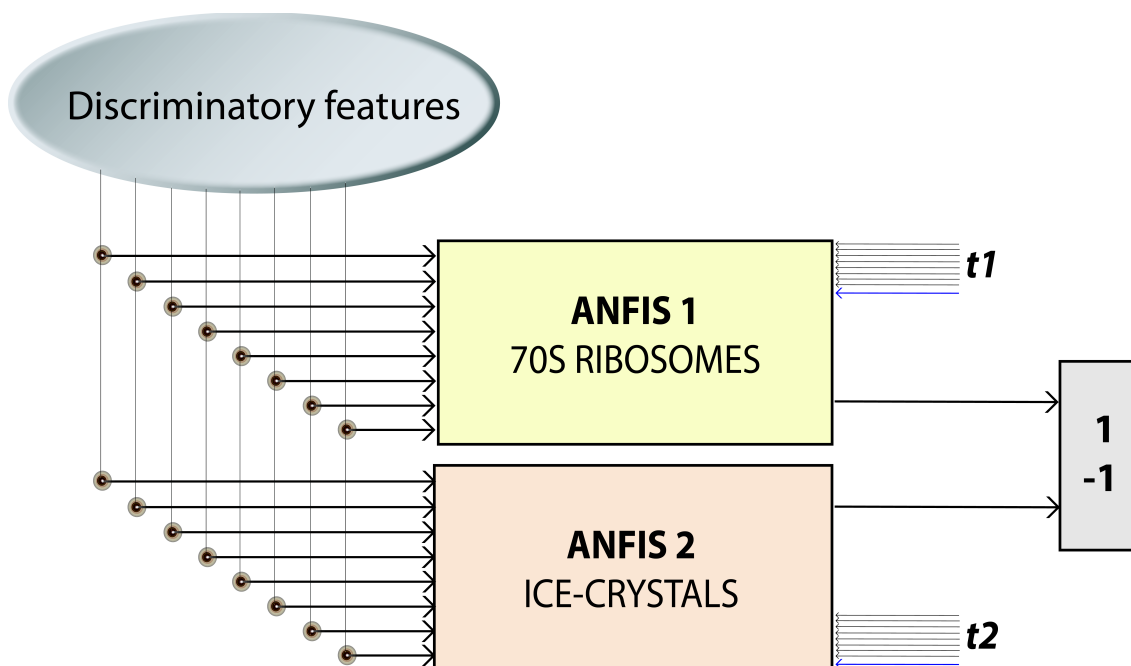


Figura 5.4: Ilustración esquemática de la arquitectura del sistema de identificación automática para una única población homogénea de ribosomas 70S y detección de partículas de contaminación en imágenes cryo-TEM

Como se explicó en el Capítulo 4, para entrenar el modelo ANFIS que identifica las partículas correspondientes a proyecciones 2D de los ribosomas 70S, evitando otras posibles poblaciones no deseadas o contaminaciones, son necesarias imágenes de referencia que contengan una población homogénea de la muestra válida y también imágenes de referencia que contengan una población homogénea de las partículas no válidas. A partir de estas imágenes de referencia se realiza un proceso de segmentación con todas ellas para medir las características discriminatorias que permitan clasificar cada tipo de partícula. Hay que destacar que los parámetros de este proceso de segmentación son automáticamente optimizados para la muestra de mayor interés, en este caso ribosomas 70S, y el resto de poblaciones serán segmentadas utilizando estos mismos parámetros. El proceso de segmentación es optimizado mediante la búsqueda Tabú utilizando tres imágenes cryo-TEM con una población homogénea de 320 proyecciones de ribosomas 70S como las de la figura 4.14.

El primer paso para programar el modelo ANFIS que identifica la población de ribosomas 70S fue crear el sistema de inferencia de tipo Sugeno con 8 entradas difusas, correspondientes a la fusificación, mediante funciones de membresía configuradas

manualmente, de 8 características discriminatorias de las partículas segmentadas y una salida crisp cuyo valor está en el rango $\{-1; +1\}$. Este valor nos indica un índice de probabilidad de ser o no una proyección 2D de ribosomas 70S. Para las variables de entrada, se eligen funciones de membresía de forma Gaussiana y forma de S (sigmoide). Para las variables *filled area*, *gray extent*, *minor axis length* y *major axis length* se utilizan 3 Gaussianas por cada una de ellas; para las variables *solidity*, *eccentricity* y *contrast* se utilizan 2 Gaussianas por cada una. Para la variable *distance with neighboring particles* se utilizan 2 funciones de membresía en forma de sigmoide. En la figura 5.5 se muestra la distribución de las funciones de membresía para cada una de las entradas, ajustadas ayudándonos del sistema de simulación de reglas de la toolbox de matlab y utilizando la experiencia en la detección de diferentes sets de imágenes cryo-TEM conteniendo ribosomas 70S.

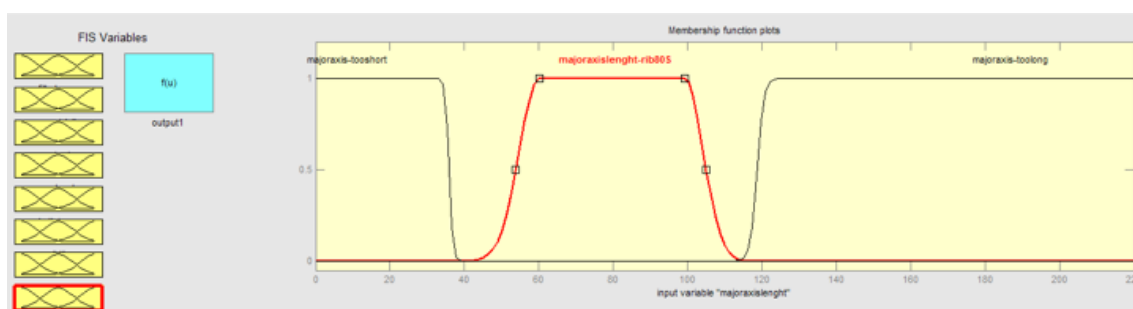


Figura 5.5: Ejemplo de la programación de las funciones de membresía de un FIS inicial de tipo Sugeno programado según la experiencia de un experto humano en cryo-EM

Después de programar y refinar el modelo FIS de tipo Sugeno inicial, de forma que sea capaz de identificar la población de partículas de ribosomas 70S, se prepara el set de datos entrada-salida necesarios para entrenarlo y chequearlo, aprovechado la propiedad de red neuronal del modelo. En la fila superior de la figura 4.13 se mostraba un ejemplo de imágenes de referencia para cada tipo de partícula que es posible encontrar en las imágenes cryo-TEM experimentales para el estudio de la estructura del ribosomas 70S. Cada una de estas imágenes contienen partículas de una única población homogénea de ribosomas libres 70S, subunidades libres (30S y 50S), agregados de ribosomas y partículas de contaminación de hielo. Estas imágenes cryo-TEM han sido obtenidas con nuestro TEM en relación a diferentes proyectos de investigación sobre el estudio de la estructura de ribosomas. Todas las imágenes de referencia fueron adquiridas en mínima

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

dosis y a la misma magnificación de trabajo que la utilizada en este trabajo (es decir a $50000\times$).

Para entrenar el modelo ANFIS dedicado a identificar partículas de ribosomas libres 70S se construye un set de datos entrada-salida utilizando 20 imágenes cryo-TEM con 1458 proyecciones de una población homogénea de ribosomas libres 70S, 20 imágenes cryo-TEM con 1233 proyecciones de una población homogénea de sub-unidades de ribosomas, 25 imágenes cryo-TEM con 711 proyecciones de agregados de ribosomas y 25 imágenes cryo-TEM conteniendo 620 proyecciones de diferentes tipos de contaminación de hielo (correspondientes a cristales de agua). Se utiliza el mismo esquema de segmentación para todas las imágenes de referencia y se genera una matriz de 8 componentes (columnas) correspondientes a las características discriminatorias y tantas filas como partículas segmentadas, para cada set de imágenes cryo-TEM de referencia. Para entrenar el ANFIS dedicado a identificar partículas de ribosomas 70S se genera el set de datos entrada-salida que consiste en la matriz de características a partir de las imágenes de ribosomas 70S más una novena columna que corresponde al vector de salida, y que en este caso contiene $\llbracket +1, \dots, +1 \rrbracket$. La matriz de características del resto de clases serán utilizadas para entrenar al modelo ANFIS dedicado a ribosomas 70S añadiendo un vector de salida en la novena columna que contiene $\llbracket -1, \dots, -1 \rrbracket$. Por otro lado, para entrenar el modelo ANFIS dedicado a detectar partículas de contaminación, se utiliza la matriz de características de las partículas de contaminación añadiendo un vector de salida con valor $\llbracket +1, \dots, +1 \rrbracket$ y la matriz formada por las características del resto de partículas de ribosomas con un vector de salida con valor $\llbracket -1, \dots, -1 \rrbracket$.

Este sistema de identificación de partículas ha sido integrado dentro del esquema de control para automatizar la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM y se ha verificado la eficacia de la toma de decisiones en varias sesiones cryo-TEM con nuestro TEM, utilizando rejillas vitrificadas que contienen ribosomas 70S. El esquema de control funciona correctamente y su carácter modular hace que se puedan incluir otros módulos para mejorar su eficacia. El sistema automático presentado en esta tesis no es utilizado en proyectos en los que sea necesario alta resolución, dado que JEM toolbox limita la resolución de la escala de grises a 8 bits.

5.2.2. Resultados para el estudio de una muestra heterogénea

Como hemos visto, el diseño del identificador neuro-difuso para la muestra homogénea de ribosomas bacterianos 70S se ha realizado para ser integrado dentro del esquema de control y comprobar su capacidad de trabajo en tiempo real en experimentos cryo-TEM en modo automático en un TEM no ideal. Por otro lado para cuantificar la eficiencia del método identificador y compararlo con un esquema manual se ha elegido el peor de los escenarios, que es una muestra heterogénea con diferentes tipos de complejos biológicos con forma y tamaño parecidos, conviviendo en las mismas imágenes cryo-TEM.

En esta sección, presentamos los resultados experimentales usando el nuevo método automático de identificación de partículas para el estudio de una muestra con interés biológico que ha sido purificada gracias a una colaboración entre diferentes grupos de investigación del CIC bioGUNE. Esta muestra ha sido utilizada para validar el método automático de identificación de partículas, comparando su eficiencia respecto a una selección manual (realizada por un experto en cryo-EM). Esta comparativa y el cálculo de la matriz de confusión de nuestro sistema de identificación, así como su validación, han sido realizadas por expertos en cryo-EM ajenos al diseño del método automático de selección de partículas.

Purificación y descripción de la muestra heterogénea

La muestra de interés biológico analizada contiene disomas (dimeros de ribosomas 80S) eucariotas, purificados a partir de células de mosca *Drosophila Melanogaster* S2. Para su purificación, las células son inicialmente lisadas usando un detergente suave (TRITON X-100). Después de una centrifugación inicial a bajas revoluciones por minuto (rpm), el sobrenadante es cargado en un gradiente de sacarosa con una rango de densidad entre 20-50%, y ultra-centrifugado durante 2 horas a 40000 rpm (Dunn et al., 2013). Las diferentes fracciones de densidad recogidas son posteriormente analizadas mediante la combinación de electroforesis en gel y microscopia de tinción negativa, lo que permite seleccionar la fracción de densidad de mayor interés. Durante este análisis, una de las fracciones analizadas reveló una población heterogénea con diferentes tipos de complejos biológicos presentes en la muestra, como se puede ver en una de las imágenes por cryo-TEM en la figura 5.6. Las partículas encontradas en las imágenes cryo-TEM de este estudio revelaron diferentes estados oligoméricos y de ensamblaje de los ribosomas

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

eucariotas 80S: disomas de ribosomas 80S, ribosomas 80S libres, sub-unidades de ribosomas (resultado del desensamblado de ribosomas 80S durante el proceso de purificación) y agregados de ribosomas. Además, las imágenes también contenían las proyecciones de pequeñas partículas virales, identificadas mediante espectroscopia de masas (MALDI-TOF) como el virus *Flock House* (un virus icosaédrico muy común que suele infectar los cultivos celulares de células S2). Las partículas de cristales de hielo que contaminan la muestra también estaban presentes en algunas de las imágenes cryo-TEM.

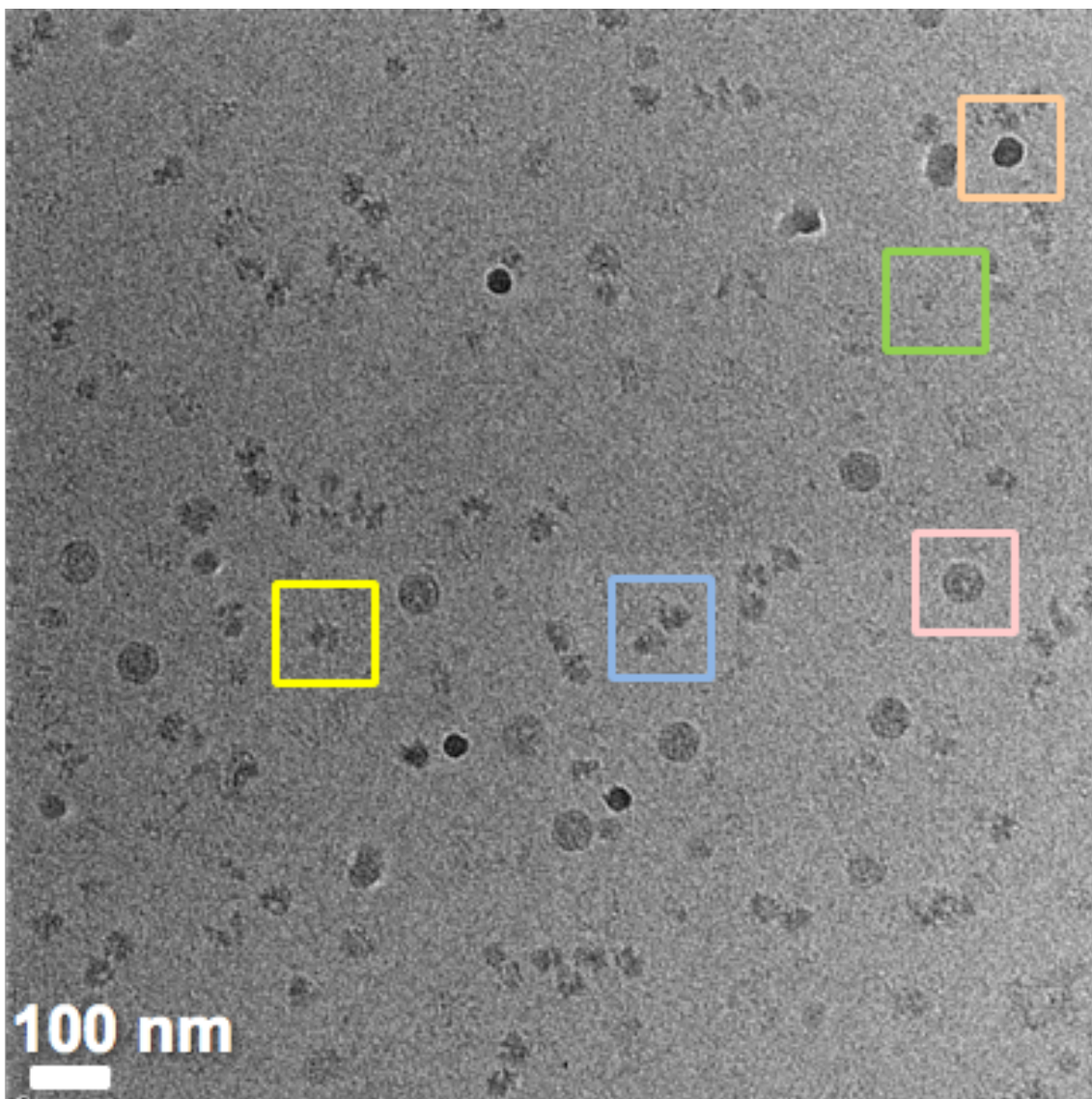


Figura 5.6: Imagen por cryo-TEM de una muestra heterogénea resultado de la purificación de disomas de ribosomas 80S de *Drosophila*

En la figura 5.6 se muestra una población heterogénea de partículas (disomas de ribosomas eucariotas 80S (en azul), ribosomas 80S libres (en amarillo), subunidades de ribosomas (en verde) resultado del desensamblado en el proceso de purificación, agregados y pequeñas partículas virales (en rosa) identificadas por espectrometría de masas como *Flock House virus* descrito en el Capítulo 2. Las partículas de contaminación (en naranja) correspondientes a cristales de hielo también suelen estar presentes en la mayoría de las imágenes de cryo-TEM.

Arquitectura del método de identificación basado en cinco modelos ANFIS

Para automatizar la identificación del tipo de partícula presente en las imágenes cryo-TEM de esta purificación, se desarrolló y entrenó un método neuro-difuso como se describe a continuación. El objetivo del sistema de identificación es reconocer y seleccionar separadamente cualquier tipo de partícula individual de interés, presente en imágenes de cryo-TEM, para lo cual se pueden diseñar y entrenar tantos modelos ANFIS como tipos diferentes de partículas se deseen identificar en estas imágenes. Por lo tanto el sistema de identificación en este caso consta de cinco modelos ANFIS independientes entre sí, cada uno de ellos desarrollado y entrenado para identificar un tipo diferente de partícula, como se puede ver en la figura 5.7.

Diseño de cinco modelos iniciales FIS de tipo Sugeno

El primer paso para crear este sistema de identificación de partículas es programar y diseñar cinco modelos iniciales FIS de tipo Sugeno, uno para cada tipo de partícula. Como hemos explicado anteriormente las entradas a este sistema son las 8 características discriminatorias, resultado del proceso de segmentación. Las funciones de membresía son similares a las descritas en el apartado anterior, pero resulta necesario ajustar los parámetros de las funciones de membresía para cada una de las muestras. Para ello se empleo el método de simulación de Matlab, que ayuda en el diseño de sistemas de inferencia difusos, como se puede ver en la figura 5.8. De la misma forma las reglas lingüísticas IF-THEN fueron cuidadosamente programadas. Para las variables de entrada, se eligen funciones de membresía de forma Gaussiana y forma de S (sigmoide). Para las variables *filled area*, *gray extent*, *minor axis length* y *major axis length* se utilizan 3 Gaussianas por cada una de ellas; para las variables *solidity*,

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

eccentricity y *contrast* se utilizan 2 Gaussianas por cada una y finalmente para la variable *distance with neighboring particles* se utilizan 2 funciones de membresía en forma de sigmoide.

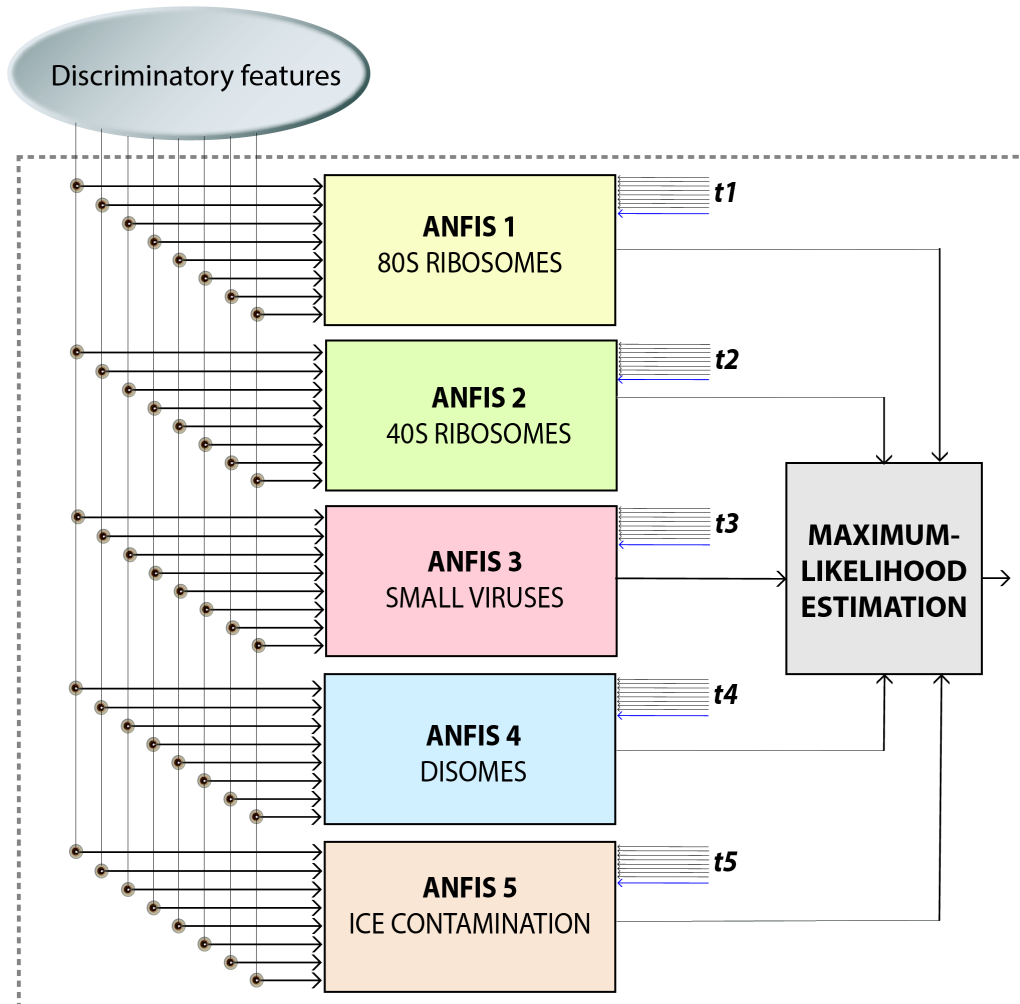


Figura 5.7: Esquema de la arquitectura propuesta basada en cinco modelos ANFIS para la identificación de partículas en el estudio de una muestra heterogénea por cryo-EM

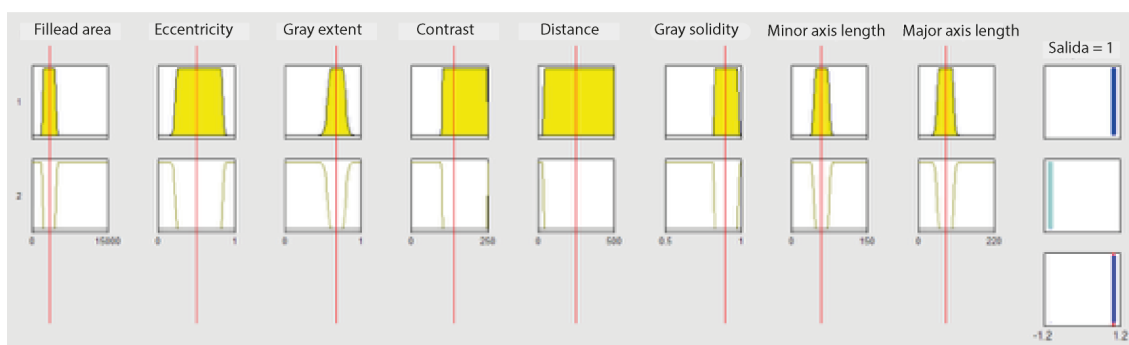


Figura 5.8: Representación de la simulación realizada por el toolbox fuzzy de Matlab utilizado en la programación de cada FIS de tipo Sugeno

Aprendizaje y chequeo de los cinco modelos ANFIS

Para definir los diferentes parámetros del método de segmentación mediante la búsqueda Tabú es necesario aislar inicialmente pequeños subgrupos de la muestra de interés, en este caso disomas y optimizar los parámetros para dicha muestra extrayendo las características que discriminen las proyecciones de este complejo. Para ello se utilizaron las tres mejores imágenes de referencia que contienen disomas, pero digitalmente modificadas mediante photoshop para eliminar el resto de partículas de diferente tipo.

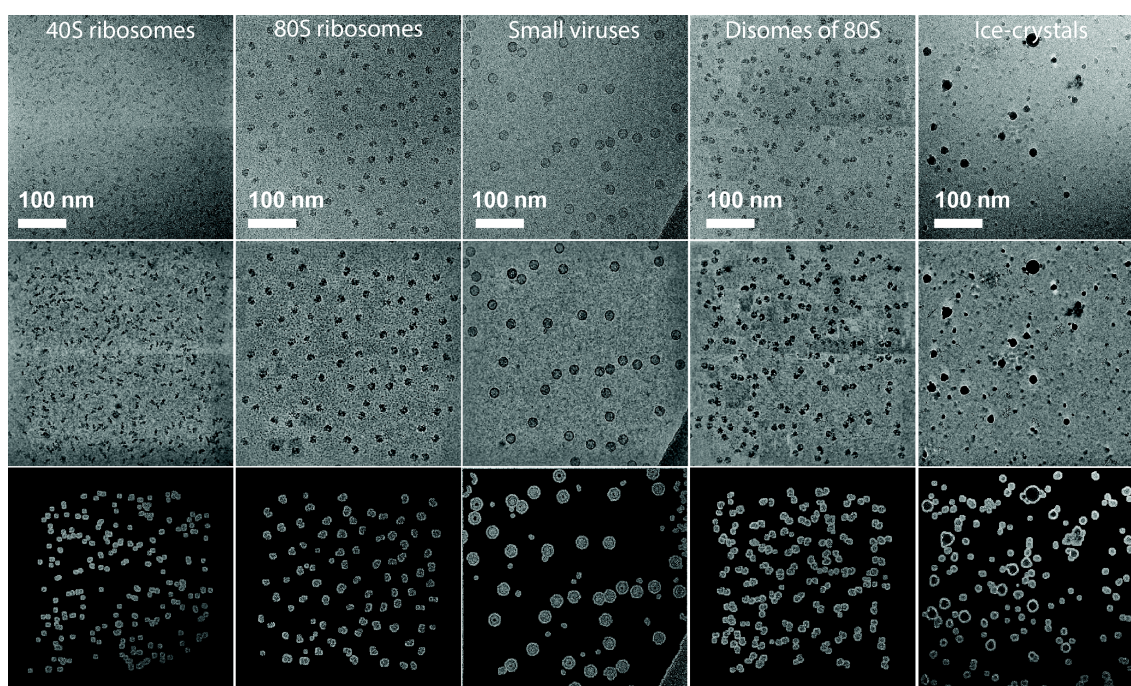


Figura 5.9: Resultado del proceso de segmentación para cada tipo de partícula presente en el estudio por cryo-EM de una muestra heterogénea de *Drosophila*

En la figura 5.9 se muestra un ejemplo de cada una de las imágenes de referencia utilizadas para entrenar cada uno de los cinco ANFIS del sistema neuro-difuso. En la fila superior se muestra una imagen cryo-TEM usada como referencia para cada tipo de partícula presente en esta muestra heterogénea. En la fila intermedia se observa el resultado del preprocesamiento de imagen con estas imágenes y la fila inferior muestra el resultado del proceso de segmentación. Estas imágenes han sido segmentadas utilizando los parámetros de preprocesamiento y segmentación optimizados para la muestra de disomas. El resultado del proceso de preprocesamiento para cada tipo de partícula se puede ver en la fila central. El resultado de multiplicar la imagen original

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

por la máscara (resultado de la segmentación) se muestra en la fila inferior.

