



Doctoral Thesis

Digital enhancement of electron microscopical images and analysis of beam induced changes

Author(s):

Lüscher, Suzanne Beatrice

Publication Date:

1982

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000291128> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH Nr. 7025

DIGITAL ENHANCEMENT OF ELECTRON MICROSCOPICAL IMAGES AND
ANALYSIS OF BEAM INDUCED CHANGES

a dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Technical Sciences

presented by

Suzanne Beatrice Lüscher
Dipl. Math. ETH
born 24 March 1950
from Homberg BE

accepted on the recommendation of
Prof. Olaf Kübler, referee
Prof. Wolfgang F. Berg, co-referee

1982

Zusammenfassung

Ein Thema, das in der digitalen Bildverarbeitung immer mehr in den Vordergrund rückt, ist die automatische Erfassung und Auswertung von Bildinhalten (scene analysis). Ein erster, für die Bildinterpretation unerlässlicher Schritt, ist das Aufbereiten, das Verbessern der Bilder. Um problemspezifische Beurteilungskriterien zur Verfügung zu haben, sollten Bildverbesserungsverfahren nach Möglichkeit in Zusammenarbeit mit Anwendern entwickelt werden.

Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen steht eine Kategorie von Bildern zur Verfügung, die sich zur Entwicklung linearer "Enhancement" - Methoden und deren Anwendung bestens eignet. Die modernen Elektronenmikroskope besitzen ein atomares Auflösungsvermögen. Trotzdem ergeben sich bei der Untersuchung biologischer Strukturen im atomaren Bereich Schwierigkeiten. Sie rühren von der Strahlenempfindlichkeit biologischer Materie, sowie von der Präparation her. Strahlenschäden können weitgehend vermieden werden, wenn die Strahlendosis niedrig gehalten wird. "Low dose" oder "minimal beam" Aufnahmen besitzen jedoch ein Signal-Rausch-Verhältnis (S/N), das eine direkte Auswertung verunmöglicht. Mit Bildverbesserungsmethoden, die im Wesentlichen auf der Mittelung über eine möglichst grosse Anzahl identischer Motive beruhen, kann das S/N angehoben werden.

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Bereitstellung von benutzerfreundlichen, effizienten Software Routinen, die eine speditive Verarbeitung der bei biologischen Untersuchungen anfallenden grossen Datenmengen ermöglichen. Weiter sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die optimale Aufnahmedosis, d.h. die höchst mögliche Dosis, die keinen signifikanten Strahlenschaden verursacht, zu bestimmen. Dazu wurden Serien von Mikrografien desselben Präparats, aufgenommen mit verschiedenen Elektronendosen, untersucht.

Die Arbeit ist in zwei Teile gegliedert, in denen periodische (Teil I) und aperiodische (Teil II) Objekte behandelt werden.

Der erste Teil wird eingeleitet mit einer Zusammenstellung mathematischer und kristallografischer Grundlagen, die im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden. Speziell wird auf die Probleme im Zusammenhang mit der Diskreten Fouriertransformation (Aliasing, Leakage) eingegangen. Auf diesen Grundlagen wurde ein Paket von Software Routinen erstellt, deren Aufgabe die Bildverbesserung mit Fourierfiltermethoden ist. Es werden "quasi optische"-, "kristallografische-", sowie Symmetrisierungs - Techniken beschrieben.

Die erwähnten Methoden zur Verarbeitung von Mikrografien wurden auf einzelne biologische Präparate praktisch angewandt. Die Schritte des "Image Enhancement" werden an einer HPI-Layer Aufnahme demonstriert. Es zeigt sich, dass mit der aus der Kristallografie entlehnten Methode, der Bestimmung eines Phasen- und Amplituden-Paares für jeden Reflex im diskreten Fourierspektrum, die besten Resultate erzielt werden. Beim HPI-Layer lässt sich auf Grund der Symmetrierungsergebnisse P6-Symmetrie annehmen.

Quantitative Untersuchungen wurden an Dosisserien von α -Tropomyosin-, T-Layer- und Polyhead-Mikrografien durchgeführt. Die verschiedenen Präparate verhalten sich unter der Strahlenbelastung unterschiedlich. Während beim α -Tropomyosin eine strukturelle Umlagerung schon bei einer Dosis von $0.1 e/nm^2$ stattfindet, tritt beim T-Layer wie beim Polyhead bis zu einer Dosis von $1 e/nm^2$ keine signifikante Schädigung ein. Dieses Resultat legt differenzierte Untersuchungen zur Bestimmung einer individuellen Aufnahmedosis für verschiedene Objekte und unterschiedliche Präparationsmethoden nahe.

Der zweite Teil befasst sich vor allem mit Differenzbildern, die für die Untersuchung von Veränderungen aperiodischer Bildinhalte besonders geeignet erscheinen. Die Methoden basieren auf der Korrelationsrechnung, auf deren Eigenschaften bei der diskreten Anwendung eingegangen wird. Einerseits wird die Korrelationsfunktion für die geometrischen Korrekturen verwendet, die unerlässlich sind für das exakte Aufeinanderpassen zweier Bilder, andererseits können die auftretenden Veränderungen, wie die Verschiebung von integralen Bildkomponenten oder Zerstörung von Strukturen, mit Korrelationsmethoden erfasst werden.