Para entrenar y chequear los diferentes ANFIS de este sistema de identificación se utilizaron 15 imágenes conteniendo 1342 partículas de una población homogénea de ribosomas libres 80S, 15 imágenes conteniendo 1490 subunidades eucariotas (tanto 60S como 40S), 20 imágenes con 565 partículas de disomas (modificadas con photoshop), 25 imágenes con 667 partículas correspondientes a pequeñas partículas virales del virus *TrV* (Squires et al., 2013) del mismo tamaño y forma que el virus de drosophila *Flock House* de nuestra muestra, 25 imágenes conteniendo 711 agregados de ribosomas y finalmente 25 imágenes que contienen diferentes tipos de partículas de contaminación de hielo (en total 622). De la misma forma que en el caso del estudio de una muestra homogénea, el modelado y optimización de los diferentes modelos ANFIS para poder identificar cada clase de partícula en esta muestra heterogénea es implementado a través del proceso de entrenamiento de cada uno de ellos, utilizando pares de datos entrada-salida representativas de cada tipo de partícula. Estos pares de datos entrada-salida están formados por las 8 características discriminatorias de una población homogénea (de cada clase) como entrada y un vector de $\llbracket +1, \dots, +1 \rrbracket$ o $\llbracket -1, \dots, -1 \rrbracket$ como salida.

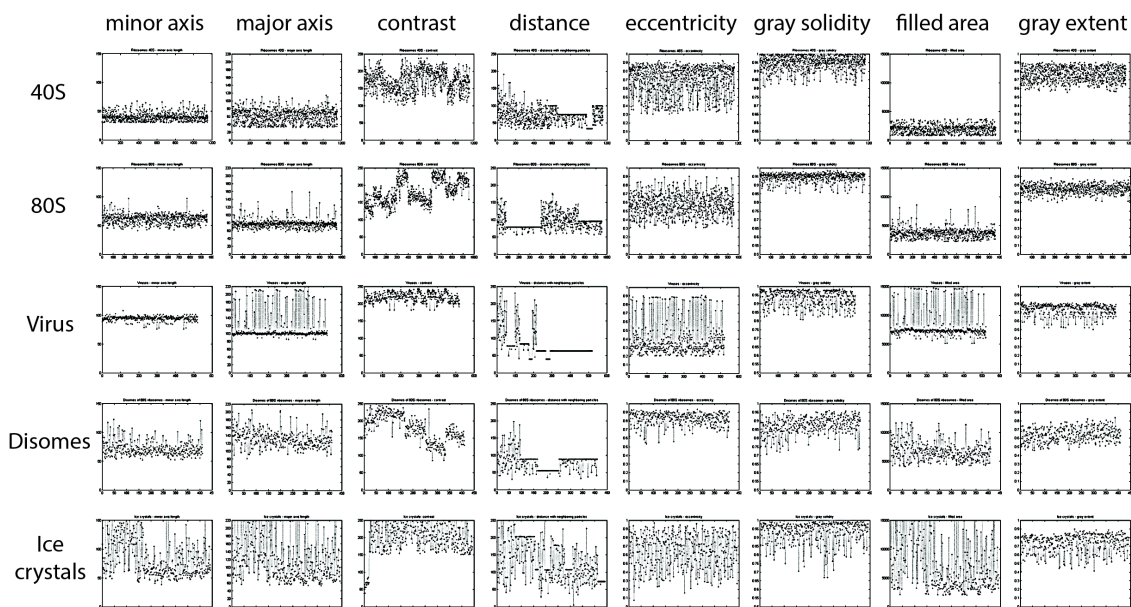


Figura 5.10: Imagen que muestra de forma gráfica la matriz de características discriminatorias usadas en el proceso de entrenamiento del sistema de identificación de una muestra heterogénea de *Drosophila*

En la figura 5.10 se muestra de forma gráfica la matriz resultado de la medida de las

características discriminatorias extraídas de cada set de imágenes de referencia, conteniendo una población homogénea de cada uno de los diferentes tipos presentes en esta muestra heterogénea. La matriz de las 8 características medidas para cada tipo de muestra representa una huella dactilar que permite distinguirlas del resto.

Las características medidas de este set de imágenes de referencia son utilizadas para entrenar y chequear cada modelo ANFIS, añadiendo convenientemente el vector de salida a cada matriz, de forma que por ejemplo para entrenar el modelo ANFIS destinado a identificar los disomas se crea una matriz con las 8 características extraídas de las imágenes que solamente contienen disomas, y un vector de salida $[[+1, \dots, +1]]$ y el resto de características medidas a partir de las imágenes del resto de clases (ribosomas libres, subunidades, agregados, pequeños virus y contaminaciones) son utilizadas añadiendo un vector de salida de la forma $[[-1, \dots, -1]]$. Para entrenar cada ANFIS se utilizan las características morfológicas que forman la huella dactilar de cada tipo de objeto y se utiliza una estrategia combinada de descenso de gradiente y un algoritmo de mínimos cuadrados aprovechando su estructura adaptativa de red neuronal “*back-propagation*”.

Una vez entrenados y chequeados cada uno de los cinco modelos ANFIS, ya se puede utilizar el sistema de identificación de forma que la entrada al sistema será un vector formado por las 8 características discriminatorias medidas en cada uno de los objetos (blobs) numerados después del proceso de segmentación en la imagen cryo-TEM. La salida de cada uno de los modelos ANFIS será un valor de probabilidad p_i de pertenecer a la partícula del tipo i , donde $-1 < p_i < +1 ; i=1, \dots, 5$. Finalmente se calcula el máximo entre estos valores p_i que nos indicará el tipo i de partícula al que pertenece. El centro de masas de esa partícula se añadirá al fichero de coordenadas creado para este tipo de partícula. Se crean tantos ficheros de coordenadas por imagen como complejos biológicos diferentes existan en estas imágenes.

5.2.3. Validación del sistema de identificación de partículas

Para realizar la comparación entre el método manual y el automático se utilizó un set de 253 imágenes cryo-TEM, que contienen esta mezcla de diferentes estados oligoméricos de ribosomas eucariotas (80S libre, disomas, sub-unidades y agregados) junto con las

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

proyecciones de pequeñas partículas víricas de tamaño similar al ribosoma 80S. Para cuantificar la validez y medir la eficiencia del nuevo método automático basado en ANFIS se han comparado sus resultados con un método manual de selección de partículas (guiado por un experto diferente al ingeniero programador del sistema experto). Se seleccionó de forma manual las diferentes poblaciones en esta muestra heterogénea y el resultado se comparó con el método automático. Para cuantificar la eficiencia se crea una matriz de confusión y se calculan los valores de precisión para la identificación de cada una de las poblaciones.

Matriz de confusión

El primer paso para evaluar el rendimiento del nuevo método de identificación de partículas fue compararlo con el método manual de selección de partículas y crear la matriz de confusión. La matriz de confusión contiene información sobre la identificación prevista y la real realizada por nuestro sistema automático. Para calcular esta matriz de confusión se utilizaron las imágenes cryo-TEM adquiridas de forma manual en una escala de grises de 32 bits (en coma flotante) y a una magnificación nominal de 50000×. La tabla 5.1 muestra la matriz de confusión de nuestro sistema de identificación en el estudio de esta muestra heterogénea. Con esta tabla se puede ver si el sistema se confunde entre dos tipos diferentes de partículas, con el objetivo de evaluar su rendimiento. En una tabla de confusión se puede discernir el número de verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos, y verdaderos positivos, y permite calcular los valores de precisión.

		REAL					
		<i>Virus</i>	<i>Disomas</i>	<i>80S</i>	<i>Contaminación</i>	<i>Unknown</i>	<i>Precisión</i>
PREDICHO	<i>Virus</i>	1209	5	4	80	122	0.98
	<i>Disomas</i>	10	995	5	17	57	0.99
	<i>80S</i>	45	0	6547	325	1014	0.88
	<i>Contaminación</i>	7	28	0	1040	0	0.96

Tabla 5.1: Matriz de Confusión del sistema automático basado en ANFIS para la identificación de partículas individuales en imágenes para cryo-EM

Valores de precisión

El segundo paso para evaluar el sistema automático de identificación de partículas frente a un método manual es cuantificar numéricamente los valores de precisión, los cuales representan la proporción del número total de predicciones que son correctas, calculadas de la forma,

$$AC = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN} \quad (5.2.1)$$

donde TP (verdaderos positivos) son los valores de la intersección entre filas y columnas representadas con el mismo objeto (e.g., para disomas es 995), FP (falsos positivos) son el resto de valores de esa fila (e.g., para disomas es $10 + 5 + 17 + 57 = 89$), FN (falsos negativos) son el resto de valores de esa columna (e.g., para disomas es $5 + 0 + 28 = 33$), TN (verdaderos negativos) son el resto de valores de la tabla de confusión (e.g., para disomas 10393). El valor de precisión para los disomas es del 99 %.

Validez del método para la reconstrucción 3D por cryo-EM

Como vimos en el Capítulo 2, el método más común para generar reconstrucciones 3D es la utilización de reproyecciones de referencia de un mapa 3D de referencia. Posteriormente se calcula la cross-correlación de todo el set experimental de partículas con estas re-proyecciones de referencia. El resultado de la cross-correlación, y por tanto del alineamiento y reconstrucción dependen en gran medida de un buen centrado de las partículas seleccionadas. Es por ello necesario validar el buen funcionamiento de la selección del centro de masas de las partículas individuales para utilizarlo en el proceso de reconstrucción 3D siguiendo la estrategia cryo-EM. En consecuencia, se utilizó el nuevo sistema de identificación neuro-difuso para seleccionar de forma automática los diferentes tipos de partículas presentes en cada una de las 253 imágenes, así como para generar tantos ficheros de coordenadas por imagen como partículas son identificadas. Estos ficheros de coordenadas pueden ser empleados directamente para generar los mapas 3D de los complejos de interés estructural, es decir los ribosomas libres 80S, disomas y el virus Flock House (las partículas correspondientes a las sub-unidades tienden a ser muy flexibles y no han sido utilizadas para realizar una reconstrucción

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3D). Para ello se importan estos ficheros de coordenadas al software de reconstrucción de microscopia XMIPP (Marabini et al., 1996) y se lanza un proceso de refinamiento de la estructura utilizando la técnica de *3D projection matching* (Frank et al., 1981; Ludtke et al., 1999; Scheres et al., 2008), donde es necesario una estructura 3D de referencia filtrada a ~ 30 Å.

En la figura 5.11 se muestra un ejemplo del funcionamiento del sistema de identificación de partículas para tres de las 253 imágenes cryo-TEM, donde el sistema de identificación vincula cada objeto segmentado en estas imágenes con el tipo de partícula cuyo valor de salida crisp, de su correspondiente modelo ANFIS, sea superior al resto.

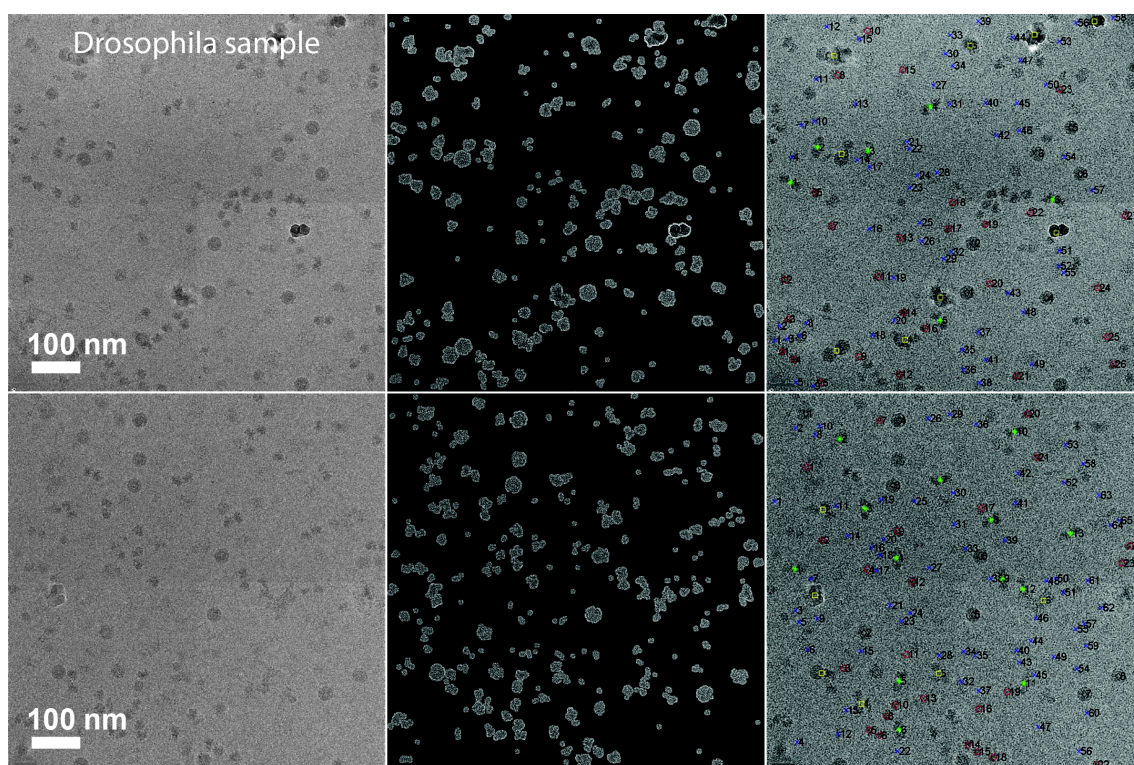


Figura 5.11: Imágenes resultado de la segmentación y selección del nuevo sistema automático que identifica las partículas en imágenes para cryo-EM de una muestra heterogénea de *Drosophila*

En la figura 5.12 se muestra gráficamente el centro seleccionado por el sistema de identificación, donde la estrella verde representa el centro de los disomas, los círculos rojos representan el centro de las proyecciones 2D de ribosomas 80S libres, las cruces azules representan el centro de sub-unidades de ribosomas, los diamantes negros son el

centro de las pequeñas partículas virales y los cuadrados amarillos indican las partículas de contaminación correspondientes a cristales de hielo.

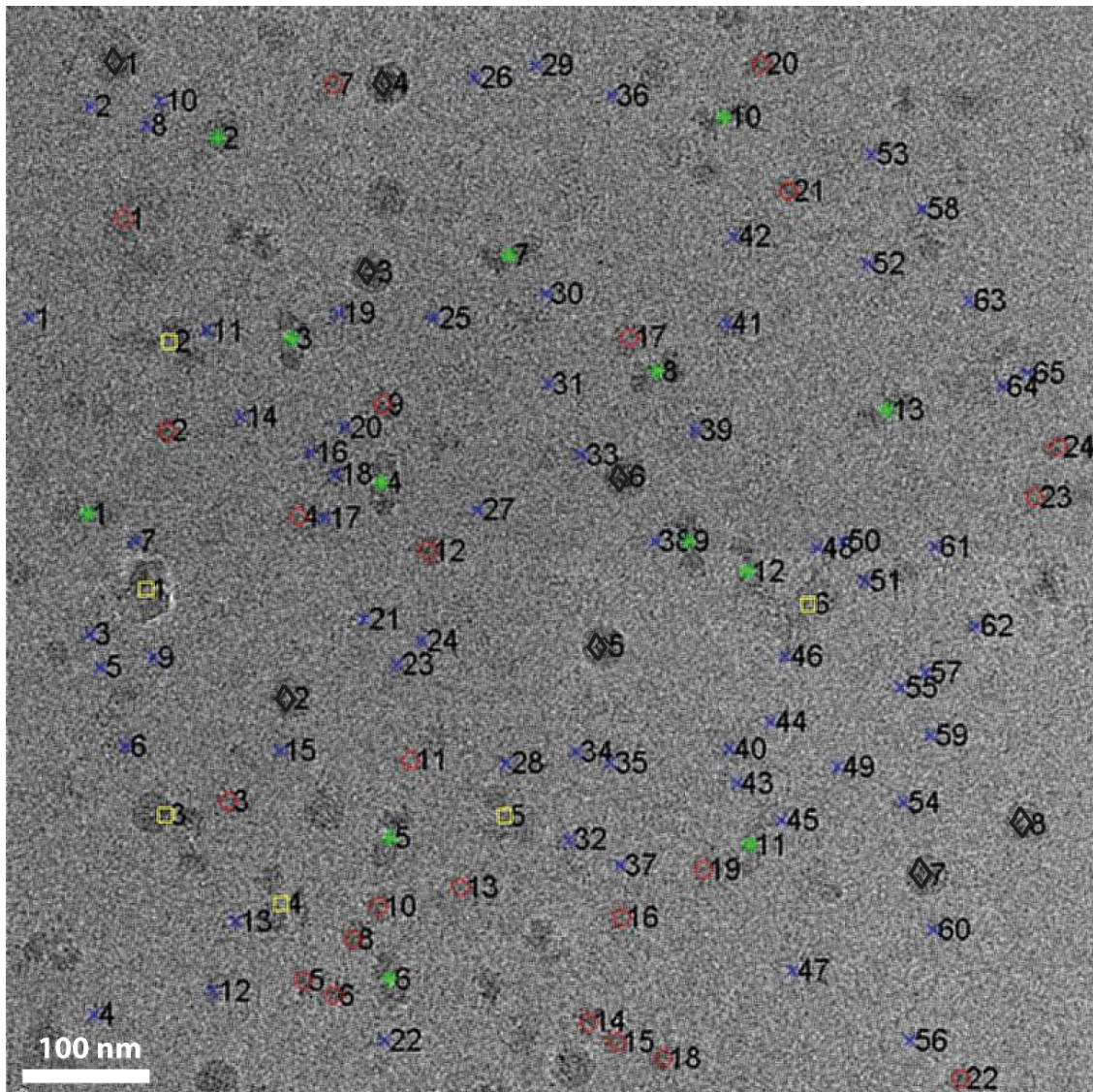


Figura 5.12: Resultado del centrado e identificación de las partículas en una imagen cryo-TEM de la muestra heterogénea de *Drosophila*

En la figura 5.13 se muestran algunas partículas individuales encuadradas que fueron automáticamente seleccionadas por el sistema. En esta figura se muestra el resultado de dos análisis estructurales diferentes para tres de los diferentes complejos presentes en la muestra heterogénea. Por un lado se muestra el resultado de un método de clasificación 2D y por otro lado se muestra una vista del mapa de densidad 3D, resultado de las reconstrucciones 3D obtenidos por un método de reconstrucción que utiliza proyecciones de referencia a partir de un mapa preliminar.

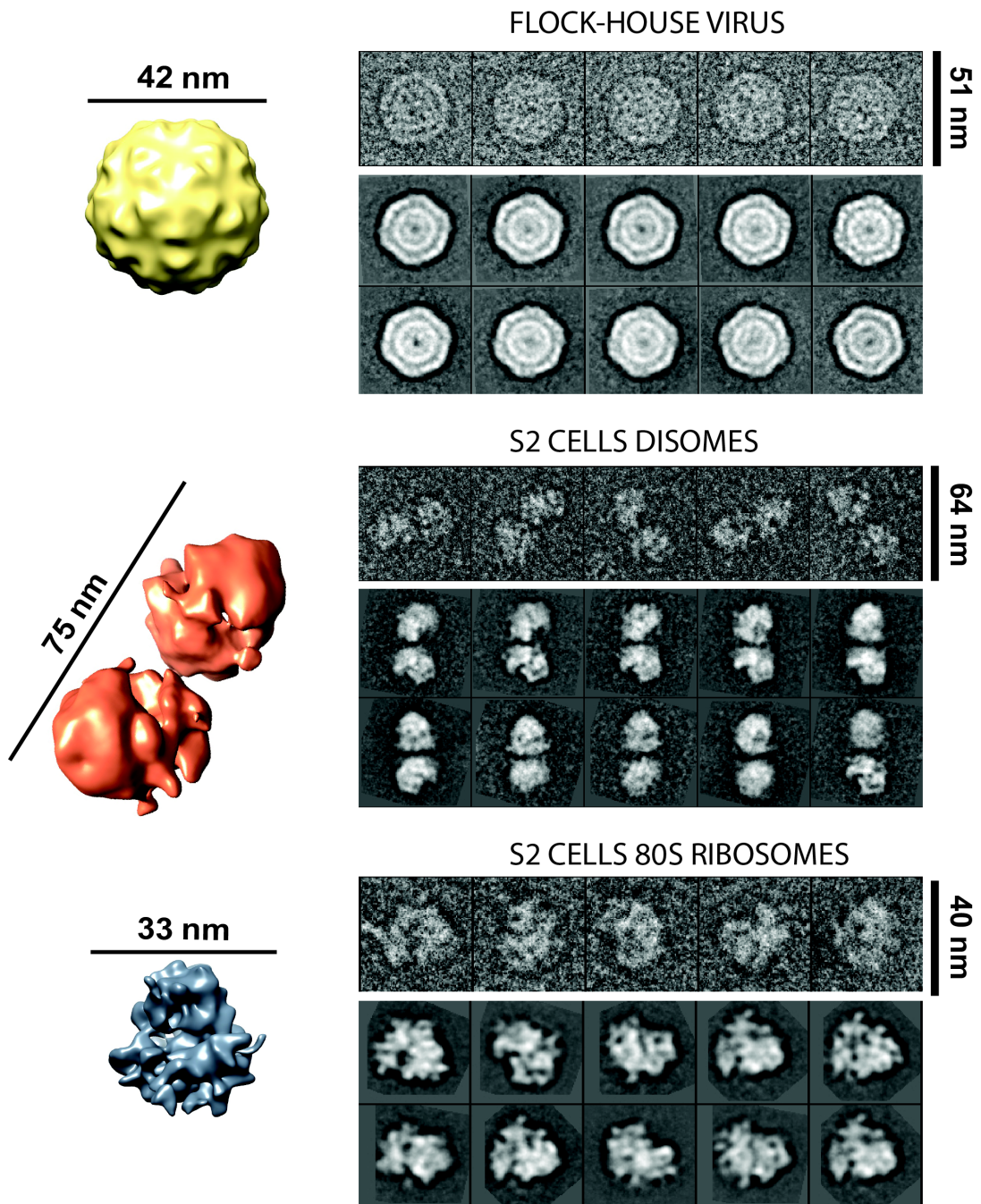


Figura 5.13: Ilustración del resultado del proceso de selección automática de partículas usando el método neuro-difuso desarrollado en esta tesis y utilizado para un análisis estructural por cryo-EM. Se muestra el resultado de la clasificación 2D y una vista de la reconstrucción 3D de cada uno de los tres complejos biológicos de mayor interés en una muestra heterogénea (pequeños virus icosaédricos, disomas y ribosomas libres)

Capítulo 6

Conclusiones y Perspectivas

6.1 Conclusiones

Los métodos convencionales para automatizar la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM, incluso los usados en los equipos más sofisticados tienden a ser rígidos en su concepción. Su diseño, y por tanto su buen funcionamiento normalmente implica la obtención de rejillas perfectas, que dependiendo del experimento son difíciles de conseguir. Es por ello que en esta tesis se ha desarrollado un esquema de control para la automatización de la adquisición de datos en el TEM de la compañía Jeol instalado en el CIC bioGUNE diferente a los existentes.

Los datos obtenidos de esta forma se han empleado en experimentos cryo-EM de diferentes complejos biológicos estudiados por investigadores de CIC bioGUNE. Mediante esta técnica la muestra se analiza a temperaturas criogénicas permitiendo la reconstrucción 3D de un complejo biológico purificado a resolución casi atómica y en un estado conformacional muy cercano al fisiológico. La experiencia de la Plataforma EM del CIC bioGUNE en el uso de múltiples técnicas relacionadas con cryo-EM, además de su carácter colaborativo, han permitido generar el conocimiento y los datos de referencia necesarios para la realización de este trabajo.

El esquema de control desarrollado ha conseguido trabajar sin supervisión de un usuario humano; se considera más inteligente que los métodos convencionales porque incluye diferentes técnicas de inteligencia artificial y su forma de trabajar es similar a la de un experto en cryo-TEM, tomando decisiones en tiempo real en función de los datos adqui-

ridos utilizando un sistema experto. El esquema de control alternativo presentado en esta tesis ofrece además un método de identificación de partículas automático y totalmente adaptable a cualquier tipo de muestra. Para el desarrollo de este esquema de control se han realizado diferentes módulos, cuyo funcionamiento se ha explicado a lo largo de la tesis. En el Capítulo 5 se ha mostrado la aplicación de cada uno de los módulos del sistema de control. Esto ha sido posible gracias a diferentes sesiones en modo automático con la muestra de ribosomas bacterianos 70S, trabajo que ha permitido mejorar y validar cada uno de los diferentes módulos hasta lograr afrontar y resolver las diferentes dificultades que acontecen en una sesión cryo-TEM rutinaria. A continuación se describirán los resultados para cada uno de los objetivos perseguidos y descritos en el Capítulo 1:

Automatización de la adquisición de datos en sesiones cryo-TEM

El objetivo principal de este trabajo era conseguir navegar a través de rejillas con agujeros regulares (típicamente de la marca comercial Quantifoil) en sesiones de mínima dosis en el TEM del CIC bioGUNE. Este objetivo ha sido logrado mediante la utilización de un esquema de control gobernado por un sistema experto que selecciona los agujeros en función de diferentes variables de entrada. El nuevo esquema de control es capaz de navegar secuencialmente y de forma automática a lo largo de los agujeros circulares de las rejillas Quantifoil, regularmente espaciados y no irradiados con anterioridad, imitando el modo de trabajo manual de un experto sin la necesidad de crear un *atlas* completo de la rejilla.

Se ha observado que para el buen funcionamiento de la navegación es necesaria *una correcta precalibración* antes de comenzar el modo automático. No obstante, las diferentes precalibraciones son muy sencillas de realizar y dado que también es necesario el alineamiento del haz a través de toda la columna del TEM y la calibración de la referencia de ganancia de la cámara CCD por parte de un usuario experto, estas precalibraciones no alteran la mecánica de trabajo habitual.

Integración del conocimiento de un experto en el sistema de control

Otro de los objetivos de este proyecto era crear un nuevo esquema de control más inteligente que llevase a cabo la misma tarea y de forma similar a cómo lo realizaría un microscopista experto en sesiones cryo-TEM. Para conseguir esto, se han combinado dife-

rentes técnicas de AI para crear un sistema experto basado en un sistema de inferencia difusa (FIS), algoritmos de visión artificial, la búsqueda Tabú y sistemas neuro-difusos ANFIS, como se han descrito a lo largo de esta tesis. El sistema experto incluido en el esquema de control integra la identificación automática de características mediante el procesamiento de imagen y el análisis automático de la CTF para evaluar la calidad de las imágenes adquiridas.

Por consiguiente, el nuevo método de control diseñado se diferencia de los esquemas convencionales en que no necesita realizar un *atlas* de toda la rejilla sino que su modo de funcionamiento está gobernado por este sistema experto que toma decisiones en tiempo real en función de los datos adquiridos tanto a baja magnificación en modo *Search* como a alta magnificación en modo *Photo*. La toma de decisiones en tiempo real (realizada por el FIS de tipo Mamdani) ha sido optimizada de forma que su modo de trabajo imita el modo de trabajo de un usuario experimentado en sesiones cryo-TEM en el TEM del CIC bioGUNE. El hecho de que el ingeniero programador del FIS y el experto en el área de cryo-TEM coincidan en la misma persona ha facilitado sobremanera la mejora de la toma de decisiones en tiempo real, gracias a los resultados obtenidos en sesiones rutinarias en modo automático. El conocimiento y experiencia en cryo-TEM han resultado fundamentales tanto para diseñar el FIS que toma de decisiones en tiempo real como para programar cada modelo ANFIS para la identificación del tipo de partícula.

En el Capítulo 3 se describió brevemente la inteligencia artificial y se explicaron los diferentes puntos del test de Turing que debe cumplir una máquina para confirmar si es o no inteligente. Para confirmar que una máquina es capaz de actuar como un humano es necesario que pase dicho test en su totalidad, lo que implica que una máquina tenga capacidades de visión artificial y de manipulación de objetos mediante un sistema robótico. Actualmente, estamos lejos de lograr un *smartTEM* totalmente automatizado que sustituya a un experto humano, pero el sistema experto implementado en el nuevo esquema de control del TEM del CIC bioGUNE sienta las bases para crear equipos TEM cada vez más inteligentes, capaces de tomar decisiones en tiempo real en función de la información contenida en las imágenes.

Evaluación de la calidad de las imágenes en tiempo real

Todos los sistemas de automatización existentes basados en un *atlas* tienen en común que necesitan una perfecta distribución de partículas en toda la rejilla y un grosor de hielo uniforme. Además, es necesario disponer de un microscopio extremadamente estable en el tiempo para poder trabajar durante muchas horas sin errores. Hasta ahora no era posible evaluar de forma automática y en tiempo real los datos adquiridos en sesiones cryo-TEM; en el caso de una sesión no supervisada, los datos obtenidos pueden ser de muy mala calidad. La presencia de un exceso de contaminación, una mala elección de la zona del agujero a irradiar, una mala elección del cuadrante de la rejilla, un grosor de hielo inadecuado, áreas de la rejilla con agujeros vacíos debido a la rotura de la capa de carbón, agregación, pobre concentración de partículas, o muestras dañadas entre otras causas pueden reducir drásticamente el tamaño final del set de imágenes a procesar. Ninguno de estos sistemas de automatización substituyen la capacidad y precisión de un operador experimentado. Un problema recurrente por ejemplo es la irregular distribución de partículas en los distintos agujeros de la rejilla aunque el hielo parezca fino. En este caso un operador experimentado debe juzgar si se continúa el experimento, si se cambia de zona de rejilla o se inserta otra rejilla, y si merece la pena utilizar el sistema automático de adquisición. Además siempre hay que tomar decisiones “in-situ” teniendo en cuenta por ejemplo el nivel aceptable o no de contaminación de hielo en una rejilla particular, la estabilidad del porta-muestras o el comportamiento del microscopio. Es por tanto necesario evaluar en tiempo real la validez y calidad de las imágenes obtenidas.

Como se ha descrito y mostrado en los Capítulo 4 y Capítulo 5 respectivamente, para la toma de decisiones en tiempo real ha resultado imprescindible el diseño de un nuevo sistema de identificación de partículas basado en técnicas de visión artificial y modelos neuro-difusos ANFIS, los cuales han permitido generar información en tiempo real sobre el tipo de partícula presentes en cada imagen adquirida. La gran ventaja de este método es su capacidad para integrar el conocimiento de un experto seleccionando partículas y un proceso de aprendizaje a partir de datos de referencia que le permite detectar cualquier tipo de partículas en tiempo real durante una sesión cryo-TEM. Para el correcto funcionamiento de este sistema identificador de partículas ha sido necesario un proceso de entrenamiento para cada uno de los modelos ANFIS utilizados para identificar las

partículas de interés en las muestras y para rechazar el resto. El entrenamiento resultó ser una parte crítica del proceso dado que requiere datos preliminares tanto para la muestra válida como de las otras poblaciones no deseadas. Estas imágenes de referencia deben ser adquiridas preferiblemente en el mismo TEM en condiciones similares. En este trabajo se han utilizado imágenes de referencia obtenidas en diferentes sesiones cryo-TEM en el TEM del CIC bioGUNE a una magnificación de 50000× y en las mismas condiciones ópticas.

Para el correcto aprendizaje del sistema de identificación es importante *conocer con antelación cada tipo de partícula que nos podemos encontrar* en las imágenes cryo-TEM, de la misma forma que lo haría un operador humano que fuese a seleccionar de forma manual el set de partículas en estas mismas imágenes. Nuestro nuevo método basado en ANFIS aprovecha la experiencia de un investigador experimentado en la selección de partículas (ya sean virus, ribosomas o diferentes tipos de complejos macromoleculares) para programar los modelos iniciales de FIS de tipo Sugeno. Una cuidadosa selección de imágenes de referencia de cryo-TEM permitirá mejorar la eficiencia de cada modelo ANFIS, gracias al proceso de aprendizaje. La ventaja es que *este método es adaptable a cualquier tipo de muestras* tras un proceso de diseño y aprendizaje previos. Luego combinando técnicas de inteligencia artificial hemos obtenido un sistema de identificación que trabaja de forma automática y no supervisada, de forma parecida a como lo haría un investigador humano. Su buen funcionamiento ha sido demostrado con una muestra homogénea de ribosomas 70S para comprobar su validez en la identificación de partículas en tiempo real integrado en el esquema de control.

Detección de partículas en muestras heterogéneas

Este sistema de identificación solamente utiliza unas pocas características discriminatorias después de un proceso de segmentación, lo que permite su uso en tiempo real. Esto permite generar información sobre la calidad del hielo y la distribución de partículas válidas, utilizada por el sistema experto para la toma de decisiones. Esto mejora la calidad de los datos de salida ofreciendo un set de datos 100% validado gracias a la combinación con el análisis de la CTF hecha por *ACE toolbox*. Por lo tanto, además de proporcionar un sistema automático efectivo para la adquisición de un gran número de imáge-

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

nes se evaluó en tiempo real la validez y calidad de cada imagen generada en el microscopio.

Gracias a diferentes sesiones con la muestra de ribosomas 70S se ha demostrado la validez y eficacia de este nuevo esquema de control inteligente para la automatización de sesiones cryo-TEM con nuestro TEM no ideal. También se ha comprobado que su modo de trabajo es muy similar al de un experto humano aunque *el ritmo de trabajo es similar*, incluso inferior si no se calculan correctamente los valores de Z eucéntrico para cada cuadrante antes de iniciar el modo automático. Para validar la eficiencia del método de identificación incluso incluso en casos de gran heterogeneidad, se ha utilizado la muestra surgida de la purificación de disomas de ribosomas 80S de *Drosophila*. A lo largo del Capítulo 5 se ha descrito su diseño y se han calculado los valores de precisión del método de identificación para los diferentes tipos de partículas en la muestra. Hay que señalar que el método de segmentación ha sido optimizado mediante la búsqueda Tabú para la detección de disomas; la precisión respecto a una selección manual de la identificación automática para este tipo de partículas ha sido del 99%. El resto de poblaciones han sido detectadas con una precisión del 80%. Esto valida el método para una muestra heterogénea.

Detección de partículas de contaminación en tiempo real

Por otro lado resultó de vital importancia poder caracterizar correctamente los diferentes tipos de partículas de contaminación que pueden estar presentes en las imágenes cryo-TEM. Para ello, en el sistema de identificación de partículas en tiempo real un modelo ANFIS se dedica exclusivamente a la identificación de las partículas de contaminación, que normalmente corresponden a proyecciones bi-dimensionales de cristales de hielo. Esto es necesario tanto para generar correctamente los ficheros de coordenadas de las partículas válidas automáticamente detectadas, como para conocer en tiempo real la contaminación en la región de la rejilla en el que el sistema de navegación se encuentre. Esto permite tomar decisiones en tiempo real y ofrecer automáticamente un set de datos totalmente validado de la misma forma que lo haría un usuario experto en un modo de trabajo manual, desechando las imágenes con un exceso de partículas de contaminación.

Validación del esquema de control en TEM no ideales

Como se definió en el Capítulo 1, los esquemas basados en *atlas* o en áreas preseleccionadas de la rejilla no siempre funcionan adecuadamente en microscopios de anterior generación como el instalado en el CIC bioGUNE. Estos TEM utilizan porta-rejillas externos, sufren histéresis en sus lentes, son sensibles a diferentes fenómenos ambientales y tienen goniómetros no tan estables como los actuales. En este contexto ha sido necesario crear una estrategia de control diferente y más inteligente, que imite el comportamiento de un experto y sea capaz de tomar decisiones para superar cada uno de las dificultades que surgen en una sesión cryo-TEM en modo automático.

En este trabajo se diseña un sistema experto para un TEM no ideal donde la inestabilidad en el goniómetro, el uso de un porta-muestras externo y fenómenos de histéresis hacen difícil el uso de esquemas basados en un *atlas* de toda la rejilla. El nuevo esquema de control inteligente desarrollado en este trabajo es adaptable a cualquier tipo de microscopio que pueda ser controlado a través de Matlab y con cualquier tipo de muestra biológica en estudio. También puede resultar de gran utilidad en combinación con los esquemas basados en un *atlas* de toda la rejilla, ya que al poder tomar decisiones durante la sesión automática hace al sistema más inteligente y por tanto, más eficiente. La capacidad de tomar decisiones utilizando un sistema experto difuso y la capacidad de identificar las partículas utilizando el sistema neuro-difuso confiere al esquema de control un carácter inteligente. Su estructura modular hace incluso que se puedan incluir nuevos esquemas de autoalineamiento de las diferentes lentes del microscopio.

En esta tesis se ha demostrado experimentalmente la eficacia de este nuevo esquema de control que supera la vulnerabilidad de otros esquemas basados en un *atlas* de toda la rejilla a las *propiedades no ideales del TEM*. Estas propiedades no ideales han sido descritas a lo largo de esta tesis y gracias a un esquema basado en la toma de decisiones en tiempo real se ha conseguido superar cada una de ellas con éxito.

Integración en un esquema totalmente automatizado desde la adquisición de datos hasta la reconstrucción 3D del complejo biológico en estudio

El integrar un sistema de identificación de partículas y un método para el cálculo y la corrección de la CTF totalmente automáticos en una sesión no supervisada para cryo-

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

-EM abre la puerta para crear microscopios cada vez mas inteligentes. También permite incluir fácilmente esquemas de post-procesamiento de forma que al terminar la sesión de adquisición de datos automática se obtenga información preliminar acerca de la estructura en estudio, tanto mediante clasificación 2D o incluso mediante reconstrucciones 3D preliminares.

La salida del método de automatización descrito a lo largo de esta tesis es el conjunto de imágenes digitales del modo *Photo* en formato MRC. La calidad de estas imágenes es validada automáticamente gracias al análisis de la CTF utilizando *ACE toolbox* y la identificación del tipo de partículas presentes en estas imágenes utilizando el método descrito basado en diferentes modelos ANFIS. Junto a las imágenes se generan los ficheros de coordenadas de las partículas detectadas como válidas. Además el software *ACE toolbox* nos permite la opción de corregir la CTF directamente. De forma alternativa se puede generar un fichero de sub-enfoques del set de imágenes para que el software de reconstrucción 3D elegido lo utilice para realizar la corrección de la CTF utilizando un Filtro de Wiener como se explicó en el Capítulo 2. Con el resultado de esta tesis es posible automatizar todo el proceso de reconstrucción por cryo-EM desde la adquisición de los datos hasta la generación del mapa de densidad 3D final como se ha demostrado en el Capítulo 5. Esto hace a la técnica de cryo-EM más accesible a todo tipo de investigadores.

6.2 Perspectivas de futuro

En esta sección final se describen posibles líneas futuras de mejora para la continuación de la investigación en función de los resultados obtenidos:

- Mejora de la eficiencia de sesiones en modo automático en el TEM: Cabría incorporar nuevos módulos al esquema de control que mejoren la estabilidad y eficiencia del método de adquisición automática. Por ejemplo, es posible realizar protocolos que controlen la calidad del alineamiento del haz a través de la columna del TEM, dado que *JEM toolbox* ofrece el acceso a todas las lentes de alineamiento del TEM. Además para que el sistema experto se pueda utilizar en otros equipos TEM controlados desde matlab sería necesario reprogramar el FIS, adaptar los módulos de trabajo e incluso crear otros nuevos.

- Generalización a distintos tipos de muestras: para generalizar el uso del sistema de identificación de partículas “on-line” a todo tipo de muestras (e.g. desde grandes virus icosaédricos con más de 2 Mda de peso molecular hasta complejos proteicos de 200 kDa de peso molecular) sin necesidad de crear un esquema diferente para cada proyecto, sería necesario crear un sistema identificador con tantos modelos ANFIS como muestras diferentes se estudien en ese laboratorio. De la misma forma sería muy útil generar una base de datos que asociara las mejores imágenes finales a alta magnificación, para cada tipo de muestra, con las mejores zonas de la rejilla en las imágenes del modo *Search*. De esta forma es posible adaptar automáticamente las funciones de membresía del FIS para seleccionar siempre los mejores agujeros.
- Mejora de la capacidad de procesamiento: En una conexión en remoto el funcionamiento del interface que conecta un Pc cliente con los dos servidores (el Pc del TEM de Jeol y el Pc de la cámara CCD de Gatan) requiere de la utilización del sistema operativo Windows, así como de imágenes en escala de grises de 8 bits. Esto dificulta el diseño de un esquema totalmente automatizado que realice la adquisición automática de datos y finalmente reconstruya la estructura 3D a alta resolución. Con los resultados de este trabajo el siguiente paso es utilizar algoritmos de procesamiento en matlab para procesar los datos de cryo-EM una vez adquiridos y de forma automatizada. Por ejemplo, una clasificación 2D de las partículas automáticamente detectadas generaría información útil para el investigador sobre la heterogeneidad de la muestra y la distribución de vistas de la macromolécula biológica. Además, para generar un sistema que ofrezca imágenes de máxima resolución sería necesario utilizar una versión de *JEM-toolbox* que trabaje a 16 bits y utilizar Pcs más potentes que los utilizados.
- Reconstrucción automática de pequeños complejos macromoleculares: Uno de los retos a los que se enfrenta la técnica de cryo-EM es la reconstrucción 3D de complejos macromoleculares con un peso molecular menor a 300 kDa, por lo que uno de los retos para este nuevo sistema de automatización es su aplicación en el estudio de uno de estos complejos donde el centrado de las partículas resulta vital para el éxito del esquema de reconstrucción. Una forma de mejorar

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

el sistema de identificación de partículas sería midiendo otras características discriminatorias en los objetos detectados después del proceso para mejorar la eficiencia de los modelos ANFIS.

- Generalización a distintos tipos de rejillas: Sería necesario evaluar la utilidad de este tipo de esquemas de automatización más inteligente para todo tipo de rejillas, incluso para rejillas *lacey* con agujeros irregularmente espaciados y de diferente tamaño. Esto hace necesario modificar la forma, posición y tamaño de las funciones de pertenencia del FIS de tipo Mamdani que toma decisiones y entre otras cosas selecciona el siguiente agujero a irradiar en función de las imágenes en el modo *Search*.
- Integración del sistema experto en un esquema basado en un atlas completo de toda la rejilla: El sistema para la toma de decisiones basado en un FIS junto con el módulo para la identificación automática de partículas se puede implementar en un esquema de control convencional basado en la adquisición de un *atlas* de toda la rejilla. Esta combinación podría ayudar enormemente a los métodos convencionales a mejorar la eficiencia y la calidad de la adquisición de datos.
- Mejora de toma de decisiones en tiempo real: En relación a la toma de decisiones en tiempo real durante el proceso automático de adquisición existe margen de mejora de los algoritmos desarrollados, por ejemplo utilizando esquemas basados en redes neuronales para el procesamiento en paralelo de la etapa de preprocesamiento para la reducción de ruido. Esto podría mejorar la velocidad de procesamiento y hacerlo más eficiente.

Publicaciones

Publicaciones derivadas de la tesis

- **GIL-CARTON, D.**, ZAMORA, M., MIGUEL, I., SUTHERLAND, J.D., BARRIO, R., GARRIDO, I., VALLE, M. & GARRIDO, A.J. (2015). Real-time and decision taking selection of single-particles during automated cryo-EM sessions based on neuro-fuzzy method. *Expert Systems With Applications*, (ESWA-D-15-02159, submitted). (JCR, Q1).
- **GIL-CARTON, D.**, MIGUEL, I., GARRIDO, I., VALLE, M. & GARRIDO, A.J. (2015). Fuzzy Inference System as decision-maker to automate cryo-EM data acquisition on a transmission electron microscope. Session: Neural and Fuzzy Techniques. *Computational Intelligence and Virtual Environments for Measurement Systems and Applications (CIVEMSA), 2015 IEEE International Conference on*. Shenzhen, China. 1–6. DOI:10.1109/CIVEMSA.2015.7158607. (Scopus, WoK CORE).
- **GIL-CARTON, D.**, MIGUEL, I., GARRIDO, I., VALLE, M. & GARRIDO, A.J. (2015). Neuro-Fuzzy Control for Cryo Electron Microscopy Data Acquisition on a JEOL Transmission Electron Microscope. Session: Health Management Successes, Perspectives and Practice. *Joint Conference: MFPT 2015 and ISA's 61st International Instrumentation Symposium*. The Westin, Huntsville, AL, USA. 1–20. (Scopus, WoK CORE).

Publicaciones relacionadas con la tesis

- **GIL-CARTON, D.^a**, JAAKKOLA, S.T.^a, CHARRO, D., PERALTA, B., CASTAÑO-DIEZ, D., OKSANEN, H.M., BAMFORD, D.H. & ABRESCIA, N.G. (2015). Insight into the assembly of viruses with vertical single β -barrel major capsid proteins. *Structure*, 23, 1-12. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2015.07.015>, (^a Co-first author). (JCR, Q1).
- JIMÉNEZ-ROJO, N., LETE, M.G., ROJAS, E., **GIL, D.**, VALLE, M., ALONSO, A., MOYA, S.E. & GOÑI, F.M. (2015). Lipidic nanovesicles stabilize suspensions of metal oxide nanoparticles. *Chemistry and Physics of Lipids* 08/2015. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2015.08.012. (JCR, Q2).
- DE BIASIO, A., IBÁÑEZ DE OPAKUA, A., MORTUZA, G.B., MOLINA, R., CORDEIRO, T.N., CASTILLO, F., VILLATE, M., MERINO, N., DELGADO, S., **GIL-CARTON, D.**, LUQUE, I., DIERCKS, T., BERNADÓ, P., MONTOYA, G. & BLANCO, F.J. (2015). Structure of p15(PAF)-PCNA complex and implications for clamp sliding during DNA replication and repair. *Nature Communications*. 6, 6439. DOI:10.1038/ncomms7439. (JCR, Q1).
- FERNANDEZ-MILLAN, P., LAZARO, M., CANSIZ-ARDA, S., GERHOLD, J.M., RAJALA, N., SCHMITZ, C.A., SILVA-ESPIÑA, C., **GIL, D.**, BERNADÓ, P., VALLE, M., SPELBRINK, J.N. & SOLÀ, M. (2015). The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle. *Nucleic Acids Research*, 43(8), 4284-4295. DOI:10.1093/nar/gkv189. (JCR, Q1).
- LETE, M.G., SOT, J., **GIL, D.**, VALLE, M., MEDINA, M., GOÑI, F.M. & ALONSO, A. (2015). Histones Cause Aggregation and Fusion of Lipid Vesicles Containing Phosphatidylinositol-4-Phosphate. *Biophysical Journal*, 108(4), 863-871. DOI:10.1016/j.bpj.2014.12.018. (JCR, Q1).
- SANCHEZ-EUGENIA, R., GOIKOLEA, J., **GIL-CARTON, D.**, SANCHEZ-MAGRANER, L. & GUÉRIN, D.M.A. (2015). Triatoma Virus Recombinant VP4 Protein Induces Membrane Permeability through Dynamic Pores. *Journal of Virology*. 89(8), 4645-4654. DOI:10.1128/JVI.00011-15. (JCR, Q1).

- SANCHEZ-EUGENIA, R., GOIKOLEA, J., **GIL-CARTON, D.**, SANCHEZ-MAGRANER, L. & GUÉRIN, D.M.A. (2015). The Triatoma Virus Structural Protein VP4 Induces Membrane Permeability through Dynamic Pores. *Biophysical Journal*, 108(2), 83a. DOI:10.1016/j.bpj.2014.11.485. (JCR, Q1).
- SOT, J., MANNI, M.M., VIGUERA, A.R., CASTAÑEDA, V., CANO, A., ALONSO, C., **GIL, D.**, VALLE, M., ALONSO, A. & GOÑI, F.M. (2014). High-Melting Lipid Mixtures and the Origin of Detergent-Resistant Membranes Studied with Temperature-Solubilization Diagrams. *Biophysical Journal*, 107(12),2828-37. DOI:10.1016/j.bpj.2014.10.063, (JCR, Q1).
- LASSO, G., YU, L.P.C., **GIL, D.**, LÁZARO, M., TONG, L. & VALLE M. (2014). Functional Conformations for Pyruvate Carboxylase during Catalysis Explored by Cryoelectron Microscopy. *Structure*, 22(6), 911-2. DOI:10.1016/j.str.2014.04.011, (JCR, Q1).
- ESPERANZA, G., PIVA, M., RODRIGUEZ-SUAREZ, E., **GIL, D.**, ROYO, F., ELORTZA, F., FALCON-PEREZ J.M. & VIVANCO M.D.M. (2014). Human Mammospheres Secrete Hormone-Regulated Active Extracellular Vesicles. *PLoS ONE*, 9(1), e83955. DOI:10.1371/journal.pone.0083955. (JCR, Q1).
- PERALTA, B., **GIL-CARTON, D.**, CASTAÑO-DÍEZ, D., BERTIN, A., BOULOGNE, C., OKSANEN, H.M., BAMFORD, D.H. & ABRESCIA, N.G.A. (2013). Mechanism of Membranous Tunneling Nanotube Formation in Viral Genome Delivery. *PLoS Biology*, 11(9): e1001667. DOI:10.1371/journal.pbio.1001667. (JCR, Q1).
- AGIRREZABALA, X., FERNANDEZ, I.S., KELLEY, A.C., **GIL, D.**, RAMAKRISHNAN, V. & VALLE, M. (2013). The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO Reports*, 14(9), 811-816. DOI:10.1038/embor.2013.106. (JCR, Q1).
- LOPEZ-PERROTE, A., MUÑOZ-HERNANDEZ, H., **GIL, D.** & LLORCA, O. (2012). Conformational transitions regulate the exposure of a DNA-binding domain in the RuvBL1-RuvBL2 complex. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 11086-11099. DOI:10.1093/nar/gks871. (JCR, Q1).

- MECHALY, A.E., BELLOMIO, A., MORANTE, K., AGIRRE, J., **GIL-CARTON, D.**, VALLE, M., GONZÁLEZ-MAÑAS, J.M. & GUÉRIN, D.M.A. (2012). Pores of the toxin FraC assemble into 2D hexagonal clusters in both crystal structures and model membranes. *Journal of Structural Biology*, 180(2), 312-317. DOI:10.1016/j.jsb.2012.06.003. (JCR, Q1).
- BADIA-MARTINEZ, D., PERALTA, B., ANDRES, G., GUERRA, M., **GIL-CARTON, D.** & ABRESCIA, N.G.A. (2012). Three-dimensional visualization of forming Hepatitis C virus-like particles by electron-tomography. *Virology*, 430(2), 120-126. DOI:10.1016/j.virol.2012.05.001. (JCR, Q1).
- MELERO, R., BUCHWALD, G., CASTANO, R., RAABE, M., **GIL, D.**, LÁZARO, M., URLAUB, H., CONTI, E. & LLORCA, O. (2012). The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(5), 498-505. DOI:10.1038/nsmb.2287. (JCR, Q1).
- RENDON, A.^a, **GIL, D.^a**, SOT, J., GARCÍA-PACIOS M., MONTES L.R., VALLE, M., ARRONDO, J.L.R., GOÑI, F.M. & RUIZ-MIRAZO, K. (2012). Model Systems of Precursor Cellular Membranes: Long-Chain Alcohols Stabilize Spontaneously Formed Oleic Acid Vesicles. *Biophysical Journal*, 102(2), 278-286. DOI:10.1016/j.bpj.2011.12.026, (^a Co-first author). (JCR, Q1).
- JULIAN, P., MILON, P., AGIRREZABALA, X., LASSO, G., **GIL, D.**, RODNINA, M.V. & VALLE, M. (2011). The Cryo-EM Structure of a Complete 30S Translation Initiation Complex from *Escherichia coli*. *Plos Biology*, 9(7), e1001095. DOI:10.1371/journal.pbio.1001095. (JCR, Q1).
- LANDETA, O., LANDAJUELA, A., **GIL, D.**, TANEVA, S., DI PRIMO, C., SOT, B., VALLE, M., FROLOV, V.A. & BASAÑEZ, G. (2011). Reconstitution of Proapoptotic BAK Function in Liposomes Reveals a Dual Role for Mitochondrial Lipids in the BAK-driven Membrane Permeabilization Process. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8213-8230. DOI:10.1074/jbc.M110.165852. (JCR, Q1).
- MECHALY, A.E., BELLOMIO, A., **GIL-CARTON, D.**, MORANTE, K., VALLE, M., GONZÁLEZ-MAÑAS J.M. & GUÉRIN D.M.A. (2011). Structural Insights into the Oligomerization and Architecture of Eukaryotic Membrane Pore-Forming Toxins. *Structure*,

19(2), 181-191. DOI:10.1016/j.str.2010.11.013. (JCR, Q1).