Die entwickelten Routinen wurden mit gutem Erfolg auf Bildmaterial aus gänzlich verschiedenen Bereichen angewandt. Als Beispiel einer makroskopischen Szene wurden LANDSAT - Aufnahmen des gleichen Gebiets, aufgenommen zu verschiedenen Jahreszeiten, gewählt. Eine Dosisserie von Ferritin Mikrografien wurde untersucht als Repräsentant aus dem Bereich mikroskopischer Strukturen. Frequenzanalysen haben gezeigt, dass, wie erwartet, vor allem hochfrequente Anteile von Strahlenschäden betroffen sind. Jedoch auch gröbere, niederfrequente Strukturen, haben sich als keineswegs stabil erwiesen.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen darf geschlossen werden, dass die präsentierten Methoden geeignet sind, schnell und zuverlässig eine grosse Menge von Bilddaten zu analysieren. Durch die "Batch-Natur" der Routinen liegen die Vorteile vor allem in der routinemässigen Verarbeitung, die vom Benutzer ein Minimum an Eingriffen erfordert. Die Grenzen der "Batch - Verarbeitung" zeigen sich jedoch deutlich bei der Entwicklung von Routinen zur automatischen Interpretation von Bildinhalten. Hier scheinen interaktive Methoden unerlässlich.

Abstract

A topic of image processing which has been attracting interest more and more is the automated interpretation of image contents. A first indispensable step for scene analysis is the enhancement of the image. In order to guarantee that the specific requirements of a problem are taken into account enhancement procedures should be developed together with the user.

A category of images which is particularly well suited for the development of linear image enhancement methods and their applications is provided by electron micrographs. The electron microscopes have for some time been technically capable of imaging single atoms. Attempts to obtain molecular resolution in the case of biological objects, however, are made difficult by the material's susceptibility to ionizing radiation and by the applied preparation techniques. Beam damage can be avoided to a great extent, if the irradiation dose is kept low. Micrographs, however, recorded with low or minimal dose, possess a low signal to noise ratio (SNR) by which a direct analysis is made impossible. The SNR can be improved with image enhancement methods which are essentially based on averaging over a large number of identical "motifs".

The first aim of this thesis was to provide user-friendly, efficient software routines for processing of the large amount of data inevitable in biological investigations. A further goal was to find methods to determine the optimum recording dose, i.e. the highest dose which can be applied without inducing significant beam damage. For this purpose series of micrographs of the same preparation recorded with different electron doses were investigated.

The thesis is separated into two parts. Periodic objects will be discussed in part I, aperiodic image scenes in part II.

The first part begins with a summary of mathematical and crystallographic principles. The problems occurring from the Discrete Fourier Transform (aliasing, leakage) are discussed in detail. Based on these preparative steps a package of software routines for image enhancement was developed. The procedures make use of Fourier filter methods. "Quasi optical"-, "crystallographic"-, and symmetrisation-techniques are described.

The routines developed for the processing of electron micrographs were applied to specific biological specimens. The individual steps of image enhancement are illustrated by a micrograph of a HPI-layer preparation. It becomes clear that the best results are obtained by the crystallographic

method where a phase and amplitude pair is determined for every discrete reflexion in the Fourier spectrum. The results obtained from symmetrisation suggest that the HPI-layer possesses P6- symmetry.

Quantitative investigations were carried out on dose series of α -Tropomyosin, T-layer, and Polyhead micrographs. The various preparations behave differently under the influence of the electron beam. For the α -Tropomyosin a structural rearrangement can be observed at a dose of 0.1 e/nm^2 , whereas no significant change becomes visible up to a dose of 1 e/nm^2 for T-layer and Polyheads. These results make clear that specific investigations are necessary for the determination of an individual optimum recording dose for each specimen and different preparation techniques.

In the second part the main subject is difference images. They seem particularly well suited for the investigation of changes in images of aperiodic scenes. The methods are based on correlation techniques. Their properties are discussed for the case of a discrete application. The Cross Correlation Function (CCF) is used for the geometrical corrections which are indispensable for the exact mutual alignment of two images. The CCF is also a suitable tool for the detection and characterisation of the different changes like the displacement of integral image components or structural rearrangements.

The developed routines have been applied with good success to images of quite different contents. LANDSAT frames of the same area recorded at different times of the year were processed as an example of a macroscopic scene. A dose series of ferritin molecules was investigated as representative of microscopical structures. Frequency analysis has confirmed high-frequency components to be affected most by beam damage. Nevertheless coarse low-frequency features have been observed to be unstable also.

It may be concluded from the results that the methods presented are suited for fast and reliable processing and the analysis of large amounts of image data. The advantages of batch processing manifest themselves most in routine application where minimum interaction by the user is desirable. The limits of batch processing, however, are revealed clearly in the case of scene analysis where interactive methods seem to be indispensable for algorithm development.