- MELERO, R., RAJAGOPALAN, S., LAZARO, M., JOERGER, A.C., BRANDT, T., VEPRINTSEV, D.B., LASSO, G., **GIL, D.**, SCHERES, S.H.W., CARAZO, J.M., FERSHT, A.R. & VALLE M. (2011). Electron microscopy studies on the quaternary structure of p53 reveal different binding modes for p53 tetramers in complex with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 557-562. DOI:10.1073/pnas.1015520107. (JCR, Q1).
- LASSO, G., YU, L.P.C., **GIL, D.**, XIANG, S., TONG, L. & VALLE, M. (2010). Cryo-EM Analysis Reveals New Insights into the Mechanism of Action of Pyruvate Carboxylase. *Structure*, 18(10), 1300-1310. DOI:10.1016/j.str.2010.07.008. (JCR, Q1).
- LANDETA, O., LANDAJUELA, A., BUSTILLO, I., **GIL, D.**, VALLE, M., FROLOV, V. & BASAÑEZ, G. (2010). Dissecting the BAK-driven outer mitochondrial membrane permeabilization pathway using in vitro reconstituted systems. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797, 119-119. DOI:10.1016/j.bbabo.2010.04.355. (JCR, Q1).
- CONDE-VANCELLS, J., RODRIGUEZ-SUAREZ, E., GONZALEZ, E., BERISA, A., **GIL, D.**, EMBADE, N., VALLE, M., LUKA, Z., ELORTZA, F., WAGNER, C., LU, S.C., MATO J.M. & FALCON-PEREZ, M. (2010). Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics Clinical Applications*, 4(4), 416-425. DOI:10.1002/prca.200900103. (JCR, Q3).
- YU, L.P.C., XIANG, S., LASSO, G., **GIL, D.**, VALLE, M. & TONG, L. (2009). A Symmetrical Tetramer for *S. aureus* Pyruvate Carboxylase in Complex with Coenzyme A. *Structure*, 17(6), 823-832. DOI:10.1016/j.str.2009.04.008. (JCR, Q1).
- CONDE-VANCELLS, J., RODRIGUEZ-SUAREZ, E., EMBADE, N., **GIL, D.**, MATTHIESEN, R., VALLE, M., ELORTZA, F., LU S.C., MATO, J.M. & FALCON-PEREZ J.M. (2008). Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes. *Journal of Proteome Research*, 7(12), 5157-5166. DOI:10.1021/pr8004887. (JCR, Q1).
- JULIAN, P., KONEVEGA, A.L., SCHERES, S.H.W., LÁZARO, M., **GIL, D.**, WINTERMEYER, W., RODNINA, M.V. & VALLE, M. (2008). Structure of ratcheted

ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16924-16927. DOI:10.1073/pnas.0809587105. (JCR, Q1).

Participación en proyectos de investigación

- Estudios Estructurales del factor de restricción en complejo con ribosomas bacterianos 70s. BFU2012-34873. MINECO (Plan Nacional de I+D+I). CIC bioGUNE, Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias. Investigador principal: MIKEL VALLE. 01/01/2013 – 31/12/2015.
- Structural of enveloped and lipid-containing viruses: From Assembly to DNA translocation. BFU2012-33947. MINECO (Plan Nacional de I+D+I). CIC bioGUNE. Investigador principal: NICOLA ABRESCIA. 01/01/2013 – 31/12/2015.
- Estudios estructurales de la partícula subviral de hepatitis C y sus complejos con el receptor humano CD81. CIC bioGUNE. Plan Nacional de I+D+i Ministerio de Ciencia y Tecnología. Investigador principal: NICOLA ABRESCIA. 01/01/2010 – 2012.
- Estructura dinámica y variable de tetrámeros de p53 unidos a DNA. CIC bioGUNE, Plan Nacional de I+D+i Ministerio de Ciencia y Tecnología. Investigador principal: MIKEL VALLE. 01/10/2009 – 2011.
- MECHADIGIT - Sistema de Mecanizado y Digitalizado en una misma herramienta. Ingeniería Metrológica. INNOVALIA METROLOGY. Spain. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio (PROFIT). Investigador principal: OSCAR LÁZARO. Redactor de la primera propuesta del proyecto: **DAVID GIL**. 2005-Actualidad.

Patentes

- ABRESCIA, N.G.A., **GIL, D.**, CHALAU, C. Device for storing cryo-grid storage boxes. US 20130156659 A1. PCT/EP2011/057266. CIC bioGUNE. 2013.

Anexo

Software desarrollado para la implementación del esquema de control inteligente

8.1 Software Matlab para la programación de la GUI

This software package is written in MATLAB Programming Language. Its basic organization is based in the use of dedicated functions and subroutines that allows the automation of different modules to overcome different problems in single-particle cryo-EM data acquisition on our JEOL 200 kV electron microscope. This new software, based in Matlab, utilize a user-friendly GUI interface that permits the user to control the JEM2200FS microscope and acquire digital images with the Gatan CCD camera remotely. The software package is organized around a main window that displays two images, corresponding to Search mode and Photo mode, and basic information about microscope status. This design allows one to remotely monitor the cryo-EM single particle data acquisition process and to act easily if necessary; in so much as in this window there is a collection of control panels that provide the access to change any parameter of the microscope or the CCD camera.

Call to GUI interface function

```
function varargout = stage_movementv4(varargin)
% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name', mfilename, ...
                  'gui_Singleton', gui_Singleton, ...
```

```

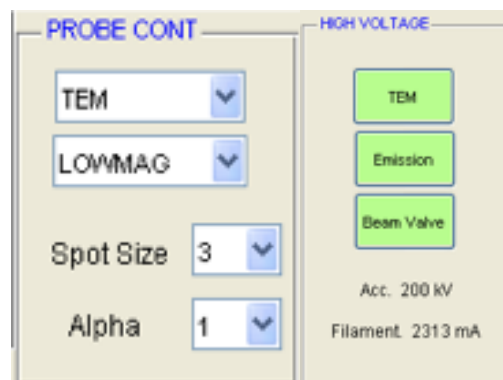
    'gui_OpeningFcn', @stage_movementv4_OpeningFcn, ...
    'gui_OutputFcn', @stage_movementv4_OutputFcn, ...
    'gui_LayoutFcn', [], ...
    'gui_Callback', []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end
if nargin
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% Open "Control PC client-TemNet server" communication to control the microscope via the
JEOL TEMCON interface.
h=startJEM(); % creates a COM server and returns TemNet COM object.
handles.h=h; % h is a steering handle of COM Automation TEM server.
% Open "Control PC client-GatanDM server" communication to obtain images from our CCD
camera through a plugin "COMExternalPlugIn.dll" in DigitalMicrograph (Gatan) software that
acts as a COM server.
g=startDM(); % creates a COM server and returns DM COM object.
handles.g=g; % g is a steering handle of COM Automation DM server.
Status and control of Electron Field Emission Gun (FEG):
% FEG Beam valve status:
GV = gvalve(h); %gvalve(h, SV); SV has the value of [0:off/1:on].
% HT Acceleration Voltaje status:
GS = ht_status(h); %GS has the value of [0:off/1:on/2:busy].
GVHT = accvol(h, 'status'); %GVHT has the value of [0:off/1:on/2:busy].
statusHT=GS*GVHT;
% Acceleration Voltaje value:
HT = num2str(accvol(h)); %HT has the value from 0[kV] to 200[kV] in the range.
acc=strcat('Acc. ', {' '}, HT, ' kV');
set(handles.text_acc, 'string', acc);
% Filament Current value:

```

```

FC = num2str(filamentc(h)); %FC has the value from 0[mA] to 4095[mA] in the range
fcurr=strcat('Filament. ',{ ' },FC,' mA');
set(handles.text_fc,'string',fcurr);
%TEM mode status:
GVTEM = temasid(h); %GVTEM has the value of [0:TEM/1:ASID].
funcmode(h, SM);
%SM has the value of [0:MAG1/1:MAG2/2:LOWMAG/3:SAMAG/4:DIFF].
% Spot size value status:
SPOT=strcat('Spot Size. ',{ ' },num2str(spotsize(h)+1));
%Alpha value status:
ALPHA=strcat('Alpha. ',{ ' },num2str(alphasel(h)+1));
%Probe mode status:
PROBE = probemode(h);
switch PROBE          case 0
PROBE = strcat('Probe Mode. ',{ ' },'TEM');

```



Status and control of transmission electron microscope lenses:

```

%Beam shift status:
[GX, GY] = algCL1(h);
%Magnification status and control:
[GM, V] = magsel(h); %GM has the value of from 0 to 49 in the range.
magmode=funcmode(h); % [0:MAG1/1:MAG2/2:LOWMAG/3:SAMAG/4:DIFF].
%Objective focus status and control:
FOCUS = strcat('Defocus:',{ ' },'0nm');
set(handles.text_defocus,'string',FOCUS);
flcmode(h, 6, 0);

```

```
flcmode(h, 7, 0);
```

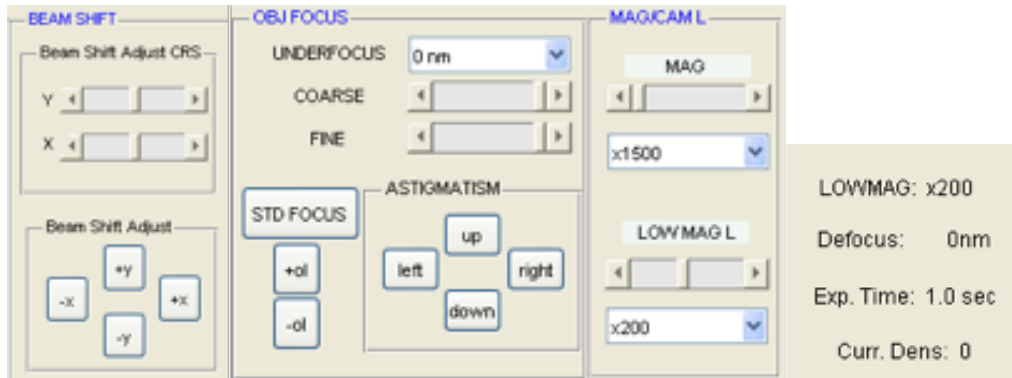
```
focObj(h, 32767); %Standard Focus
```

```
%Current Density value:
```

```
GD = num2str(curtdnsty(h)); %HT has the value from 0[kV] to 1300[kV] in the range.
```

```
currdens=streat('Curr. Dens: ', {' '},GD);
```

```
set(handles.text68,'string',currdens);
```



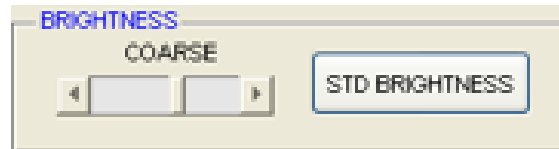
```
%Brightness control:
```

```
MDS=mdsmode(h);
```

```
GM = flcmode(h, 2);
```

```
flcCL3mod2(h, valor);
```

```
flcmode(h, 2, 0); %Standard brightness
```



Status and control of transmission electron microscope apertures:

```
%Aperture status and control:
```

```
aperture(h, A, S, X, Y, opt);
```

```
%A has the value of [1:CLA/3:HCOA/4:SAA/5:ENTA).
```

```
%S has the value of [1/2/3/4/open].
```

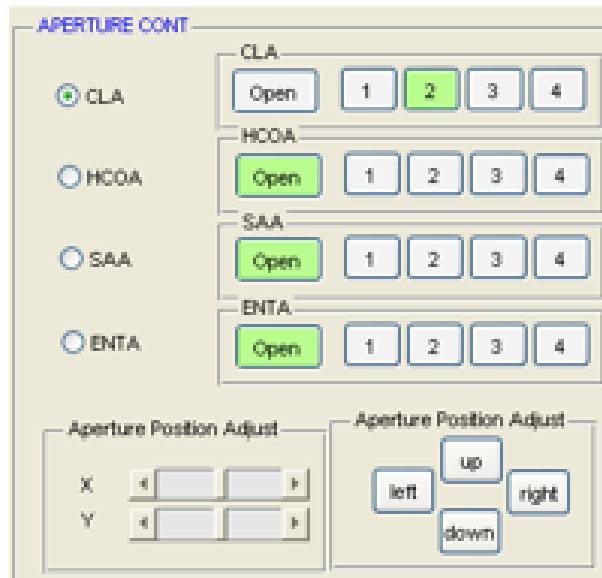
```
%X has the value of from 0[%] to 100[%] in the range.
```

```
%Y has the value of from 0[%] to 100[%] in the range.
```

```
[S1, X, Y] = aperture(h, 1); %CLA aperture
```

```
[S, X, Y] = aperture(h, 3); %HCOA aperture
```

```
aperture(h, 1, 0, X, Y); %CLA aperture positioning
```



Status and control of transmission electron microscope Omega Energy Filter:

Omega energy filter on JEOL transmission electron microscopes filters out inelastically scattered electrons forming zero-energy-loss images that improves contrast and increase signal-to-noise ratio. Energy filtering is accomplished introducing a slit with an energy range in electron volts to eliminate electrons outside this slit width. Our software provides the basic controls necessary for using an energy filter: slit insertion, slit width, and slit offset from the zero-loss peak.

%Spectra mode status:

GM = spcmmode(h); %GM has the value of [0:off/1:on].

%Energy shift status and control:

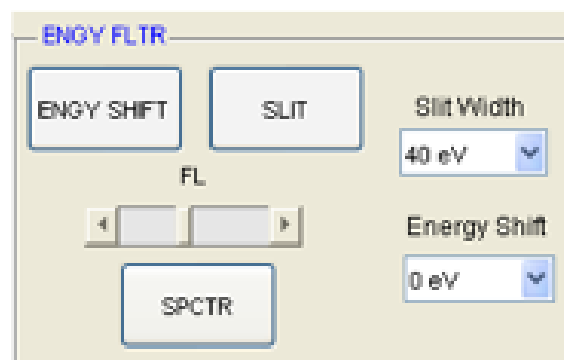
GM = engyshiftmode(h); %GM has the value of [0:off/1:on].

engyshift(h, b);

%Slit width and position status and control:

GM = slitpos(h);

slitwidth(h, 15); % Energy slit width of energy filter set up to 15 eV



Status and control of transmission electron microscope Minimum Dose System:

Our software system is based in the use of the specialized low dose system of JEOL electron microscope. In Search mode a magnification of 4,000x is used to navigate through a particular square in the grid. After one image is taken in Photo mode, usually between 40,000x and 80,000x, the software change to Search mode and select an no irradiated new hole area in Quantifoil EM grid, for subsequent defocus in Focus mode and imaging of this location at a higher exposure magnification in Photo mode.

%MDS status and control:

photostatus(h, GS);

%GS is [0:normal/1:valve/2:multi-exposure/3:Through Focus/4:AMS/5:MDS].

mdsmode(h, SM);

%SM has the value of [0:OFF/1:Serch/2:Focus/3:photofilm].

%Photo acquisition in analogical Kodak FILM support:

dmcamerainsert(g_cam, 0); %De-insertion on Gatan CCD camera before taking Photo on Film

filmfeed (h, SF); %acquiring Photo in film; SF has the value of [0>manual/1:auto(feed before shot)/2:auto(feed after shot)].

takephoto(h);



Status and control of goniometric piezo-controlled stage (Goniometer):

%Stage position status and control:

[X, Y, Z] = stagepos (h);

set(handles.poszmicras,'String',Z/1000);

set(handles.posxmicras,'String',X/1000);

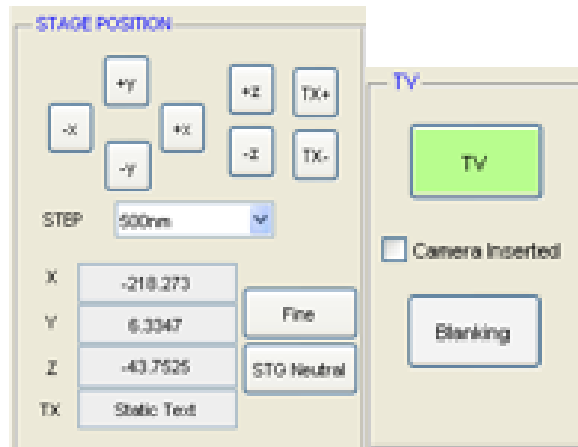
set(handles.posymicras,'String',Y/1000);

%Blanking control:

bblanking(h,0); %blanking OFF

%Screen position:

screenpos(h, 2); %TV screen open



Coordinate system transformation (rotation between x6000 and x8000 magnification):

Our software mimics the manual operating mode of a user driving a stage trackball while watching the moving on an analog TV camera or on a CCD camera running in continuous mode. To navigate sequentially through regularly spaced holes semi-automatic software should be capable of finding the next hole to image, using Search mode images and moving the stage properly to get the new area. In keeping with microscope conventions, the X axis corresponds to the tilt axis, the Z axis is along the beam, and the Y axis is orthogonal to the two. The movement of the stage in X and Y directions are transformed to image coordinates, using a calibration of the relation between the change in the mechanical piezo-controlled stage and the corresponding image shifts. In order to tune constant values in the coordinate system transformation (rotation) a “cross and line” grating replica grid was used.

In two dimensions, to carry out a rotation using matrices the point (x, y) to be rotated (orientation from positive x to y) is written as a vector, then multiplied by a matrix calculated from the angle, θ :

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$$

where (x', y') are the coordinates of the point that after rotation, and the formulae for x' and y' can be seen to be:

$$\begin{aligned} x' &= x \cos \theta - y \sin \theta \\ y' &= x \sin \theta + y \cos \theta. \end{aligned}$$

In three dimensions, a basic rotation (also called elemental rotation) is a rotation about one of the axes of a Coordinate system. The following three basic rotation matrices rotate vectors by an angle θ about the x , y , or z axis, in three dimensions, using the right hand rule.

$$R_z(\theta) = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta & 0 \\ \sin \theta & \cos \theta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

ANG=-34.5;

```

PARAM=24.303;
ORIGEN_X=256;
ORIGEN_Y=256;
dx=(D(i,2)-ORIGEN_X);
dy=(D(i,3)-ORIGEN_Y);
deltaX2=PARAM*((dx*cosd(ANG)-dy*sind(ANG))*cosd(6.8));
deltaY2=PARAM*(((dx*sind(ANG)+dy*cosd(ANG))-((dx*cosd(ANG)
+dy*sind(ANG))*sind(6.8)));
newX=(X-deltaX2);
newY=(Y-deltaY2);

```

The interface for microscope control allows to the software the tuning of different parameters of DigitalMicrograph, the software controlling UltraScan CCD camera. Digital images were recorded on an Ultrascan4000™ cooled CCD camera from Gatan (Pleasanton, CA) sited below the camera chamber, which is 4-port readout 4K x 4K 15-µm pixels camera. Digital images were recorded under low-dose conditions using DigitalMicrograph™ (Gatan) software.

Status and control of Digital Micrograph software to Gatan CCD camera control:

%Exposure time control:

```
exptime(h, ST);
```

%sets exp time ST; ST has the value of from 0[sec] to 180[sec] in the range.

%Screen position status:

```
GTV = screenpos(h);
```

%Blanking control:

```
bblanking(h,0); %Turn off the blanking
```

%Acquisition of the image in View mode:

```
viewed = dmacquire(g, pro, exp, bin, bin, at, al, ab, ar);
```

```
viewed = mat2gray( viewed ); % converting images to grayscale
```



8.2 Software Matlab para la navegación automática

Botón AUTOMATIC (navegación automática a través de los agujeros de la rejilla)

In automatic data collection mode, our data collection system sequentially select the next no-irradiated circular hole using images of Search mode at a magnification of 4,000x, for subsequent imaging in minimum dose conditions of these locations at a higher exposure magnification. The stage moves sequentially from one hole to the next along prefabricated grids (with regularly spaced holes), without the need for creating a complete grid atlas. After a sequence of processes: filtering, normalization, binarization and segmentation to obtain object characteristics, the software have coordinates in the Search mode image, of the next hole center to irradiate in Quantifoil R2/2 grid.

```
function Automatic_Callback(hObject, eventdata, handles)

%Magnification MDS Search mode must be selected to x4000

%Magnification MDS Photo mode: Selectable by the user between 40000x to 80000x

%Center of the image in Search mode obtained by DigitalMicrograph must be the center of the
image in Photo mode. This is pre-configured by the user using image shift and beam shift.

%A loop is created to explore the grid, imaging each hole in the selected square of the Q-foil
grid in minimum dose mode

set( handles.stopauto, 'userdata', 'off' );

while 1

    str = get( handles.stopauto, 'userdata' );

    if strcmp( str, 'on' ) % Comparison of character strings
        guidata(hObject, handles);

        break
    end
end
```

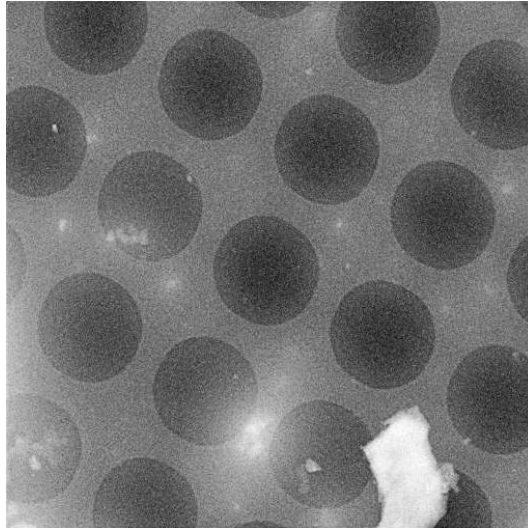
Paso 1: Se adquiere la imagen en el modo *Search*

```
viewed=acquire_MDSSearch_auto(hObject,eventdata, handles);
    bblanking(h,0); %Turn off blanking
    nummag= 4;
    magsel(h,nummag); % selection of x4000 magnification in Search mode
    pro = 3; % P(processing) has the value of [1:None/2:Dark/3:Gain&Dark].
    exp = str2num(get(handles.edit_expSA,'String')); % Exposure
    bin_val = get(handles.popupmenu_binningSA,'Value'); % Binning
    at = 0; al = 0; ab = handles.HH; ar = handles.WW; % Area
```

```

viewed = dmacquire(g, pro, exp, bin, bin, at, al, ab, ar); % Digital image acquisition
viewed = mat2gray(viewed); %converting the image to grayscale
}

```



Paso 2: Se ajusta el histograma para mejorar el SNR y se filtran las imágenes para reducir el ruido

```
% Enhances the contrast of images
```

```
J = histeq(viewed);
```

```
% Enhances the contrast of the grayscale image I by transforming the values using contrast-limited adaptive histogram equalization (CLAHE).
```

```
J = adapthisteq(J,'clipLimit',0.02,'Distribution','rayleigh');
```

```
% 2-D linear spatial averaging filter
```

```
h = fspecial('average',[3 3]);
```

```
J = imfilter(J,h);
```

```
% Median filtering is a nonlinear operation often used in image processing to reduce "salt and pepper" noise
```

```
J = medfilt2(J,[3 3]);
```

```
% Wiener2 lowpass-filters a grayscale image that has been degraded by constant power additive noise.
```

```
[J,noise]=wiener2(J,[5 5]);
```

```
% Adjust contrast of Grayscale image
```

```
mu = mean2(J); %computes the mean of the matrix.
```

```
sigma = std2(J); %computes the "standard deviation" of the matrix.
```

```
low_in = (mu-sigma)/255;
```

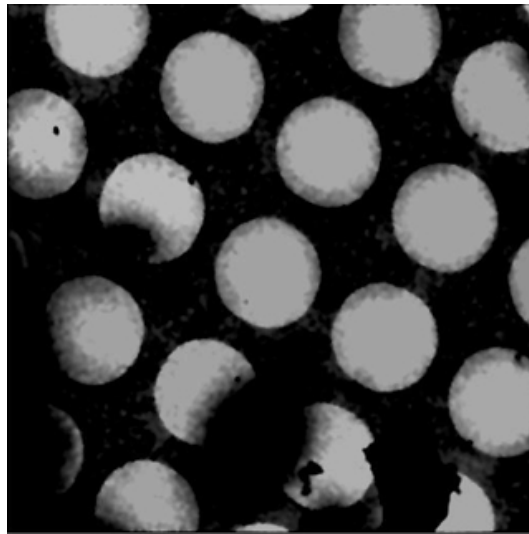
```
if low_in < 0
```

```
    low_in = 0;
```

```

end
high_in = (mu+sigma)/255;
if high_in > 1
high_in = 1;
end
J = imadjust(J, [low_in high_in], [0 1]);
% Suppress light structures connected to image border
J = imclearborder(J,4);

```



Paso 3: Se buscan los agujeros en la imagen en modo *Search*, utilizando el proceso de segmentación

```

% Definir CONSTANTES
cte_background=35;
area_max=10600;
area_min=1000;
eccentricity_min=0.2;
eccentricity_max=1.01;
noise_cte=3000;
Qfoil_cte=50; %Este valor dependerá del tipo de rejilla elegida. Normalmente serán Q-foil 2:1
Ymax=350; %Los agujeros por debajo de este valor no se consideran
th_min=0;
th_max=0.2;
[G,th1]=barrido(th_min,th_max,J,noise_cte,area_max,area_min,eccentricity_max,eccentricity_min);

```

```

background=imclose(J,strel('disk',cte_background)); %remove background
BW=~imsubtract(background,J);
% Segmentation is the process used for identifying objects in an image.
% Image thresholding to separate objets from its background. Thresholding is done by
specifying a threshold value in an image and converting it to binary image (black and white
image) using the threshold value.
% Global image threshold (level) using Otsu's method, which chooses the threshold to minimize
the intraclass variance of the black and white pixels.
level = graythresh(J);
% Convert image to binary image, based on threshold.
BW=im2bw(J,level);
% Remove small objects from binary image.
BW2=bwareaopen(BW,noise_cte);
% Fill image regions and holes in the binary image BW
fill=imfill(BW3,8,'holes');
% Remove noise near the edge of an object in an image
SE = strel('disk',5); % strel function creates a structuring element of the type specified by shape
seD = strel('diamond',5);
% The definition of a morphological opening of an image is an erosion followed by a dilation
% Erode the resulting mask by a certain amount to remove small spurious clusters.
% Dilate the eroded mask to get back to a smoother edge for your selected pixels.
fill = imdilate(imerode(fill,seD),SE);

```



```

%Multiply BW image with original image
ice_th=immultiply(I,fill);

```

```

% Find and label connected components in 2-D binary image.
[labeled,numObjects]=bwlabel(ice_th,4);

% Measures a set of properties for each connected component
stats_hole=regionprops(labeled_ice,ice_th,'MeanIntensity','MinIntensity','MaxIntensity','WeightedCentroid','Area','ConvexArea','ConvexImage','ConvexHull','Eccentricity','EquivalentDiameter','EulerNumber','Extent','FilledArea','MajorAxisLength','MinorAxisLength','Solidity');

areas=[stats.Area];

for idx=1:length(areas)

cent=props(idx).Centroid;

area=props(idx).Area;

eccentricity=props(idx).Eccentricity;

MeanIntensity=props(idx).MeanIntensity;

X=cent(1);Y=cent(2);

Paso 4: El modelo FIS de tipo Mamdani selecciona el siguiente mejor agujero a irradiar y el programa se mueve a este agujero seleccionado

a = readfis('seleccionFuzzydeagujeros.fis');

result=evalfis([Posición del agujero, área del agujero, grosor del hielo, número de partículas de contaminación, valor del astigmatismo, número de partículas válidas, valor del sub-enfoque, valor de intensidad media], a);

% Se calculan las rectas que forman los agujeros para intentar navegar a través de la línea más cercana al centro de la imagen

[A] = pendiente(G);

[rel] = relacion(A);

[m] = mayor(rel); % Se buscan las pendientes entre agujeros mayoritarias

[B] = findb(m,G);

[V] = mediarb(B); % Se busca el punto origen de esas rectas  $Y=m*X + V$ 

[D] = ordenar(G,V,m); % Se reordenan los agujeros después de eliminar los que no interesan

[point]=eliminar(D,Qfoil_cte,Ymax); % Se eliminan los centros demasiado cercanos entre si y los que estén por debajo del centro de la imagen. De esta forma nos movemos siempre hacia X más positivos en la rejilla (hacia arriba) y nos será suficiente con comenzar desde un lado inferior-derecha de la zona seleccionada

% El modelo FIS de tipo Mamdani intenta siempre seleccionar los agujeros más cercanos a la recta cerca del centro de la imagen

% Una vez seleccionado el siguiente agujero el goniómetro se mueve automáticamente hasta situarse en el agujero seleccionado siguiendo el sentido de navegación actual

handles.D=point;

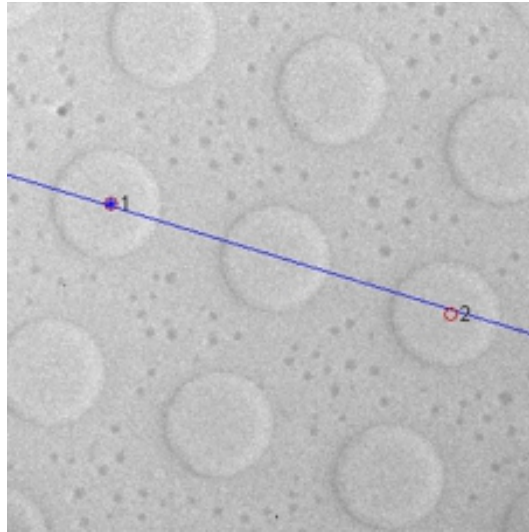
sentido=handles.SentidoMovimiento; %1 -> izquierda -1-> derecha

```

```

[G]=seleccionar_centro(point,sentido,hObject, eventdata, handles); {
% La posición inicial es el centro de la imagen X,Y=256,256 luego nos movemos al siguiente
centro más cercano.
h=handles.h; G=[0 0 0 0]; flag=0;
for i=1:(size(D,1))
    X=D(i,2);
    Y=D(i,3);
    d1=((X-256)^2+(Y-256)^2)^0.5;
    dx1=round((X-256).*sentido);
    if (dx1<0)&&(d1>20)
        if i<size(D,1)
            X2=D(i+1,2);
            Y2=D(i+1,3);
            dx2=round((X2-256).*sentido);
            d2=((X2-256)^2+(Y2-256)^2)^0.5;
            if (abs(dx2)<abs(dx1))&&(dx2<0)&&(d2>20)
                G=[1 D(i+1,2) D(i+1,3) D(i+1,4) D(i+1,5)];
                new_sentido=sentido;
                return
            else
                G=[1 D(i,2) D(i,3) D(i,4) D(i,5)];
                new_sentido=sentido;
                return
            end
        else
            G=[1 D(i,2) D(i,3) D(i,4) D(i,5)];
            new_sentido=sentido;
        end
    end
end }
if (G(1,2)||G(1,3))~0;

```



% Se muestra el nuevo centro seleccionado al que nos vamos a mover en rojo

```
i=1;
```

```
hold on
```

```
j=num2str(i);
```

```
plot(G(i,2),G(i,3),'*r');
```

```
move_auto(G,hObject,eventdata, handles);
```

% Una vez que llegamos al punto seleccionado se vuelven a buscar los centros de los agujeros y se busca el mas cercano al centro de la imagen. si el mas cercano esta alejado mas de una distancia determinada nos movemos a el.

% Adquirir la imagen en Search Mode

```
viewed=acquire_MDSSearch_auto(hObject,eventdata, handles);
```

% Se ajusta el histograma para tener mejor SNR

```
a=viewed;
```

% Histogram stretching

```
I_min = min(viewed(:));
```

```
I_max = max(viewed(:));
```

```
J = 255*(viewed-I_min)/(I_max-I_min);
```

```
J = uint8(J);
```

%Histogram equalization

```
J=adapthisteq(J);
```

% Filtro average

```
h = fspecial('average',[3 3]);
```

```
J=imfilter(J,h);
```

```

% Filtro median
    J = medfilt2(J,[3 3]);
%Filtro wiener
    [J,noise]=wiener2(J,[5 5]);
% Histogram adjustment
    % adjust the image to show the middle 68% of the image
    % middle 68% = mean +/- standard_deviation
    mu = mean2(J);
    sigma = std2(J);
    low_in = (mu-sigma)/255;
    if low_in < 0
        low_in = 0;
    end
    high_in = (mu+sigma)/255;
    if high_in > 1
        high_in = 1;
    end
    J = imadjust(J,[low_in high_in],[0 1]);
% Bandpass filtering
b_h = fir1(8,[.35 .7]);
h_h = ftrans2(b_h);
a2 = im2double(imfilter(J,h_h));
%Buscar agujeros
[new_G,th1]=barrido(0,0.2,a2,noise_cte,area_max,area_min,eccentricity_max,eccentricity_min)
axes(handles.real_image);
graficar_A(new_G);
[D]=centromascercano(new_G);
{
for i=1:size(new_G,1)
% Calculamos la distancia del centro de la imagen a cada nuevo punto calculado y se calcula el
mas cercano
    dPp(i)=((new_G(i,2)-256)^2+(new_G(i,3)-256)^2)^0.5;
end

```



```

% Se calcula el punto más cercano al centro de la imagen
[xm,im]=min(dPp);
if xm<70
    G=[1 new_G(im,2) new_G(im,3) new_G(im,4) 0];
else
    G=[1 0 0 0 0];
end
}
if D(1,2)||D(1,3)~0;
    i=1;
    hold on
    j=num2str(i);
    plot(D(i,2),D(i,3),'*r');
    move_auto(D,hObject,eventdata, handles);
{
% Moverse a la posicion seleccionada automaticamente en modo search x4000
[X,Y,Z]=stagepos(h);
if X ~= 0
    i=1;
%Ajuste parametros search mode mag x4000
    ANG=34.5;
    PARAM=24.303;
    corrX=1;
    corrY=1;
    ORIGEN_X=256;
    ORIGEN_Y=256;
    dx=(D(i,2)-ORIGEN_X);
    dy=(D(i,3)-ORIGEN_Y);
    deltaX2=corrX*PARAM*((dx*cosd(ANG)+dy*sind(ANG))*cosd(6.8));
    deltaY2=corrY*PARAM*((-dx*sind(ANG)+dy*cosd(ANG))-
        ((dx*cosd(ANG)+dy*sind(ANG))*sind(6.8)));
% Movimiento en pasos segun el valor de step en nm

```

```

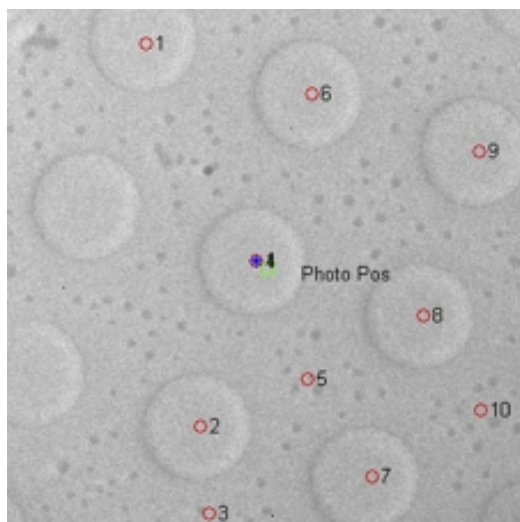
step=500; %valor en nm
time=1.0;
% Movimiento en direccion "y" corregida
[X, Y, Z] = stagepos (h);
set(handles.posymicras,'String',Y/1000);
dmin=step;
numy=abs(fix(deltaY2/step));
n=numy;
resty=abs(deltaY2)-numy*step;
resto=resty;
if n>0
    for i=1:n
        stagepos(h,0,-dmin*sign(deltaY2),0,'rel');
        pause(time);
        if i==1
            pause(3)
        end
        [X, Y, Z] = stagepos (h);
        set(handles.posymicras,'String',Y/1000);
        i=i+1;
    end
end
stagepos(h, 0,-(resto*sign(deltaY2)), 0,'rel');
pause(1);
[X, Y, Z] = stagepos (h);
set(handles.posymicras,'String',Y/1000);
% Movimiento en direccion "x" corregida
[X, Y, Z] = stagepos (h);
set(handles.posxmicras,'String',X/1000);
dmin=step;
numx=abs(fix(deltaX2/step));
n=numx;

```

```

restx=abs(deltaX2)-numx*step;
resto=restx;
if n>0
    for i=1:n
        stagepos(h,-dmin*sign(deltaX2),0,0,'rel');
        pause(time);
        if i==1
            pause(3)
        end
        [X, Y, Z] = stagepos (h);
        set(handles.posxmicras,'String',X/1000);
        i=i+1;
    end
end
stagepos(h,-(resto*sign(deltaX2)), 0, 0,'rel');
pause(1);
[X, Y, Z] = stagepos (h);
set(handles.posxmicras,'String',X/1000);
% Se muestra el nuevo centro al que nos hemos movido en azul
axes(handles.real_image)
hold on
graficar_A(D)
j=1;
px=D(j,2);
py=D(j,3);
plot(px,py,'b*')
pause(3)
end
}
end

```



Autofocusing system

Defocus and shape of the CTF is evaluated with a special function developed using the Automated CTF Estimation (ACE) Toolbox and Image Processing Toolbox, see Fig3. The system maintain under focus values between a defocus range of: from 1 μm to 5 μm , and if single particle detected in the ice have too low contrast the system automatically increase defocus value target.

% Recorded images are converted to MRC format and the CTF is calculated with ACE software

```
file_input=strcat('CTF_Data\mrcimages\Photo_',samplename,'_mag',mag,'_',date,'.mrc');
file_out=strcat('CTF_Data\ctffiles\Photo_',samplename,'_mag',mag,'_',date,'.ctf');
WriteMRC(double(acquired),1,file_input); %Toolbox EMIODist

bin_real=(4096./size(acquired,1));

resample_sel=1;

nocarbon=0;

display=1;

stig=1;

medium='ice';

dforig=2e-6;

tempdir='C:\Temp\';

powerfactor=0.3; % For cryo-EM 0.3

mkdir(tempdir)

[Ca]=pixelsize_mag(hObject,eventdata, handles, mag, binning);

ctfparams=ace_CIC2(file_input,file_out,display,stig,medium,dforig,resample_sel,tempdir,Ca,powerfactor);

handles.factor=factor;

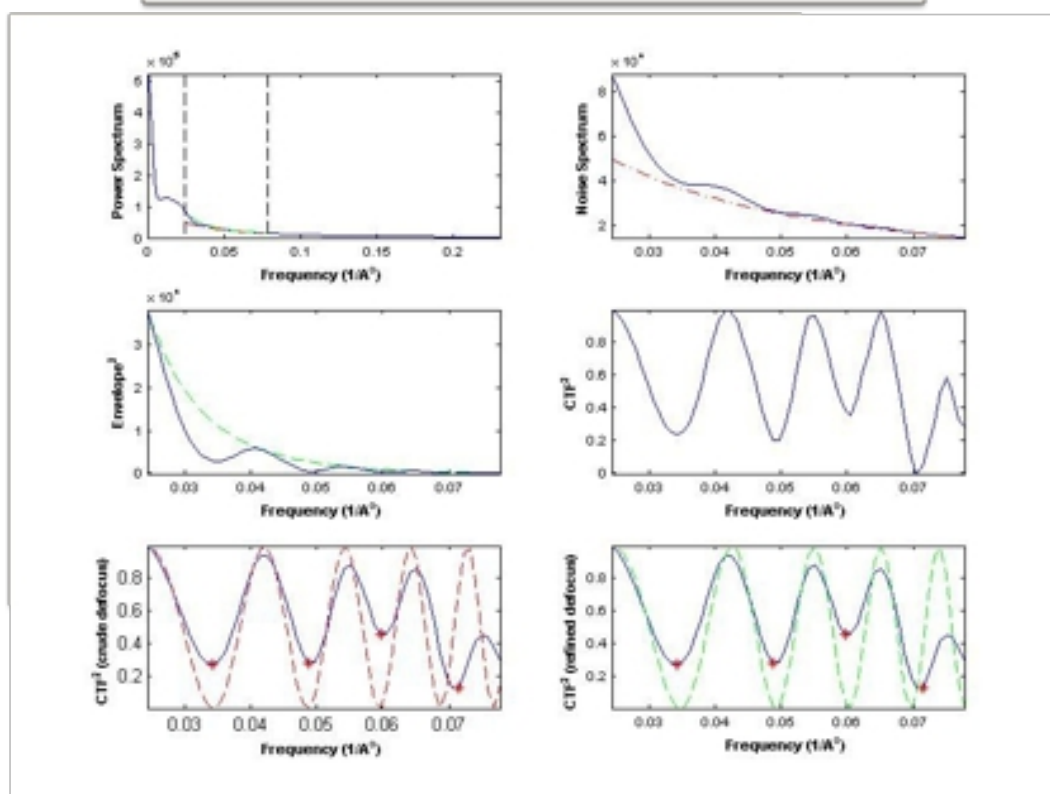
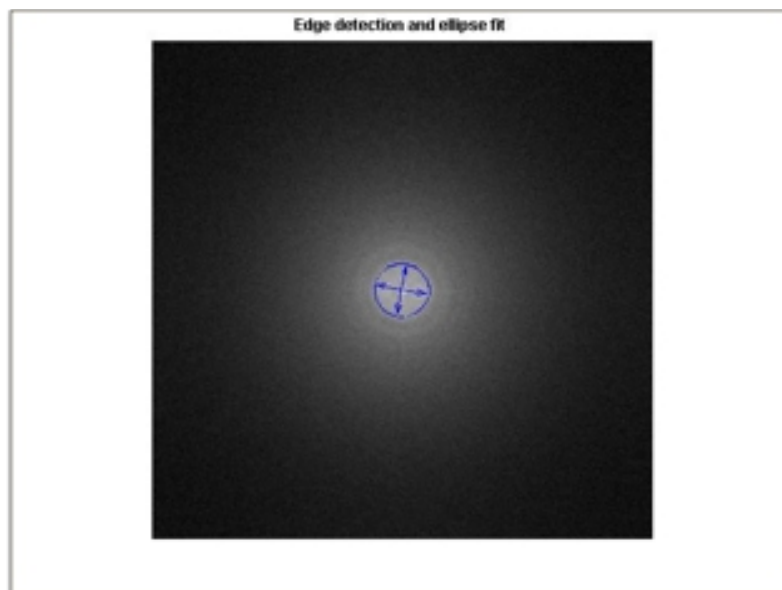
defocus_final=factor.*ctfparams(1)
```

```

defocus_small=factor.*ctfparams(2);
confidence=ctfparams(17)
astigmatism_ratio=ctfparams(18)
astigmatism_angle=ctfparams(19);

function
ctfparams =
ace_CIC2(filename,outfile,display,stig,medium,dforig,resample_sel,tempdir,Ca,powerfactor_sel
)
% Returns the parameters of the Contrast Transfer Function. %
ctfparams = ace(filename,outfile,display,stig,medium,dforig,tempdir);
filename: Name of the input mrc file.
outfile: The name of output file.
display: Boolean input to control the graphical display.
stig: Boolean switch to turn on astigmatism estimation.
medium: 'carbon' or 'ice'.
dforig: The defocus set by the microscope. It is used only when the edge detection fails. It defaults to -2um.
tempdir: Optional string argument to specify directory for temporary files.
Ca: Pixel size: The size of the pixel in Angstroms/pixel
ctfparams: Vector of ctf parameters. First two element give the defoci, the third value is Amplitude contrast, the forth value is the angle of astigmatism, elements 5-8 are the noise parameters and 9-12 are the envelope parameters.
    17 - conf Confidence on results
    18 - rat Astigmatism ratio
    19 - ang Astigmatism angle
% See also leginon_ace_gui and acedemo.
% Copyright 2004-2005 Satya P. Mallick.

```



Astigmatism automatic correction:

Astigmatism must be avoided and corrected, before the final image is acquired. Our software system uses a diffractogram based method (Saxton et al., 1983) for determining defocus and stigmatism correction. The software calculate astigmatism in real time and launch a process to automatically adjust the objective lens stigmator by measuring the ellipticity of the Fourier contrast transfer function (CTF) rings to minimize the astigmatism (Saxton et al., 1983). The algorithm identifies Thon rings in the power spectrum density (PSD) and uses them to estimate astigmatism and defocus together with their uncertainties, see Fig 4. For the astigmatism estimation ACE use a transformation to polar coordinates to fit ellipses to the Thon rings.

```

function controlAstigmatism(hObject,eventdata, handles,ctfparams)
h=handles.h;
factor=handles.factor;
if (ctfparams(17)>0.8)
    defocus=factor*ctfparams(1);
    astigmatism_angle=ctfparams(19);
    i=1;
    astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
    if (astigmatism_ratio(i)<0.9)
        value_ini=-0.2;
        while 1
            [GX, GY] = stgOLs(h);
            if (astigmatism_ratio(i)>0.9) % Comparison of character strings
                break
            end
            %Modificamos el astigmatismo en X para corregirlo
            newGX=GX+value_ini;
            stgOLs(h, newGX, GY);
            [ctfparams]=acquire_MDSPhoto_auto(hObject,eventdata, handles);
            i=i+1;
            astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
            if (astigmatism_ratio(i)>astigmatism_ratio(i-1))
                value=value_ini;
            else
                value=-value_ini;
                newGX=GX+value;
                stgOLs(h, newGX, GY);
                [ctfparams]=acquire_MDSPhoto_auto(hObject,eventdata, handles);
                astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
            end
            if (astigmatism_ratio(i)>0.9) % Comparison of character strings
                break

```

```

end
while 1
    newGX=newGX+value;
    stgOLs(h, newGX, GY);
    [ctfparams]=acquire_MDSPhoto_auto(hObject,eventdata, handles);
    i=i+1;
    astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
    if (astigmatism_ratio(i)<astigmatism_ratio(i-1))
        newGX=newGX-value;
        stgOLs(h, newGX, GY);
        astigmatism_ratio(i)=astigmatism_ratio(i-1);
        break
    end
end
end
if (astigmatism_ratio(i)>0.9) % Comparison of character strings
    break
end
%Modificamos el astigmatismo en Y para corregirlo
newGY=GY+value_ini;
stgOLs(h, newGX, newGY);
[ctfparams]=acquire_MDSPhoto_auto(hObject,eventdata, handles);
i=i+1;
astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
if (astigmatism_ratio(i)>astigmatism_ratio(i-1))
    value=value_ini;
else
    value=-value_ini;
    newGY=newGY+value;
    stgOLs(h, newGX, newGY);
    [ctfparams]=acquire_MDSPhoto_auto(hObject,eventdata, handles);
    astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
end
end

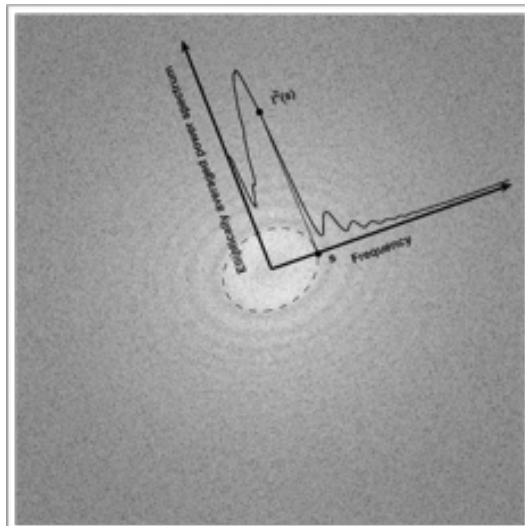
```



```

while 1
    newGY=newGY+value;
    stgOLs(h, newGX, newGY);
    [ctfparams]=acquire_MDSPhoto_auto(hObject,eventdata, handles);
    i=i+1;
    astigmatism_ratio(i)=ctfparams(18);
    if (astigmatism_ratio(i)<astigmatism_ratio(i-1))
        newGY=newGY-value;
        stgOLs(h, newGX, newGY);
        astigmatism_ratio(i)=astigmatism_ratio(i-1);
        value_ini=value_ini/2;
        break
    end
end
end
end
end
end
end
guidata(hObject, handles);

```



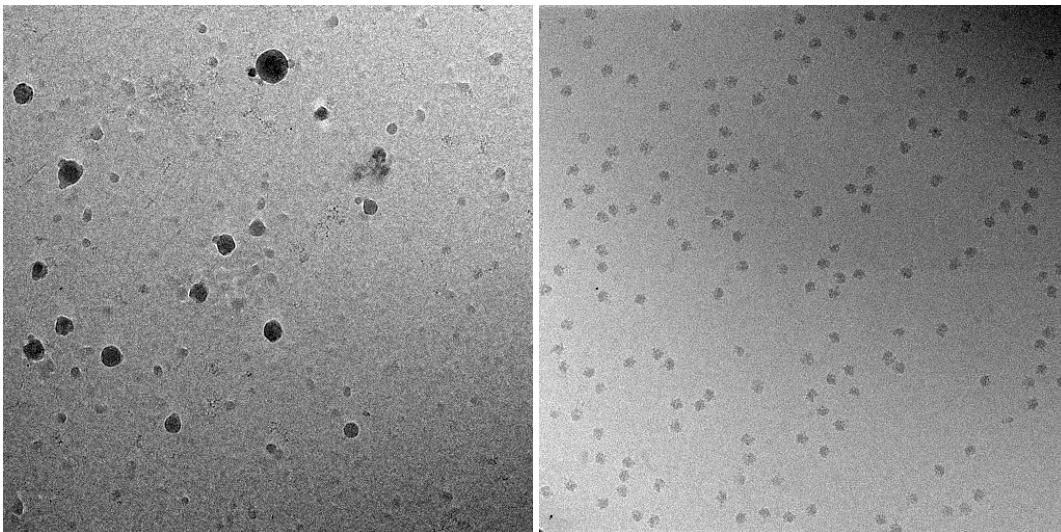
8.3 Software Matlab para la identificación de partículas individuales en imágenes para cryo-EM

% Adquisición de la imagen en modo Photo

%Read grayscale image

```
viewed=imread(strcat(Path,FileNamenew,int2str(i_trn),'.tif'));
```

```
viewed = imresize(viewed, 0.5);
```



%Buscar Single Particles

% Preprocessing

%Filtrado to reduce noise

%Image filtering and contrast improving.Adaptive histogram equalization(CLAHE)

```
J=adaphisteq(viewed,'clipLimit',0.02,'Distribution','rayleigh');
```

% Filtro average. Averaging filter

```
h = fspecial('average',[5 5]);
```

```
J=imfilter(J,h);
```

% Median filter.2-D median filtering

```
J = medfilt2(J,[5 5]);
```

% Filtro wiener. Adaptive Wiener filtering

```
[J,noise]=wiener2(J,[7 7]);
```

% Sharpening an image using an unsharp filter

% Creating the unsharp filter

```
fsharp=fspecial('unsharp');
```

% Applying the filter to the image data

```
J=imfilter(J,fsharp);
```

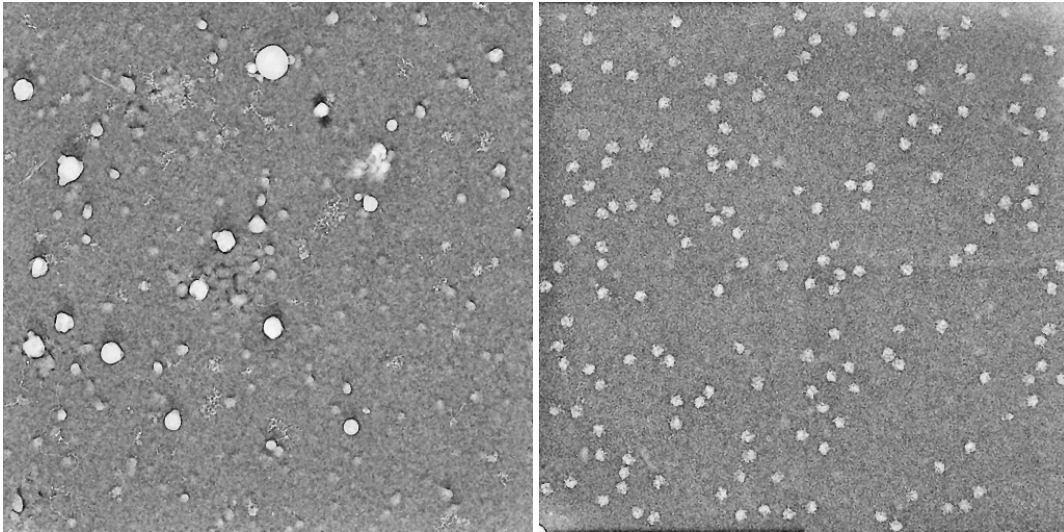
% Histogram stretching

```

Id = double(J);
I_min = min(Id(:));
I_max = max(Id(:));
J = 255*(Id-I_min)/(I_max-I_min);
J = uint8(J);
% Histogram equalization
J = wiener2(J,[5 5]);
% Use imadjust to brighten the image:
max_normalized = double(max(J(:)))/255;
J5 = imadjust(J, [0 max_normalized]);
J9=imcomplement(J5);
% Histogram equalization to improve contrast
%Image filtering and contrast improving.Adaptive histogram equalization(CLAHE)
J=adaphisteq(viewed,'clipLimit',0.02,'Distribution','rayleigh');
% Filtro average. Averaging filter
h = fspecial('average',[5 5]);
J=imfilter(J,h);
% Median filter.2-D median filtering
J = medfilt2(J,[5 5]);
% Filtro wiener. Adaptive Wiener filtering
[J,noise]=wiener2(J,[7 7]);
% Adjust the image intensity
mu = mean2(J); %computes the mean of the matrix.
sigma = std2(J); %computes the istandard deviation of the matrix.
low_in = (mu-sigma)/255;
if low_in < 0
low_in = 0;
end
high_in = (mu+sigma)/255;
if high_in > 1
high_in = 1;
end
J = imadjust(J,[low_in high_in],[0 0.9]);
% Sharpening an image using an unsharp filter
% Creating the unsharp filter
fsharp=fspecial('unsharp');
% Applying the filter to the image data

```

```
J=imfilter(J,fsharp);
```



```
% Histogram stretching
```

```
Id = double(J);
```

```
I_min = min(Id(:));
```

```
I_max = max(Id(:));
```

```
J = 255*(Id-I_min)/(I_max-I_min);
```

```
J = uint8(J);
```

```
% Histogram equalization
```

```
J = wiener2(J,[5 5]);
```

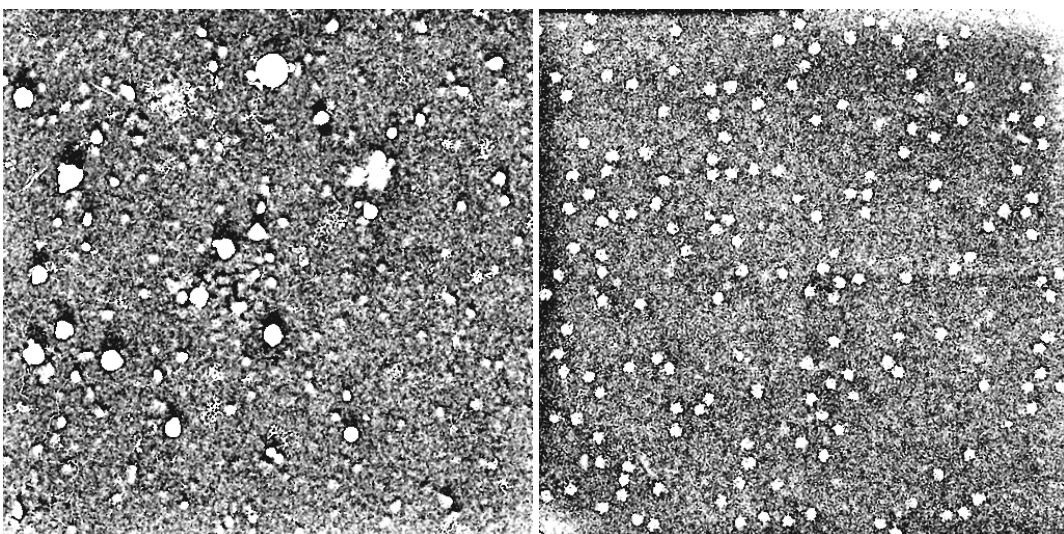
```
% Use imadjust to brighten the image:
```

```
max_normalized = double(max(J(:)))/255;
```

```
J5 = imadjust(J, [0 max_normalized]);
```

```
% Invertir la escala de grises
```

```
J9=imcomplement(J5);
```



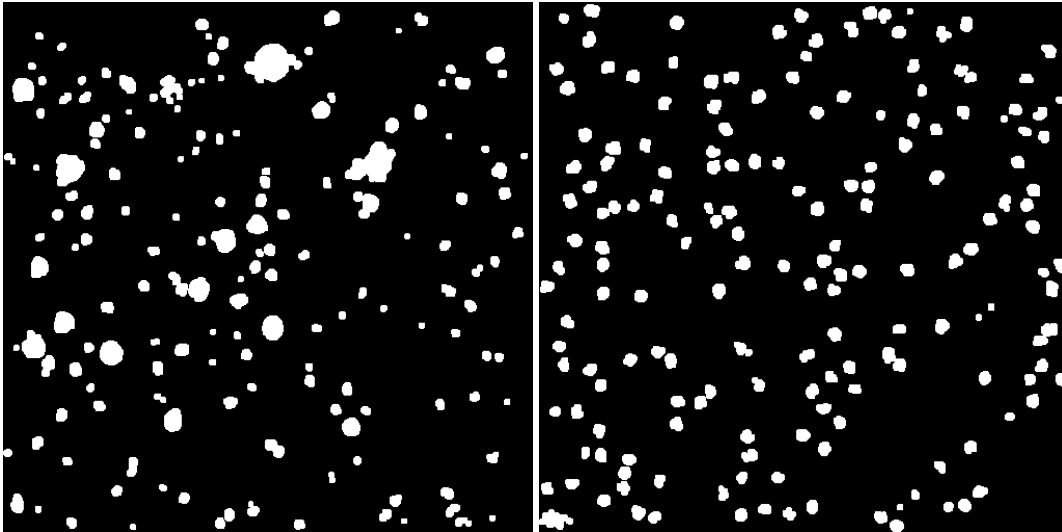
```
%Image thresholding to separate objetos from its background
```

```

%Definir constantes para la detección de partículas
cte_background=25;
noise_cte=90;
cte_dilate=14;
cte_erode=3;
cte_segmentacion=0.15;
background=imclose(J9,strel('disk',cte_background)); %remove background
BW=~imsubtract(background,J9);
%'Remove small objects from binary image'
BW1=bwareaopen(BW,noise_cte);
BW2=imclearborder(BW1,8);
SEs=strel('square',2);
BW2=imclose(BW2,SEs);
SE = strel('disk',cte_dilate);
seD = strel('diamond',cte_erode);
fill1 = imdilate(imerode(BW2,seD),SE);
%Detección de partículas a partir de segmentación (detección de bordes)
cte_segmentacion=0.12;
BW_s=edge(J9,'sobel',(graythresh(J9))*cte_segmentacion);
se90=strel('line',2,90);
se0=strel('line',2,0);
BWsdil=imdilate(BW_s,[se90 se0]);
BWnobord=imclearborder(BWsdil,8);
SE = strel('disk',cte_dilate);
seD = strel('diamond',cte_erode);
BWnonoise = imdilate(imerode(BWnobord,seD),SE);
seD = strel('diamond',1);
BWfinal=imerode(BWnonoise,seD);
BWfinal=imerode(BWfinal,seD);
%Tercer método de detección por texture
%Use entropyfilt to create a texture image. The function entropyfilt returns an array where each
output pixel contains the entropy value of the 9-by-9 neighborhood around the corresponding
pixel in the input image I. Entropy is a statistical measure of randomness.
Ev = entropyfilt(J9);
SE = strel('disk',15);
Evd = imdilate(~Ev,SE);
%Se multiplica el resultado de los tres métodos de detección
BWm=immultiply(fill1,BWfinal);

```

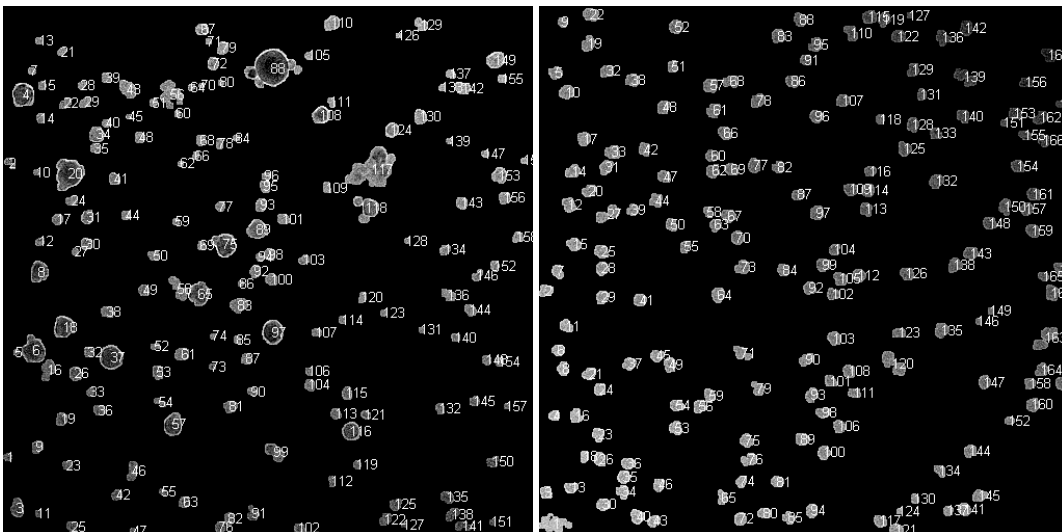
```
Bwm=immultiply(BWm,Evd);
```



```
% Multiply BW image with original image
```

```
ice_th=immultiply(viewed,BWm);
```

```
[labeled_ice,numObjects_ice]=bwlabel(ice_th,4);
```



```
stats_particles=regionprops(labeled_ice,ice_th,'MeanIntensity','MinIntensity','MaxIntensity','WeightedCentroid','Area','ConvexArea','ConvexImage','ConvexHull','Eccentricity','EquivDiameter','EulerNumber','Extent','FilledArea','MajorAxisLength','MinorAxisLength','Solidity');
```

```
% Feature extraction and segmentation
```

```
h_dist=@(x,y)sqrt((y(1)-x(1))*(y(1)-x(1))+(y(2)-x(2))*(y(2)-x(2)));
```

```
cte_bordes=double(uint8(4*(length(viewed))/100));
```

```
k=1;
```

```
% GRID Q foil 2-1
```

```
intensidadParticles=[stats_particles.MeanIntensity];
```

```
intensidadmediaParticles=uint8(mean(intensidadParticles));
```

```
cte_mean_int_min=intensidadmediaParticles-0.06*intensidadmediaParticles;
```

```

cte_mean_int_max=intensidadmediaParticles+0.06*intensidadmediaParticles;
%Se calculan las partículas por el método combinado
m=0;
m_bad=1;
hdet=figure;
imshow(viewed);
for idx=1:length(stats)
    cent=double(stats_particles(idx).WeightedCentroid);
    area=[stats_particles(idx).Area];
    intensity_Mean=double(stats_particles(idx).MeanIntensity);
    intensity_Maxima=double(stats_particles(idx).MaxIntensity);
    intensity_Minimun=double(stats_particles(idx).MinIntensity);
    extentgrises_value=double(stats_particles(idx).Extent);
    equivdiametergrises_value=double(stats_particles(idx).EquivDiameter);
    eccentricity_value=double(stats_particles(idx).Eccentricity);
    mean_int_value=uint16([stats_particles(idx).MeanIntensity]);
    max_int=[stats_particles(idx).MaxIntensity];
    min_int=[stats_particles(idx).MinIntensity];
    diferenciaintensidad=max_int-min_int;
    soliditygrises_value=double(stats_particles(idx).Solidity);
    X=cent(1);Y=cent(2);
    dist_vect([1:length(stats)])=0;
    for j=1:(length(stats))
        if j~=idx
            dist_vect(j)=h_dist(stats(idx).BoundingBox(1:2),stats(j).BoundingBox(1:2));
        else
            dist_vect(j)=2048;
        end
    end
    somehole=1;
    m=m+1;
    dist_tmp=[dist];
    a_tmp=[m X Y area eccentricity_value intensity_Mean];
    extremos_tmp=double(stats(idx).Extrema);
    eulernumber_tmp=double(stats_particles(idx).EulerNumber);
    extent_tmp=double(stats_particles(idx).Extent);
    filledarea_tmp=double(stats_particles(idx).FilledArea);

```

```

majoraxislength_tmp=double(stats_particles(idx).MajorAxisLength);
minoraxislength_tmp=double(stats_particles(idx).MinorAxisLength);
centgrises_tmp=double(stats_particles(idx).WeightedCentroid);
intensidadmedia_tmp=double(stats_particles(idx).MeanIntensity);
intensidadmaxima_tmp=double(stats_particles(idx).MaxIntensity);
intensidadminima_tmp=double(stats_particles(idx).MinIntensity);
areagrises_tmp=double(stats_particles(idx).Area);
convexareagrises_tmp=double(stats_particles(idx).ConvexArea);
eccentricitygrises_tmp=double(stats_particles(idx).Eccentricity);
equivdiametergrises_tmp=double(stats_particles(idx).EquivDiameter);
extentgrises_tmp=double(stats_particles(idx).Extent);
soliditygrises_tmp=double(stats_particles(idx).Solidity);
if m==1
    distancia=[dist_tmp];
    D=[a_tmp];
    extremos=[extremos_tmp];
    eulernumber=[eulernumber_tmp];
    extent=[extent_tmp];
    filledarea=[filledarea_tmp];
    majoraxislength=[majoraxislength_tmp];
    minoraxislength=[minoraxislength_tmp];
    centgrises=[centgrises_tmp];
    intensidadmedia=[intensidadmedia_tmp];
    intensidadmaxima=[intensidadmaxima_tmp];
    intensidadminima=[intensidadminima_tmp];
    areagrises=[areagrises_tmp];
    convexareagrises=[convexareagrises_tmp];
    holetype_cte=convexareagrises./areagrises;
    eccentricitygrises=[eccentricitygrises_tmp];
    equivdiametergrises=[equivdiametergrises_tmp];
    extentgrises=[extentgrises_tmp];
    soliditygrises=[soliditygrises_tmp];
else
    stats_good(idx)=stats(idx);
    distancia=[distancia;dist_tmp];
D=[D;a_tmp];
extremos=[extremos;double(stats(idx).Extrema)];

```



```

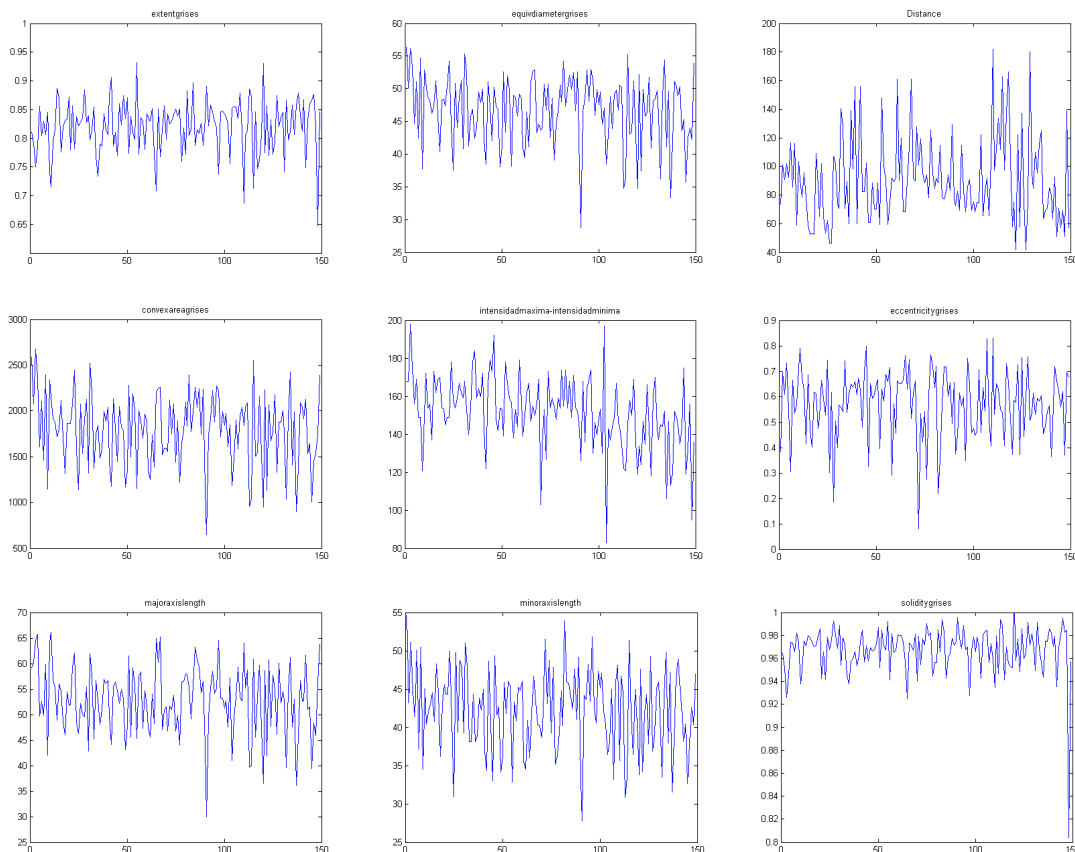
    eulernumber=[eulernumber;double(stats_particles(idx).EulerNumber)];
    extent=[extent;double(stats_particles(idx).Extent)];
    filledarea=[filledarea;double(stats_particles(idx).FilledArea)];
    majoraxislength=[majoraxislength;double(stats_particles(idx).MajorAxisLength)];
    minoraxislength=[minoraxislength;double(stats_particles(idx).MinorAxisLength)];
    centgrises=[centgrises;double(stats_particles(idx).WeightedCentroid)];
    intensidadmedia=[intensidadmedia;double(stats_particles(idx).MeanIntensity)];
    intensidadmaxima=[intensidadmaxima;double(stats_particles(idx).MaxIntensity)];
    intensidadminima=[intensidadminima;double(stats_particles(idx).MinIntensity)];
    areagrises=[areagrises;double(stats_particles(idx).Area)];
    convexareagrises=[convexareagrises;double(stats_particles(idx).ConvexArea)];
    eccentricitygrises=[eccentricitygrises;double(stats_particles(idx).Eccentricity)];
    equivdiametergrises=[equivdiametergrises;double(stats_particles(idx).EquivDiameter)];
    extentgrises=[extentgrises;double(stats_particles(idx).Extent)];
    soliditygrises=[soliditygrises;double(stats_particles(idx).Solidity)];
end
else
    a_tmp=[m X Y area eccentricity_value intensity_Mean];
    if m_bad==1
        D_bad=[a_tmp];
    else
        D_bad=[D_bad;a_tmp];
    end
    m_bad=m_bad+1;
end
end
distancia_final=[distancia_final;distancia];
filledarea_final=[filledarea_final;filledarea];
majoraxislength_final=[majoraxislength_final;majoraxislength];
minoraxislength_final=[minoraxislength_final;minoraxislength];
intensidadmedia_final=[intensidadmedia_final;intensidadmedia];
intensidadmaxima_final=[intensidadmaxima_final;intensidadmaxima];
intensidadminima_final=[intensidadminima_final;intensidadminima];
convexareagrises_final=[convexareagrises_final;convexareagrises];
eccentricitygrises_final=[eccentricitygrises_final;eccentricitygrises];
equivdiametergrises_final=[equivdiametergrises_final;equivdiametergrises];
extentgrises_final=[extentgrises_final;extentgrises];

```

```

soliditygrises_final=[soliditygrises_final;soliditygrises];
diferenciaintensidad_final=intensidadmaxima_final-intensidadminima_final;
discrimitarotyfeatures=[filledarea_final eccentricitygrises_final extentgrises_final diferenciain-
tensidad_final distancia_final soliditygrises_final minoraxislength_final majoraxislength_final];
for i_discr=1:length(discrimitarotyfeatures)
text(D(i_discr,2),D(i_discr,3), num2str(i_discr),'color','r');
test=discrimitarotyfeatures(i_discr,:);

```

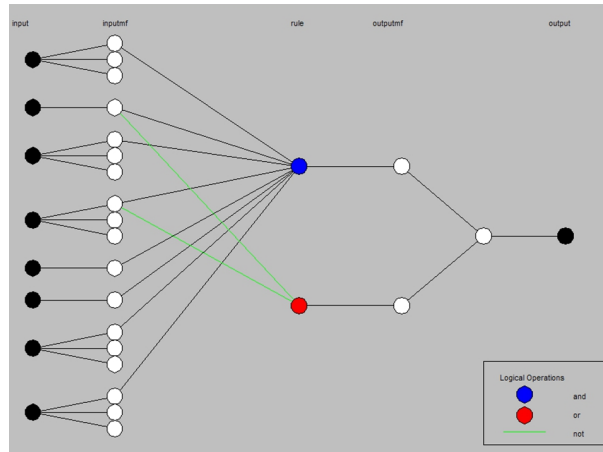


% Evaluación del tipo de partícula en función del resultado de cada ANFIS

```

fismat_80S= readfis('ANFIS_80S.fis');
eval_80S=evalfis(test, fismat_80S);
fismat_40S = readfis('ANFIS__40S.fis');
eval_40S=evalfis(test, fismat_40S);
fismat_contamination = readfis('ANFIS_ContaminationParticles.fis');
eval_contamination=evalfis(test, fismat_contamination);
fismat_virus = readfis('ANFIS_Virus.fis');
eval_virus=evalfis(test, fismat_virus);
fismat_disomes = readfis('ANFIS_Disomes80S.fis');
eval_disomes=evalfis(test, fismat_disomes);

```



```

evaluation=[eval_80S eval_40S eval_contamination eval_virus eval_disomes];
eval_selection=(evaluation==max(evaluation));
if
(eval_selection(1)==1)&&(isempty(D_80S)==0)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_80S>0)&
&(sum(eval_selection)==1)
    D_80S=[D_80S;D(i_discr,:)];
else if (eval_selection(1)==1)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_80S>0)&&(sum(eval_selec-
tion)==1)
    D_80S=D(i_discr,:);
end
end
if
(eval_selection(2)==1)&&(isempty(D_40S)==0)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_40S>0)&
&(sum(eval_selection)==1)
    D_40S=[D_40S;D(i_discr,:)];
else if (eval_selection(2)==1)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_40S>0)&&(sum(eval_selec-
tion)==1)
    D_40S=D(i_discr,:);
end
end
if (eval_selection(3)==1)&&(isempty(D_contamination)==0)
    D_contamination=[D_contamination;D(i_discr,:)];
else if (eval_selection(3)==1)
    D_contamination=D(i_discr,:);
end
end
if
(eval_selection(4)==1)&&(isempty(D_virus)==0)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_virus>0)
&&(sum(eval_selection)==1)
    D_virus=[D_virus;D(i_discr,:)];

```

```

else if (eval_selection(4)==1)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_virus>0)&&(sum(eval_selec-
tion)==1)
    D_virus=D(i_discr,:);
    end
end
if (eval_selection(5)==1)&&(isempty(D_disomes)==0)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_di-
somes>0)&&(sum(eval_selection)==1)
D_disomes=[D_disomes;D(i_discr,:)];
else if (eval_selection(5)==1)&&(eval_selection(3)~=1)&&(eval_disomes>0)&&(sum(eval_se-
lection)==1)
    D_disomes=D(i_discr,:);
    end
end
end
h=figure;
imshow(viewed);
if (isempty(D_80S)==0)
    %Crear un archivo .txt con las coordenadas de los objetos detectados de
    %ribosomes 80S
    ParticleFilepos=strcat(Path,FileNamenew,'_80S',int2str(i_trn),'.pos');
    fileID = fopen(ParticleFilepos,'w');
    fprintf(fileID, '# XMIPP_STAR_1 *\n');
    fprintf(fileID, 'data_DefaultFamily\n');
    fprintf(fileID, 'loop_\n');
    fprintf(fileID, '_xcoord\n');
    fprintf(fileID, '_ycoord\n');
    Dxy=[D_80S(:,2) D_80S(:,3)];
    fprintf(fileID,' %6.0f %6.0f\n',Dxy);
    fclose(fileID);
    color='ro';
    graficar_A(D_80S,color);
end
if (isempty(D_40S)==0)
    %Crear un archivo .txt con las coordenadas de los objetos detectados de
    %ribosomes 40S
    ParticleFilepos=strcat(Path,FileNamenew,'_40S',int2str(i_trn),'.pos');
    fileID = fopen(ParticleFilepos,'w');
    fprintf(fileID, '# XMIPP_STAR_1 *\n');

```

```

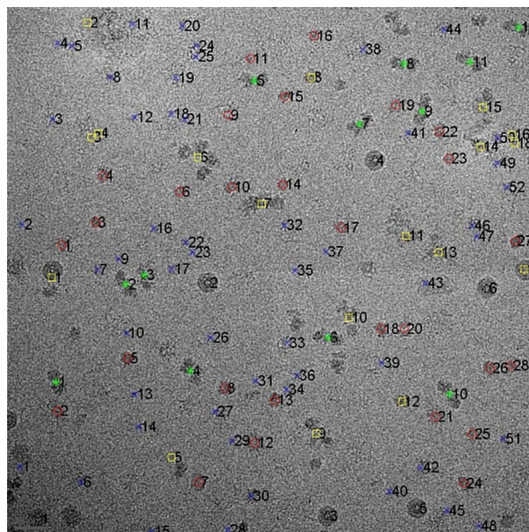
fprintf(fileID, 'data_DefaultFamily\n');
fprintf(fileID, 'loop_\n');
fprintf(fileID, ' _xcoor\n');
fprintf(fileID, ' _ycoor\n');
Dxy=[D_40S(:,2) D_40S(:,3)];
fprintf(fileID,'  %6.0f  %6.0f\n',Dxy);
fclose(fileID);
color='bx';
graficar_A(D_40S,color);
end
if (isempty(D_contamination)==0)
    %Crear un archivo .txt con las coordenadas de los objetos detectados de
    %contamination particles
    ParticleFilepos=strcat(Path,FileNamenew,'_contamination',int2str(i_trn),'.pos');
    fileID = fopen(ParticleFilepos,'w');
    fprintf(fileID, '# XMIPP_STAR_1 *\n');
    fprintf(fileID, 'data_DefaultFamily\n');
    fprintf(fileID, 'loop_\n');
    fprintf(fileID, ' _xcoor\n');
    fprintf(fileID, ' _ycoor\n');
    Dxy=[D_contamination(:,2) D_contamination(:,3)];
    fprintf(fileID,'  %6.0f  %6.0f\n',Dxy);
    fclose(fileID);
    color='ys';
    graficar_A(D_contamination,color);
end
if (isempty(D_virus)==0)
    %Crear un archivo .txt con las coordenadas de los objetos detectados de
    %viruses particles
    ParticleFilepos=strcat(Path,FileNamenew,'_viruses',int2str(i_trn),'.pos');
    fileID = fopen(ParticleFilepos,'w');
    fprintf(fileID, '# XMIPP_STAR_1 *\n');
    fprintf(fileID, 'data_DefaultFamily\n');
    fprintf(fileID, 'loop_\n');
    fprintf(fileID, ' _xcoor\n');
    fprintf(fileID, ' _ycoor\n');
    Dxy=[D_virus(:,2) D_virus(:,3)];

```

```

fprintf(fileID,'  %6.0f  %6.0f\n',Dxy);
fclose(fileID);
color='wd';
graficar_A(D_virus,color);
end
if (isempty(D_disomes)==0)
  %Crear un archivo .txt con las coordenadas de los objetos detectados de
  %disomes single-particles
  ParticleFilepos=strcat(Path,FileNamenew,'_disomes',int2str(i_trn),'.pos');
  fileID = fopen(ParticleFilepos,'w');
  fprintf(fileID, '# XMIPP_STAR_1 *\n');
  fprintf(fileID, 'data_DefaultFamily\n');
  fprintf(fileID, 'loop_\n');
  fprintf(fileID, ' _xcoord\n');
  fprintf(fileID, ' _ycoord\n');
  Dxy=[D_disomes(:,2) D_disomes(:,3)];
  fprintf(fileID,'  %6.0f  %6.0f\n',Dxy);
  fclose(fileID);
  color='g*';
  graficar_A(D_disomes,color);
end
ImageFileSegmentation=strcat(Path,FileNamenew,'_segmentation',int2str(i_trn),'.jpg');
ImageFileSelection=strcat(Path,FileNamenew,'_selection',int2str(i_trn),'.jpg');
ImageFileDetection=strcat(Path,FileNamenew,'_detection',int2str(i_trn),'.jpg');
DataFile=strcat(Path,FileNamenew,'_segmentation',int2str(i_trn),'.mat');
end

```



Bibliografía

ABBOD, M.F., DIEDRICH, G.K., LINKENS, D.A. & MAHFOUF, M. (2001). Survey of utilisation of fuzzy technology in medicine and healthcare. *Fuzzy Sets and Systems*, **120**, 331–349.

ABRAHAMAND, A. & NATH, B. (2001). A neuro-fuzzy approach for modelling electricity demand in victoria. *J. Applied Soft Computing*, **1**, 127–138.

ADAMS, R. (1993). Radial Decomposition of Discs and Spheres. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing: Graphical Models and Image Processing*, **55** (5), 325–332.

ADIGA, U., BAXTER, W.T., HALL, R.J., ROCKEL, B., RATH, B.K., FRANK, J. & GLAESER, R. (2005). Particle picking by segmentation: a comparative study with SPIDER-based manual particle picking. *J. Struct. Biol.*, **152** (3), 211–220.

ADRIAN, M., DUBOCHET, J., LEPAULT, J. & MCDOWALL, A.W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*, **308** (5954), 32–36.

AEBI U. & POLLARD, T.D. (1987) A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic. *J Electron Microsc Tech* **7**, 29–33.

AGIRREZABALA, X., FERNÁNDEZ, I.S., KELLEY, A.C., GIL-CARTON, D., RAMAKRISHNAN, V. & VALLE, M. (2013). The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO Reports*, **14** (9), 811–816.

AGIRREZABALA, X. & VALLE, M. (2015). Structural Insights into tRNA Dynamics on the Ribosome. *Int J Mol Sci.* **16** (5), 9866-95.

AGIRREZABALA, X., VELAZQUEZ-MURIEL, J.A., GOMEZ-PUERTAS, P., SCHERES, S.H., CARAZO, J.M. & CARRASCOSA, J.L. (2007). Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure*, **15**, 461–472.

ALLEGRETTI, M., MILLS, D.J., MCMULLAN, G., KÜHLBRANDT, W. & VONCK, J. (2014). Atomic model of the F420-reducing [NiFe] hydrogenase by electron cryomicroscopy using a direct electron detector. *eLife* **3**, e01963.

AMUNDARAIN, M., ALBERDI, M., GARRIDO, A.J. & GARRIDO, I. (2011). Neuronal rotational speed control for wave energy converters. *International Journal of Control*, **84** (2), 293–309.

- AMUNTS, A., BROWN, A., BAI, X.C., LLACER, J.L., HUSSAIN, T., EMSLEY, P., LONG, F., MURSHUDOV, G., SCHERES, S.H. & RAMAKRISHNAN, V. (2014). Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science*, **343**, 1485–1489.
- ANDRIES, P.E. (2002). *Computational intelligence*. John Wiley & Sons, Ltd.
- ARCE, G.R. (2005). *Nonlinear Signal Processing: A Statistical Approach*. Wiley:New Jersey, USA.
- ATA, R. (2015). Artificial neural networks applications in wind energy systems: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **49**, 534–562.
- ATTOH-OKINE, N.O. (1999). Analysis of Learning Rate and Momentum Term in Backpropagation Neural Network Trained to Predict Pavement Performance. *Journal of Advances in Engineering Software*, **30**, 291–302.
- AZEEM, M.F., HANMANDLU, M. & AHMAD, N. (2000). Generalization of adaptive neuro-fuzzy inference systems. *IEEE Trans. Neural Networks*, **11** (6), 1332–1346.
- BABU, P.S., GHOSH, A. & SACHCHIDANAND (1995). An optimal fuzzy PI controller for a permanent magnet dc motor. *Proc. Int. Conf. Automation IC-AUTO'95*, **121**, 713–716.
- BABUSKA, R. & VERBRUGGEN, H.B. (1996). An overview of fuzzy modeling for control. *Control Engineering Practice*, **4** (11), 1593–1606.
- BAHM, A., SCHWIND, G. & SWANSON, L. (2011). The ZrO/W(100) Schottky cathode: Morphological modification and its effect on long term operation. *Journal of Applied Physics*, **110** (5), 054322–054322-13.
- BAI, X.C., FERNANDEZ, I.S., MCMULLAN, G. & SCHERES, S.H. (2013). Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles. *eLife* **2**, e00461.
- BAI X.C., MCMULLAN G. & SCHERES S.H.W. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, **40** (1), 49–57.
- BAMMES B.E., ROCHAT R.H., JAKANA J., CHEN D.H. & CHIU W. (2012). Direct electron detection yields cryo-EM reconstructions at resolutions beyond 3/4 Nyquist frequency. *Journal of Structural Biology*, **177** (3), 589–601.
- BARRO, S. & MARIN, R. (2002). A call for a stronger role for fuzzy logic in medicine, *Fuzzy Logic in Medicine*, 1–17.
- BAXTER, W.T., GRASSUCCI, R.A., GAO, H. & FRANK, J. (2009). Determination of signal-to-noise ratios and spectral snrs in cryo-em low-dose imaging of molecules. *Journal of Structural Biology*, **166** (2), 126–132.
- BELLARE, J.R., DAVIS, H.T., SCRIVEN, L.E. & TALMON, Y. (1988). Controlled environment vitrification system: An improved sample preparation technique. *Journal of Electron Microscopy Technique*, **10** (1), 87–111.
- BHARDWAJ, A. & TIWARI, A. (2015). Breast cancer diagnosis using Genetically Optimized Neural Network model. *Expert Systems with Applications*, **42** (10), 4611–4620.

- BISHOP, C.M. (2007). *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford University Press, UK.
- BOOTH C.R., JAKANA J. & CHIU W. (2006). Assessing the capabilities of a 4k × 4k CCD camera for electron cryo-microscopy. *Journal of Structural Biology*, **156** (3), 556–563.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. (1999). *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2nd Edition. Jones & Bartlett Learning.
- BRILOT, A.F., CHEN, J.Z., CHENG, A., PAN, J., HARRISON, S.C., POTTER, C.S., CARRAGHER, B., HENDERSON, R. & GRIGORIEFF, N. (2012). Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film. *J. Struct. Biol.* **177**, 630–637.
- BURAGOHAİN, M. & MAHANTA, C. (2008). A Novel Approach for ANFIS Modeling Based on Full Factorial Design. *Journal of Applied Soft Computing*, **8** (1), 609–625.
- BURKE, H.B., GOODMAN, P.H., ROSEN, D.B., HENSON, D.E., WEINSTEIN, J.N., HARRELL, F.E., MARKS, J.R., WINCHESTER, D.P. & BOSTWICK, D.G. (1997). Artificial neural network improve the accuracy of cancer survival prediction. *Cancer*, **79**, 857–862.
- CALLAWAY, E. (2015). The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. *Nature*, **525**, 7568.
- CAMPBELL, M.G., CHENG, A., BRILOT, A.F., MOELLER, A., LYUMKIS, D., VEESLER, D., PAN, J., HARRISON, S.C., POTTER, C.S., CARRAGHER, B. & GRIGORIEFF, N. (2012). Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy. *Structure* **20**, 1823–1828.
- CAMPBELL, M.G., KEARNEY, B.M., CHENG, A., POTTER, C.S., JOHNSON, J.E., CARRAGHER, B. & VEESLER, D. (2014). Near-atomic resolution reconstructions using a mid-range electron microscope operated at 200 kV. *Journal of Structural Biology*, **188** (2), 183–187.
- CANNY, J. (1986). A Computational Approach To Edge Detection, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, PAMI-**8** (6), 679–698.
- CAO, E., LIAO, M., CHENG, Y. & JULIUS, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, **504**, 113–118. doi: 10.1038/nature12823.
- CARDONE, G., YAN, X., SINKOVITS, R.S., TANG, J. & BAKER T.S. (2013). Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles from single micrographs in real time at the microscope. *Journal of Structural Biology*, **183** (3), 329–341.
- CARRAGHER, B., KISSERBERTH, N., KRIEGMAN, D., MILLIGAN, R.A., POTTER, C.S., PULOKAS, J. & REILEIN, A. (2000). LEGINON: An automated system for acquisition of images from vitreous ice specimens, *Journal of Structural Biology*, **132** (1), 33–45.
- CELIKOGU, H.B. (2006). Application of radial basis function and generalized regression neural networks in non-linear utility function specification for travel mode choice modeling. *Mathematical and Computer Modelling*, **44**, 640–658.
- CHANDLER, D.E. & ROBERSON, R.W. (2009). *Bioimaging: current concepts in light and electron microscopy*. Jones & Bartlett Publishers.

- CHEN, S. & DOOLEN, G.D. (1998). Lattice Boltzmann Method for Fluid Flows. *Annual Reviews Fluid Mechanics*, **30**, 329–64.
- CHEN, J.Z. & GRIGORIEFF, N. (2007). SIGNATURE: A single-particle selection system for molecular electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, **157** (1), 168–173.
- CHENG, Y. (2015). Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution. *Cell*, **161** (3), 450–457.
- CHERKASSKY, V. (1998). Fuzzy Inference Systems: A Critical Review. *Computational Intelligence: Soft Computing and Fuzzy-Neuro Integration with Applications*, **162**, 177–197.
- CHIU, S. (1996). Selecting input variables for fuzzy models. *Journal of Intelligent and Fuzzy Systems*, **4** (4), 243–256.
- COX, E. (1999). *The Fuzzy Systems Handbook : A Practitioner's Guide to Building, Using and Maintaining Fuzzy Systems*, 2nd edn. Academic Press, San Diego, CA.
- CROWTHER, R.A., HENDERSON, R. & SMITH, J.M. (1996). MRC image processing programs. *Journal of Structural Biology*. **116** (1), 9–16.
- CRUZ, J.A. & WISHART, D.S. (2006). Applications of machine learning in cancer prediction and prognosis. *Cancer Informatics*, **2**, 59–78.
- CZOGALA, E. & PEDRYCZ, W. (1981). On identification in fuzzy systems and its applications in control problems. *Fuzzy Sets and Systems*, **6**, 73–83.
- DADIOS, E.P. (2012). *Fuzzy Logic - Controls, Concepts, Theories and Applications*. Croatia: InTech.
- DAWSON, J.C. & ADKINS, C.J. (1995). Conduction mechanisms in amorphous carbon prepared by ion-beam sputtering. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **7** (31), 6297–6315.
- DE ROSIER, D.J. & KLUG, A. (1968). Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. *Nature*, **217**, 130–134.
- DELEN, D., WALKER, G. & KADAM, A. (2005). Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods. *Artificial Intelligence in Medicine*, **34**, 113–127.
- DENAI, M.A., PALIS, F. & ZEGHBIB, A. (2004). ANFIS based modelling and control of nonlinear systems: A tutorial. *Proc. of the IEEE Int. Conf. on Syst., Man and Cybern.*, **4**, 3433–3438.
- DORF, R.C. & BISHOP, R.H. (2001). *Modern Control Systems (Ninth Edition)*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- NOTE, Y. & OVASKA, S.J. (2001). Industrial applications of soft computing: a review. *Proceedings of the IEEE*, **89** (9), 1243–1265.
- DU, Y., ZHU, Q., GHOURI, S., ZHAI, J., MENG, F. & LIANG, Y. (2014). Review on reliability in pipeline robotic control systems. *International Journal of Computer Applications in Technology*, **49** (1), 12–21.

- DUBOCHET, J., ADRIAN, M., CHANG, J.J., HOMO, J.C., LEPAULT, J., MCDOWALL, A.W. & SCHULTZ, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **21** (2), 129–228.
- DUBOCHET, J., ADRIAN, M., CHANG, J.J., LEPAULT, J. & MCDOWALL, A.W. (1987). Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. In *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*, p. 114–131. Springer.
- DUBOCHET, J., CHANG, J.J., FREEMAN, R., LEPAULT, J., AND MCDOWALL, A.W. (1982). Frozen aqueous suspensions. *Ultramicroscopy* **10**, 55–61.
- DUBOCHET, J. & MCDOWALL, A.W. (1981). Vitrification of pure water for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, **124** (3), pp. RP3–RP4.
- DUNN, J.G., FOO, C.K., BELLETIER, G.N., GAVIS, E.R. & WEISSMAN, J.S. (2013). Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *eLife*. 2:e01179.
- DURKIN, J. (1994). *Expert Systems: Design and Development*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- EGERTON, R.F. (2007). *Physical Principles of Electron Microscopy*. Springer.
- EGERTON, R.F. (2009). Electron energy-loss spectroscopy in the TEM. *Reports on progress in physics*. **72** (1), 1–25.
- EGERTON, R.F. (2011). *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*, 3rd edition. Springer.
- EGERTON, R.F. (2012). Mechanisms of radiation damage in beam-sensitive specimens, for TEM accelerating voltages between 10 and 300 kV. *Microscopy Research & Technique* **75**, 1550–1556.
- EGERTON, R.F. & CHENG S.C. (1987). Measurement of local thickness by electron energy-loss spectroscopy. *Ultramicroscopy*, **21** (3), 231–244.
- EGERTON, R.F., LI, P. & MALAC, M. (2004). Radiation damage in the TEM and SEM. *Micron*, **35** (6), 399–409.
- EKER, I. & TORUN, Y. (2006). Fuzzy logic control to be conventional method. *Energy Conversion and Management*, **47**, 377–394.
- ELAD, N., CLARE, D.K., SAIBIL, H.R. & ORLOVA, E.V. (2008). Detection and separation of heterogeneity in molecular complexes by statistical analysis of their two-dimensional projections. *J. Struct. Biol.*, **162**, 108–120.
- ERICKSON, H.P. & KLUG, A. (1970). The Fourier transform of an electron micrograph: effects of defocusing and aberrations, and implications for the use of underfocus contrast enhancement. *Phil Trans Roy Soc Lond B*. **261**, 105–118.
- ERMANTRAUT, E., WOHLFART, K. & TICHELAAR, W. (1998). Perforated support foils with pre-defined hole size, shape and arrangement. *Ultramicroscopy*, **74** (1-2), 75–81.

- FARUQI, A.R. & HENDERSON, R. (2007). Electronic detectors for electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, **17** (5), 549–555.
- FEIGENBAUM, E.A. (2003). Some challenges and grand challenges for computational intelligence. *Journal of the ACM*, **50** (1), 32–40.
- FEJA, B. & AEBI, U. (1999). Determination of the inelastic mean free path of electrons in vitrified ice layers for on-line thickness measurements by zero-loss imaging. *J Microsc*, **193** (1), 15–19.
- FERNANDEZ, I.S., BAI, X.C., HUSSAIN, T., KELLEY, A.C., LORSCH, J.R., RAMAKRISHNAN, V. & SCHERES, S.H.W. (2013). Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex. *Science*, **342**, 1240585.
- FISCHER, H., POLIKARPOV, I. & CRAIEVICH, A.F. (2004). Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci*, **13** (10), 2825–2828.
- FLORES, A., SAEZ, D., ARAYA, J., BERENGUEL, M. & CIPRIANO, A. (2005). Fuzzy predictive control of a solar power plant. *IEEE Trans. Fuzzy Syst.*, **13** (1), 58–68.
- FRAICHARD, TH. & GARNIER, PH. (2001). Fuzzy control to drive car-like vehicles. *Robotics and Autonomous Systems*, **34**, 1–22.
- FRANK, J. (1996). *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assembly*, 2 edn (Oxford University Press).
- FRANK, J. (2006). *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. New York: Oxford University Press. ISBN 0-19-518218-9.
- FRANK, J. & AGRAWAL, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, **406**, 318–322.
- FRANK, J., GOLDFARB, W., EISENBERG, D. & BAKER, T.S. (1978). Reconstruction of glutamine synthetase using computer averaging. *Ultramicroscopy* **3**, 283–290.
- FRANK, J., VERSCHOOR, A. & BOUBLIK, M. (1981). Computer averaging of electron micrographs of 40S ribosomal subunits. *Science*, **214** (4527), 1353–1355.
- FREDERIK, P.M. & HUBERT, D.H.W. (2005) Cryoelectron microscopy of liposomes. *Methods in Enzymology*, **391** (SPEC. ISS.), 431–448.
- FRIEDRICH, H., FREDERIK, P.M., DE WITH, G. & SOMMERDIJK, N.A.J.M. (2010) Imaging of self-assembled structures: Interpretation of TEM and Cryo-TEM images. *Angewandte Chemie - International Edition*, **49** (43), 7850–7858.
- FULLER, S.D., BUTCHER, S.J., CHENG, R.H. & BAKER T.S. (1996). Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Particles—The Uncommon Line. *Journal of Structural Biology*, **116** (1), 48–55.

- GABASHVILI, I.S., AGRAWAL, R.K., SPAHN, C.M., GRASSUCCI, R.A., SVERGUN, D.I., FRANK, J. & PENCZEK, P. (2000). Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell*, **100** (5), 537–549.
- GALE, B. & HALE, K.F. (1962). The theory and operation of an electron-microscope goniometer stage. *British Journal of Applied Physics*, **13** (6), 260–263.
- GARRIDO, A.J., GARRIDO, I., AMUNDARAIN, M., ALBERDI, M. & DE LA SEN, M. (2012). Sliding-mode control of wave power generation plants. *IEEE Transactions on Industry Applications*, **48** (6), 2372–2381.
- GEIST, R., RASCHE, K., WESTALL, J. & SCHALKOFF, R. (2004). Lattice-Boltzmann lighting. *Eurographics Symposium on Rendering*, pp. 355–362, Suecia.
- GEIST, R. & WESTALL, J. (2011). *Lattice-Boltzmann Lighting Models*. GPU Computing GEMS Emerald Edition, Wen-mei Hwu, Editor, Morgan Kaufmann.
- GLAESER, R.M. & DOWNING, K.H. (1992). Assessment of resolution in biological electron crystallography. *Ultramicroscopy*, **47**, 256–65.
- GLAESER, R.M. & HALL, R.J. (2011). Reaching the Information Limit in Cryo-EM of Biological Macromolecules: Experimental Aspects. *Biophys J.* **100** (10), 2331–2337.
- GLAESER, R.M., LEE, J. & TYPKE, D. (2006). Advantages and objectives of high-throughput data collection in single-particle cryo-EM. *Microscopy and Microanalysis*, Chicago.
- GLOVER, F. (1989). Tabu Search, Part I. *ORSA Journal on Computing*, **1** (3), 190–206.
- GLOVER, F. (1990). Tabu Search, Part II. *ORSA Journal on Computing*, **2** (1), 4–31.
- GLOVER, F. & LAGUNA, M. (1993). *Tabu Search, Modern Heuristic Techniques for Combinatorial Problems*. Colin R. Reeves (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 70–150.
- GLOVER, F. & MARTI, R. (2006). Chapter 3. Tabu Search. *Metaheuristic Procedures for Training Neural Networks*. Springer-Verlag, **36**, 53–69.
- GONZALEZ, R.C. & WOODS, R.E. (2008). *Digital Image Processing*, Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- GONZALEZ, R.C., WOODS, R.E. & EDDINS, S.L. (2003). *Digital Image Processing Using MATLAB*, New Jersey, Prentice Hall, Chapter 11.
- GONZALEZ, R.C., WOODS, R.E. & EDDINS, S.L. (2009). *Digital Image Processing Using MATLAB*, 2nd ed., Gatesmark Publishing, Knoxville, TN.
- GRASSUCCI, R.A., TAYLOR, D.J. & FRANK, J. (2007). Preparation of macromolecular complexes for cryo-electron microscopy. *Nature Protocols*, **2** (12), 3239–3246.
- GRIGORIEFF, N. (2007) FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. *J. Struct. Biol.* **157**, 117–125.

- GRIGORIEFF, N. & HARRISON, S.C. (2011) Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. *Curr Opin Struct Biol*; **21** (2), 265–273.
- GRIMM, R., TYPKE, D., BÄRMANN, M. & BAUMEISTER, W. (1996). Determination of the inelastic mean free path in ice by examination of tilted vesicles and automated most probable loss imaging. *Ultramicroscopy*, **63** (3–4), 169–179.
- HAGAN, M.T., DEMUTH, H.B. & BEALE, M.H. (1996). *Neural Network Design*, 2nd ed. PWS Publishing, Boston, MA, USA.
- HAMDAN, H. (2013). *An Exploration of the Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS) in Modelling Survival*. Thesis. The University of Nottingham.
- HAYKIN, S. (2003). *Neural Networks - A Comprehensive Foundation*, 4th ed. Pearson Education (Singapore) Pvt. Ltd., Indian Branch.
- HENDERSON, R. (1992). Image contrast in high-resolution electron microscopy of biological macromolecules: TMV in ice. *Ultramicroscopy*. **46** (1–4), 1-18.
- HENDERSON, R., BALDWIN, J.M., CESKA, T.A., ZEMLIN, F., BECKMANN, E. & DOWNING, K.H. (1990). Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, **213** (4), 899–929.
- HERNÁNDEZ S., SÁEZ D. & MERY D. (2004). Neuro-fuzzy method for automated defect detection in aluminium castings. *Lecture Notes in Computer Science*, **3212** (4), 826–833.
- HIROTA, K. (1993). *Industrial Applications of Fuzzy Technology*. Springer, Tokyo, 1993.
- HISHAMMUDDIN, A. (2008). *Fuzzy methodologies for automated University timetabling solution construction and evaluation*. PhD thesis, University of Nottingham.
- HOU, Z.J. & WEI, G.W. (2002). A new approach to edge detection. *Pattern Recognition*, **35**, 1559–1570.
- HUANG, T.S., YANG, G.J. & TANG, G.Y. (1997). A Fast Two Dimensional Median Filtering Algorithm. *IEEE Trans. On Accustics Speech, Signal Processing*, **27** (1).
- IANCU, C.V., TIVOL, W.F., SCHOOLER, J.B., DIAS, D.P., HENDERSON, G.P., MURPHY, G.E., WRIGHT, E.R., LI, Z., YU, Z., BRIEGEL, A., GAN, L., HE, Y.J. & ENSEN, G.J. (2006) Electron cryotomography sample preparation using the Vitrobot. *Nat Protoc* **1**, 2813–2819.
- JAMSHIDI, M. (1997). *Large-Scale Systems: Modelling, Control and Fuzzy Logic*. Prentice Hall PTR.
- JANG, J.S.R. (1993). Anfis adaptive-network-based fuzzy inference system. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, **23** (3), 665–685.
- JANG, J.S.R. (1996). Input selection for ANFIS learning. *Proc. IEEE Int. Conf. Fuzzy Syst.*, **2**, 1493–1499.
- JANG, J.S.R. & SUN, C.T. (1995). Neuro-fuzzy modeling and control. *Proceeding of the IEEE*, **83** (3), 378–406.

- JANG, J.S.R., SUN, C.T. & MIZUTANI, E. (1997). *Neuro-Fuzzy and Soft Computing: A Computational Approach to Learning and Machine Intelligence*. Prentice Hall Inc.
- JEOL. (2009). JEM-2200FS/CR Manual. Jeol, 1^a edition.
- JIN, F., FIEGUTH, P., WINGER, L. & JERNIGAN, E. (2003). Adaptive wiener filtering of noisy images and image sequences. In *Proc. IEEE Int. Conf. Image Processing*, **3**, 349–352.
- JINGCHUAN, S. & HUILIN, L. (2010). How to operate a cryo-electron microscope. *Methods in enzymology*, **481**, 231–49.
- JOHNSRUD, S., YANG, H., NAYAK, A. & PUNYASENA, S.W. (2013). Semi-automated segmentation of pollen grains in microscopic images: a tool for three imaging modes. *Grana*, **52** (3), 181–191.
- JONES, R. & SOILLE, P. (1996). Periodic lines: Definition, cascades, and application to granulometrie, *Pattern Recognition Letters*, **17**, 1057–1063.
- JOVEL, J. & SCHNEEMANN, A., 2011. Molecular characterization of *Drosophila* cells persistently infected with Flock House virus. *Virology*. **419** (1), 43–53.
- JULIAN, P. (2010). Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica. Tesis doctoral. UPV/EHU.
- JULIAN, P., KONEVEGA, A.L, SCHERES, S., LÁZARO, M., GIL-CARTON, D., WINTERMEYER, W., RODNINA, M.V. & VALLE, M. (2008). Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (44), 16924–7.
- KALMAN, R.E. (1960). A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems. *Journal of Basic Engineering*, **82** (1), 35–45.
- KAMIYA, A., OVASKA, S.J., ROY, R. & KOBAYASHI, S. (2005). Fusion of soft computing and hard computing for large scale plants: a general model. *Applied Soft Computing*, **5** (3), 265–279.
- KANTA, A.F., MONTAVON, G., BERNDT, C.C., PLANCHE, M.P. & CODDET, C. (2011). Intelligent system for prediction and control: Application in plasma spray process. *Expert Systems with Applications*, **38** (1), 260–271.
- KANTA, A.F., MONTAVON, G., VARDELLE, M., PLANCHE, M.P., BERNDT, C.C. & CODDET, C. (2008). Artificial Neural Networks vs. Fuzzy Logic: Simple Tools to Predict and Control Complex Processes - Application to Plasma Spray Processes. *Journal of Thermal Spray Technology*, **17** (3), 365–376.
- KÜHLBRANDT, W. (2014). Biochemistry, The resolution revolution. *Science*, **343** (6178), 1443–4.
- KÜHLBRANDT, W. (2014). Microscopy: Cryo-EM enters a new era. *eLife* 2014; 3:e03678; 4 pp.
- LANGLOIS, R., PALLESEN, J., ASH, J.T., NAM HO D., RUBINSTEIN, J.L. & FRANK, J. (2014). Automated particle picking for low-contrast macromolecules in cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **186** (1), 1–7.

- LANGMORE, J.P. & SMITH, M.F. (1992). Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice. *Ultramicroscopy*, **46** (1-4), 349–373.
- LAURSEN, B.S., SORENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K. & SPERLING-PETERSEN, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69** (1), 101–23.
- LEE, C.C. (1990). Fuzzy logic in control systems: fuzzy logic controller-parts 1 and 2. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, **20** (2), 404–435.
- LEE, Z., ROSE, H., LEHTINEN, O., BISKUPEK, J. & KAISER, U. (2014). Electron dose dependence of signal-to-noise ratio, atom contrast and resolution in transmission electron microscope images. *Ultramicroscopy*, **145**, 3–12.
- LEI, J. & FRANK, J. (2005). Automated acquisition of cryo-electron micrographs for single particle reconstruction on an FEI Tecnai electron microscope. *J Struct Biol.* **150** (1), 69–80.
- LI, X., MOONEY, P., ZHENG, S., BOOTH, C.R., BRAUNFELD, M.B., GUBBENS, S., AGARD, D.A. & CHENG, Y. (2013). Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat. Methods*, **10**, 584–590.
- LIANG, M., YEAP, T., HERMANSYAH, A. & RAHMATI, S. (2003). Fuzzy Control of Spindle Torque for Industrial CNC Machining. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, **43** (14), 1497–1508.
- LIAO, M., CAO, E., JULIUS, D. & CHENG, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, **504**, 107–112.
- LIE, T.T., SHRESTHA, G.B. & GHOSH, A. (1995). Design and application of a fuzzy logic control scheme for transient stability enhancement in power systems. *Electric Power Syst. Research*, **33**, 17–23.
- LIM, J.S. (1990). *Two-Dimensional Signal and Image Processing*, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, 469–476.
- LIN, Y. & CUNNINGHAM, G.A. (1995). A new approach to fuzzy-neural system modelling. *IEEE Trans. on Fuzzy Syst.*, **3** (2), 190–198.
- LISBOA, P.J.G. (2002). A review of evidence of health benefit from artificial neural networks in medical intervention. *Neural Networks*, **15**, 11–39.
- LU, P., BAI, X.C., MA, D., XIE, T., YAN, C., SUN, L., YANG, G., ZHAO, Y., ZHOU, R., SCHERES, S.H. & SHI, Y. (2014). Three-dimensional structure of human γ -secretase. *Nature*, **512**, 166–170.
- LUDTKE, S.J., BALDWIN, P.R. & CHIU, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *Journal of Structural Biology*, **128** (1), 82–97.
- LYUMKIS, D., BRILOT, A.F., THEOBALD, D.L. & GRIGORIEFF, N. (2013). Likelihood-based classification of cryo-EM images using FREALIGN. *J Struct Bio.*, **183** (3), 377–88.
- LYUMKIS, D., MOELLER, A., CHENG, A., HEROLD, A., HOU, E., IRVING, C., JACOVETTY, E.L., LAU, P.W., MULDER, A.M., PULOKAS, J., QUISPE, J.D., VOSS, N.R., POTTER, C.S., CARRAGHER,

- B. (2010). Automation in single-particle electron microscopy connecting the pieces. *Methods Enzymol*, **483**, 91–338.
- MALLICK, S.P., CARRAGHER, B., POTTER, C.S. & KRIEGMAN, D.J. (2005). ACE: Automated CTF Estimation. *Ultramicroscopy*, **104** (1), 8–29.
- MAMDANI, E.H. (1974). Applications of fuzzy algorithms for control of simple dynamic plants. *Proc. IEEE.*, **121**, 1585–1588.
- MAMDANI, E.H. (1976). Advances in the linguistic synthesis of fuzzy controllers. *International Journal of Man-Machine Studies*, **8**, 669–678.
- MAMDANI, E.H. (1977). Applications of fuzzy logic to approximate reasoning using linguistic synthesis," *IEEE Transactions on Computers*, **26** (12), 1182–1191.
- MAMDANI, E.H. & ASSILIAN, S. (1975). An experiment in linguistic synthesis with a fuzzy logic controller. *International Journal of Man-Machine Studies*, **7** (1), 1–13.
- MARABINI, R., MASEGOSA, I.M., SAN MARTÍN, M.C., MARCO, S., FERNÁNDEZ, J.J., DE LA FRAGA, L.G., VAQUERIZO C. & CARAZO, J.M. (1996). Xmipp: An image processing package for electron microscopy. *J. Structural Biology*, **116** (1), 237–240
- MARR, C.R., BENLEKBIR, S. & RUBINSTEIN, J.L. (2014). Fabrication of carbon films with ~500nm holes for cryo-EM with a direct detector device. *Journal of Structural Biology*, **185** (1), 42–47.
- MATHWORKS FUZZY (2015). Foundation of fuzzy logic.
URL: <http://www.mathworks.com/help/fuzzy/foundations-of-fuzzy-logic.html> [10/08/2015].
- MATHWORKS IMAGE (2015). Image Analysis.
URL: <http://es.mathworks.com/help/images/image-analysis.html> [10/08/2015].
- MCCARTHY, J., MINSKY, M.L., ROCHESTER, N. & SHANNON, C.E. (1955). A Proposal for the Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence.
- MCMULLAN, G., CHEN, S., HENDERSON, R. & FARUQI, A.R. (2009a). Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy. *Ultramicroscopy*, **109** (9), 1126–1143.
- MCMULLAN, G., CLARK, A.T., TURCHETTA, R. & FARUQI, A.R. (2009b). Enhanced imaging in low dose electron microscopy using electron counting. *Ultramicroscopy*, **109**, 1411–1416.
- MCMULLAN, G., FARUQI, A.R., CLARE, D. & HENDERSON, R. (2014). Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy*, **147**, 156–163.
- MELIÁN, B., MORENO, J. & MORENO, M. (2003). Metaheuristics: A global view, *Inteligencia Artificial, Revista Iberoamericana de Inteligencia Artificial*, **19**, 7–28.
- MEYERSON, J.R., KUMAR, J., CHITTORI, S., RAO, P., PIERSON, J., BARTESAGHI, A., MAYER, M.L. & SUBRAMANIAM, S. (2014). Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature*, **514**, 328–334.

- MOHANRAJ, M., JAYARAJ, S. & MURALEEDHARAN, C. (2015). Applications of artificial neural networks for thermal analysis of heat exchangers – A review. *International Journal of Thermal Sciences*, **90**, 150–172.
- NAUCK, D. & KRUSE, R. (1999). Obtaining interpretable fuzzy classification rules from medical data. *Artificial Intelligence in Medicine*, **16**, 149–169.
- NEGNEVITSKY, M. (2005). *Artificial Intelligence: a guide to intelligent systems*. Pearson Education Limited, Essex, England.
- NELSON, M.M. & ILLINGWORTH, W.T. (1991). *A Practical Guide to Neural Nets*. Reading, MA: Addison-Wesley.
- NIXON, M.S. & AGUADO, A.S. (2008). *Feature Extraction and Image Processing*. Academic Press.
- NOROUSHI, R., WICKLES, S., LEIDIG, C., BECKER, T., SCHMID, V.J., BECKMANN, R. & TRESCH, A. (2013). Automatic post-picking using MAPPOS improves particle image detection from cryo-EM micrographs. *Journal of Structural Biology*, **182** (2), 59–66.
- ODEGARD, A.L., BANERJEE, M. & JOHNSON, J.E. (2010). Flock House Virus: A Model System for Understanding Non-Enveloped Virus Entry and Membrane Penetration. *Current topics in microbiology and immunology*, **343** (1), 1–22.
- OGAJI, S.O.T., MARINAI, L., SAMPATH, S., SINGH R. & PROBER, S.D. (2005). Gas-turbine fault diagnostics: a fuzzy-logic approach. *Applied Energy*, **82** (1), 81–89
- OGURA, T. & SATO C. (2004). Auto-accumulation method using simulated annealing enables fully automatic particle pickup completely free from a matching template or learning data. *J. Struct. Biol.*, **146**, 344–358.
- O'LEARY, D.E. (1998), Using neural networks to predict corporate failure. *Int. J. Intell. Syst. Acc. Fin. Mgmt.*, **7**, 187–197.
- ORLOVA, E.V. & SAIBIL, H.R. (2011) Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. *Chemical reviews*, **111** (12), 7710–7748.
- OTSU, N. (1979). A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, **9** (1), 62–66.
- PALADE, G.E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. *The Journal of Experimental Medicine*, **95** (3), 285–298.
- PALACE, G.E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol.*, **1** (1), 59–68.
- PANTELIC, R.S., SUK, J.W., MAGNUSON, C.W., MEYER, J.C., WACHSMUTH, P., KAISER, U., RUOFF, R.S. & STAHLBERG, H. (2011). Graphene: Substrate preparation and introduction. *Journal of Structural Biology*, **174** (1), 234–238.

- PAPA, J.P., NAKAMURA, R.Y.M., HUGO, V., DE ALBUQUERQUE, C., FALCÃO, A.X. & TAVARES, J.M.R.S. (2013). Computer techniques towards the automatic characterization of graphite particles in metallographic images of industrial materials. *Expert Systems with Applications*, **40** (2), 590–597.
- PARKER, J.R. (1997). *Algorithms for Image Processing and Computer Vision*. New York, John Wiley & Sons, Inc., pp. 23–29.
- PEDRYCZ, W. (1984). An identification algorithm in fuzzy relational systems, *Fuzzy Sets and Syst.*, **13**, 153–167.
- PENCZEK, P.A. (2012). Fundamentals of three-dimensional reconstruction from projections. *Methods in Enzymology*, **482**, 1–33.
- PENCZEK, P.A., KIMMEL, M. & SPAHN, C.M. (2011). Identifying conformational states of macromolecules by eigen-analysis of resampled cryo-EM images. *Structure*, **19** (11), 1582–90.
- PHAM, D.T. & XING, L. (1995). *Neural Networks for Identification, Prediction and Control*. Springer. ISBN 978-1-4471-3244-8.
- PORTER, K.R., CLAUDE, A. & FULLAM, E.F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy methods and preliminary observations. *The Journal of experimental medicine*, **81** (3), 233–246.
- POTTER, C.S., CHU, H., FREY, B., GREEN, C., KISSERBERTH, N., MADDEN, T.J., MILLER, K.L., NAHRSTEDT, K., PULOKAS, J., REILEIN, A., TCHENG, D., WEBER, D. & CARRAGHER, B. (1999). Leginon: A system for fully automated acquisition of 1000 micrographs a day, *Ultramicroscopy*, **77**, 153–161.
- POTTER, C.S., ZHU, Y. & CARRAGHER, B. (2004). Automated particle selection for cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **145**, 1–2
- PRASUHN, D.E. (2007) Development of icosahedral virus particles as multivalent display scaffolds for metal complexes. Thesis Doctoral. The scripps research institute.
- QUISPE, J., DAMIANO, J., MICK, S.E., NACKASHI, D.P., FELLMANN, D., AJERO, T.G., CARRAGHER, B. & POTTER, C.S. (2007). An improved holey carbon film for cryo-electron microscopy. *Microsc Microanal* **13**, 365–371.
- RAMAKRISHNAN, V. & MOORE, P.B. (2001). The Ribosome in 2000: Atomic Structures at Last *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 144–154.
- REICH, Y. & BARAI, S.V. (1999). Evaluating machine learning models for engineering problems. *Artificial Intelligence in Engineering*, **13** (3), 257–272.
- REICH, Y. & BARAI, S.V. (2000). A methodology for building neural networks models from empirical engineering data. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, **13** (6), 685–694.
- ROSEMAN, A.M. (2003). FindEM—a fast, efficient program for automatic selection of particles from electron micrographs. *Journal of Structural Biology*, **145** (1-2), 91–99.

- ROSEMAN, A.M. (2003). Particle finding in electron micrographs using a fast local correlation algorithm. *Ultramicroscopy*, **94** (3–4), 225–236.
- RUIJTER, W.J. (1995). Imaging properties and applications of slow-scan charge coupled device cameras suitable for electron microscopy. *Micron*, **26** (3), 247–275.
- RUSKA, E. (1987). The development of the electron microscope and electron microscopy. nobel lecture 1986. *Rev. Modern Phys.*, **59** (3), 627–638.
- RUSKA E. & KNOLL, M. (1931). *Z. Tech. Phys.* **12**, 389.
- RUSKIN, R.S., YU, Z. & GRIGORIEFF, N. (2013). Quantitative characterization of electron detectors for transmission electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, **184** (3), 385–393.
- RUSSO, C.J. & PASSMORE, LA. (2014). Controlling protein adsorption on graphene for cryo-EM using low-energy hydrogen plasmas. *Nat Methods.*, **11** (6), 649–52.
- SAAD, A., LUDKE, S.J., JAKANA, J., RIXON, F.J., TSURUTA, H. & CHIU, W. (2001). Fourier amplitude decay of electron cryomicroscopic images of single particles and effects on structure determination. *J. Struct. Biol.*, **133** (1), 32–42.
- SAEZ, D. & CIPRIANO, A. (1999). Fuzzy models based economic predictive control for a combined cycle power plant boiler. *Proc. IEEE Int. Symp. on Intell. Control/Intell. Syst. and Semiotics*, Cambridge, MA, 417–422.
- SALA, A. , GUERRA, T.M. & BABUSKA, R. (2005). Perspectives of fuzzy systems and control, *Fuzzy Sets Syst*, **156**, 432–444.
- SAN MARTIN, C. (2015). Transmission electron microscopy and the molecular structure of icosahedral viruses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **581**, 59–67.
- SANDER, B., GOLAS, M.M. & STARK, H. (2003). Automatic CTF correction for single particles based upon multivariate statistical analysis of individual power spectra. *J Struct Biol*, **142** (3), 392–401.
- SCHERES S.H.W. (2010). Classification of structural heterogeneity by maximum-likelihood methods. *Meth. Enzym.*, **482**, 295–320.
- SCHERES, S.H.W. (2014). Beam-induced motion correction for sub-megadalton cryo-EM particles. *eLife* **3**, e03665.
- SCHERES, S.H.W. (2015). Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. *Journal of Structural Biology*, **189** (2), 114–122.
- SCHERES, S.H.W., GAO, H., VALLE, M., HERMAN, G.T., EGGERMONT, P.P.B., FRANK, J. & CARAZO, J.M. (2007). Disentangling Conformational States of Macromolecules in 3D-EM through Likelihood Optimization. *Nat. Methods*, **4**, 27–29.
- SCHERES, S.H.W., NUÑEZ-RAMIREZ, R., SORZANO, C.O.S., CARAZO, J.M. & MARABINI, R. (2008). Image processing for electron microscopy single-particle analysis using Xmipp. *Nature Protocols*, **3**, 977–990.

- SCHERZER, O. (1949). The theoretical resolution limit of the electron microscope. *J. Applied Physics*, **20**, 20–29.
- SCHRÖDER, R.R., HOFMANN, W. & MENETRET, J.F. (1990). Zero-loss energy filtering as improved imaging mode in cryoelectronmicroscopy of frozen-hydrated specimens. *J. Struct. Biol.*, **105**, 28–34.
- SHAIKH, T.R., GAO, H., BAXTER, W.T., ASTURIAS, F.J., BOISSET, N., LEITH, A. & FRANK, J. (2008). SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nature Protocols*, **3**, 1941–1974
- SINGH, R.P., RAWAT, V., PAWAR, M. & MISHRA, R.K. (2012). Design of an optimal multi-layer neural network for eigenfaces based face recognition. *Recent Research in Science and Technology*, **4** (1), 24–32.
- SOILLE, P. (1999). *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer-Verlag, pp. 173–174.
- SORZANO, C.O.S., BILBAO-CASTRO, J.R., SHKOLNISKY, Y., ALCORLO, M., MELERO, R., CAFFARENA-FERNÁNDEZ, G., LI, M., XU, G., MARABINI, R. & CARAZO, J.M. (2010). A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy. *J Struct Biol.*, **171** (2), 197–206.
- SORZANO, C.O.S., DE LA ROSA TREVÍN, J.M., OTÓN, J., VEGA, J.J., CUENCA, J., ZALDÍVAR-PE-RAZA, A., GÓMEZ-BLANCO, J., VARGAS, J., QUINTANA, A., MARABINI, R. & CARAZO J.M. (2013). Semiautomatic, high-throughput, high-resolution protocol for three-dimensional reconstruction of single particles in electron microscopy. A.A. Sousa, M.J. Kruhlak (eds.), *Nanoimaging, Methods in Molecular Biology*, **950**, 171–193.
- SORZANO, C.O.S., RECARTE, E., ALCORLO, M., BILBAO-CASTRO, J.R., SAN-MARTN, C., MARABINI, R. & CARAZO, J.M. (2009). Automatic particle selection from electron micrographs using machine learning techniques. *J. Struct. Biol.*, **167** (3), 252–260.
- SPIRIN, A.S. (1969) A model of the functioning ribosome. Locking and unlocking of the ribosome subparticles, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 197–207.
- SQUIRES, G., POUS, J., AGIRRE, J., ROZAS-DENNIS, G.S., COSTABEL, M.D., MARTI, G.A., NAVAZA, J., BRESSANELLI, S., GUÉRIN, D.M.A. & REY, F.A. (2013). Structure of the *Triatoma* virus capsid. *Acta Cryst*, **69**, 1026–1037.
- STAGG, S.M., LANDER, G.C., PULOKAS, J., FELLMANN, D., CHENG, A., QUISPE, J.D., MALLICK, S.P., AVILA, R.M., CARRAGHER, B. & POTTER, C.S. (2006). Automated cryoEM data acquisition and analysis of 284742 particles of GroEL. *J Struct Biol*, **155** (3), 470–481.
- STARK, H. (2010) GraFix: Stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle Cryo-EM. *Methods in Enzymology*. **481**, 109–126
- SUGANTHI, L., INIYANB, S. & SAMUEL A.A. (2015). Applications of fuzzy logic in renewable energy systems – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **48**, 585–607.
- SUGENO, M. (1977). Fuzzy measures and fuzzy integrals: a survey. *Fuzzy Automata and Decision Processes*, 89–102, North-Holland, NY.

- SUGENO, M. (1985). *Industrial applications of fuzzy control*, Elsevier Science Pub. Co.
- SUGENO, M. & KANG, G.T. (1988). Structure identification of fuzzy model. *Fuzzy Sets and Syst.*, **28** (1), 15–33.
- SUGENO, M. & YASUKAWA, Y. (1993). A fuzzy-logic-based approach to qualitative modeling. *IEEE Trans. Fuzzy Syst.*, **1** (1), 7–31.
- SULOWAY, C., PULOKAS, J., FELLMANN, D., CHENG, A., GUERRA, F., QUISPE, J., STAGG, S., POTTER, C.S. & CARRAGHER, B. (2005). Automated molecular microscopy: the new Legimon system. *J. Struct. Biol.* **151**, 41–60.
- SUN, J. & LI, H. (2010). Chapter Ten - How to Operate a Cryo-Electron Microscope. *Methods in Enzymology*, **481**, 231–249.
- SUZUKI, K. (2013). Machine Learning in Computer-aided Diagnosis of the Thorax and Colon in CT: A Survey. *IEICE Transactions on Information & Systems*, E96-D: 772–783.
- SZABO, A., BOUCHER, K., CARROLL, W.L., KLEBANOV, L.B., TSODIKOV, A.D. & YAKOVLEV, A.Y. (2002). Variable selection and pattern recognition with gene expression data generated by the microarray technology. *Math Biosci.* **176** (1), 71–98.
- TAKAGI, T. & SUGENO, M. (1983). Derivation of fuzzy control rules from human operator's control action. *Proc. IFAC Symp. Fuzzy Inform., Knowledge Representation and Decision Analysis*, 55–60.
- TAKAGI, T. & SUGENO, M. (1985). Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, **15** (1), 116–132.
- TAKANA, K. & SUGENO, M. (1992). Stability analysis and design of fuzzy control systems. *Fuzzy Sets and Syst.*, **45** (2), 135–156.
- TAYLOR, K.A. & GLAESER, R.M. (1974). Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science*, **186**, 1036–1037.
- THANGAVEL, S., PALANISAMY, V., DURAISWAMY, K. & PANDIAN, S.C. (2006). Fuzzy identification and modeling of an intelligent controller for adaptive control of reactive power in a utility system using anfis. *The J. CPRI.*, **3** (1), 29–35.
- THON F. (1966). Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung. *Z. Naturforschung.* **21a**, 476–478.
- TONG, R.M. (1978). Analysis and control of fuzzy systems using finite discrete relations. *Int. J. Control*, **27**, 431–440.
- TSUNO, K. (1993). Resolution limit of a transmission electron microscope with an uncorrected conventional magnetic objective lens. *Ultramicroscopy*, **50** (3), 245–253
- TSUNO, K. (2004). Evaluation of in-column energy filters for analytical electron microscopes. *Proceedings of the Sixth International Conference on Charged Particle Optics. Nuclear Instruments and Methods in Phy-*

- sics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, **519** (1-2), 286–296.
- TSUNO, K., KANEYAMA, T., HONDA, T. & ISHIDA, Y. (1999). Design of omega mode imaging energy filters. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, **427** (1–2), 187–196.
- TURBAN, E. & ARONSON J.F. (2001). *Decision Support Systems and Intelligent Systems*. Sexta edición. Prentice Hall Englewood Cliffs, NJ.
- TURING, A.M. (1950). Computing machinery and intelligence. *Mind*, **59**, 433–460.
- TYPKE, D., DOWNING, K.H. & GLAESER, R.M. (2004). Electron microscopy of biological macromolecules: bridging the gap between what physics allows and what we currently can get. *Microsc. Microanal.* **10**, 21–27.
- VALLE, M., ZAVIALOV, A., SENGUPTA, J., RAWAT, U., EHRENBERG, M. & FRANK, J. (2003). Locking and Unlocking of Ribosomal Motions. *Cell*, **114** (1), 123–134.
- VAN BREE, P.J., VAN LIEROP, C.M.M. & VAN DEN BOSCH, P.P.J. (2010). Electron microscopy experiments concerning hysteresis in the magnetic lens system. *Control Applications (CCA), 2010 IEEE International Conference on*. 956–961.
- VAN HEEL, M., HARAUZ, G., ORLOVA, E.V., SCHMIDT, R. & SCHATZ, M. (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.* **116** (1), 17–24.
- VARGAS, J., ABRISHAMI, V., MARABINI, R., DE LA ROSA-TREVÍN, J.M., ZALDIVAR, A., CARAZO, J.M. & SORZANO, C.O.S. (2013). Particle quality assessment and sorting for automatic and semiautomatic particle-picking techniques. *Journal of Structural Biology*, **183** (3), 342–353.
- VOORHEES, R.M., FERNANDEZ, I.S., SCHERES, S.H.W. & HEGDE, R.S. (2014). Structure of the Mammalian ribosome-sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell*, **157**, 632–1643.
- VOSS, N.R., YOSHIOKA, C.K., RADERMACHER, M., POTTER, C.S. & CARRAGHER, B. (2009). DoG Picker and TiltPicker: software tools to facilitate particle selection in single-particle electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, **166** (2), 205–213.
- WADE, R.H. (1992). A brief look at imaging and contrast transfer. *Ultramicroscopy*, **46**, 145–156.
- WANG, L.X. & MENDEL, J.M. (1992). Fuzzy basis functions, universal approximation and orthogonal least squares learning. *IEEE Trans. Neural Netw.*, **3** (5), 807–814.
- WANG, Z., PALADE, V. & XU, Y. (2006). Neuro-fuzzy ensemble approach for microarray cancer gene expression data analysis. In *Evolving Fuzzy Systems, 2006 International Symposium on*, 241–246.
- WANG, L. & SIGWORTH, F.J. (2006). Cryo-EM and Single Particles. *Physiology (Bethesda)*, **21** (1), 13–18.

- WEICKENMEIER, A.L., NUECHTER, W. & MAYER, J. (1995). Quantitative characterization of point spread function and detection quantum efficiency for a YAG scintillator slow-scan CCD camera. *Optik*, **99** (4), 147–154.
- WILLIAMS, D.B. & CARTER, C.B. (2009). *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science*. Springer.
- WONG, W., BAI, X.C., BROWN, A., FERNANDEZ, I.S., HANSEN, E., CONDRON, M., TAN, Y.H., BAUM, J. & SCHERES, S.H.W. (2014). Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. *eLife* 3:e03080.
- WOOLFORD, D., ERICKSSON, G., ROTHNAGEL, R., MULLER, D., LANDSBERG, M.J., PANTELIC, R.S., MCDOWALL, A., PAILTHORPE, B., YOUNG, P.R., HANKAMER, B. & BANKS, J. (2007). SwarmPS: Rapid, semi-automated single-particle selection software. *Journal of Structural Biology*, **157** (1), 174–188.
- XING, Q. & LOGRASSO, T.A. (2009). A rapid method to correct objective lens astigmatism in a TEM. *Ultramicroscopy*, **109** (4), 287–290.
- YAN, X., CARDONE, G., ZHANG, X., ZHOU, Z.H. & BAKER, T.S. (2014). Single particle analysis integrated with microscopy: A high-throughput approach for reconstructing icosahedral particles. *Journal of Structural Biology*, **186** (1), 8–18.
- YANG H. & AHUJA N. (2014). Automatic segmentation of granular objects in images: Combining local density clustering and gradient-barrier watershed. *Pattern Recognition*, **47** (6), 2266–2279.
- YOO, S.H., OH, S.K. & PEDRYCZ, W. (2015). Optimized face recognition algorithm using radial basis function neural networks and its practical applications. *Neural Networks*, **69**, 111–125.
- ZADEH, L.A. (1965). Fuzzy sets. *Information and Control*, **8**, 338–353.
- ZADEH, L.A. (1973). Outline of a new approach to the analysis of complex systems and decision processes. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, **3** (1), 28–44.
- ZADEH, L.A. (1989). Knowledge representation in fuzzy logic. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*, **1**, 89–100.
- ZAPATA, J., VILAR, R. & RUIZ, R. (2011). Performance evaluation of an automatic inspection system of weld defects in radiographic images based on neuro-classifiers. *Expert Systems with Applications*, **38** (7), 8812–8824.
- ZHANG, J., NAKAMURA, N., SHIMIZU, Y., LIANG, N., LIU, X., JAKANA, J., MARSH, M.P., BOOTH, C.R., SHINKAWA, T., NAKATA, M. & CHIU, W. (2009). JADAS: A customizable automated data acquisition system and its application to ice-embedded single particles. *Journal of Structural Biology*, **165** (1), 1–9.
- ZHANG, X., SETTEMBRE, E., XU, DORMITZER, P.R., BELLAMY, R., HARRISON, S.C. & GRIGORIEFF, N. (2008). Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (6), 1867–1872.

- ZHAO, J., BRUBAKER, M.A. & RUBINSTEIN, J.L. (2013). TMaCS: a hybrid template matching and classification system for partially-automated particle selection. *J Struct Biol*, **181** (3), 234–42.
- ZHOU, Z.H. & CHIU, W. (1993). Prospects for using an IVEM with a FEG for imaging macromolecules towards atomic resolution. *Ultramicroscopy*, **49**, 407–416.
- ZHU, Y., CARRAGHER, B., GLAESER, R.M., FELLMANN, D., BAJAJ, C., BERN, M., MOUCHE, F., de HAAS, F., HALL, R.J., KRIEGMAN, D.J., LUDTKE, S.J., MALLICK, S.P., PENCZEK, P.A., ROSEMAN, A.M., SIGWORTH, F.J., VOLKMANN, N. & POTTER, C.S. (2004). Automatic particle selection: results of a comparative study. *J. Struct. Biol.*, **145** (1–2), 3–14.
- ZIEGLER, A., ROCKEL, B., HEGERL, R., FREITAG, B., LÜCKEN, U. & PLITZKO, J.M. (2009). Aberration-corrected microscopy for structural biology applications. *Journal of Microscopy*, **233** (1), 170–177.
- ZIMMERMANN, H.J. (1999). *Practical Applications of Fuzzy Technologies*. Kluwer Academic Publishers Norwell, MA, USA.
- ZUIDERVELD, K. (1994). Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization. *Graphic G9ms IV*. San Diego: Academic Press Professional, pp. 474–485.
- ZURADA, J.M. (1999). *Introduction to Artificial Neural Systems*. Jaico Publishing House 121, Mumbai.