

## A Glance of Electron Tomography through 4th International Congress on Electron Tomography

Im Joo Rhyu\* and Seung Nam Park

Department of Anatomy, Korea University,  
College of Medicine

(Received July 18, 2008; Accepted September 5, 2008)

**ABSTRACT** : Electron tomography (ET) is an electron microscopic technique for obtaining a 3-D image from any electron microscopy specimen and its application in biomedical science has been increased thanks to development of electron microscopy and related technologies during the last decade. There are few researches on ET in Korea during this period. Although the importance of ET has been recognized recently by many researchers, initial approach to electron tomographic research is not easy for beginners.

The 4th International Congress on Electron Tomography (4 ICET) was held on Nov 5~8, 2006, at San Diego. The program dealt instrumentation, reconstruction algorithm, visualization/quantitative analysis and electron tomographic presentation of biological specimen and nano particles. I have summarized oral presentations and analyzed the posters presented on the meeting. Cryo-electron microscopic system was popular system for ET and followed conventional transmission electron microscopic system. Cultured cell line and tissue were most popular specimens analyzed and microorganisms including bacteria and virus also constituted important specimens.

This analysis provides a current state of art in ET research and a guide line for practical application of ET and further research strategies. (유임주, 박승남: 제4회 International Congress on Electron Tomography에 대한 간략한 이해와 현황)

**Keywords** : Electron tomography, 3 D reconstruction, Cryo TEM, TEM

Electron Tomography (ET: 전자 단층영상)은 다양한 전자현미경 영상으로부터 3차원 단층영상을 구성하는 기법이다(McIntosh et al., 2005). 이미 이러한 기법은 CT (computerized tomography) 및 MRI (Magnetic Resonance Imaging) 등의 의료영상처리에 사용되는 방법으로 환자의 몸을 물리

적으로 직접적인 단면을 만들지 않고 X-ray 신호와 자장에 의해 변동된 수소원자의 에너지차를 감지하고 컴퓨터시스템에서 전기적 신호를 영상신호로 변환하여 우리 몸의 단층정보를 제공하게 되는 것이다. 즉 사람의 몸을 우리가 관찰하고자 하는 시료, X-선을 전자선이라고 생각하면 된다. X-ray를 사용하는 경우 렌즈시스템 제어의 한계로 인하여 작은 현미경적 구조미세구조적 쉽지 않으나, 전자현미경에 사용되는 전자빔은 효과적인 자기장 렌즈시스템으로 나노수준의 해상도를 제공한다. 따라서 세포생물학 분야, 구조생물학분야 및 미생물학분야에서 전자현미경을 이용한 ET는 최근 많은 연구자들의 관심의 대상이다(McIntosh et al., 2005; Mun et al., 2008).

전자현미경 영상을 이용하여 3차원 재구성을 하는 방법은 몇 가지 방법이 있다. 첫 번째는 고전적인 방법으로 연속된 박편본을 순서대로 촬영하여 얻은 연속된 전자현미경 영상을 쌓은 다음 인접한 영상들을 정렬하고, 관심 있는 구조물을 구획화하여 골격을 만들고 3차원 용적 연출(volume rendering)을 이용하여 시각화하는 방법이다(Lee et al., 2005a, b). 두 번째 방법은 물리적인 절편을 만드는 것이 아니라 두꺼운 절편을 제작한 후 specimen holder에 장착하고, 시료대(specimen holder)를  $+60^\circ \sim -60^\circ$  사이에서 일정한 간격으로 기우려가면서 얻은 영상(serial tiling image)을 참고점(fiducial gold point) 등을 이용하여 정렬하고, 역투사(back projection) 과정을 거쳐, 컴퓨터상에서 가상블록을 만들고 표면연출(surface rendering)이나, 용적연출(volume rendering) 알고리즘을 이용하여 컴퓨터모니터 상에서 3차원으로 표현될 수 있다(Kim et al., 2006). 다음 필요에 따라 관심 있는 구조물의 구획화하여 3차원 모델을 만들 수 있다. 이 기법의 또 다른 장점은 가상블록에서 원하는 방향이나 두께로 가상절편을 얻을 수 있다는 것이다. 즉, 통상 투과전자현미경용 절편이 50~90 nm인 관계로, 이 보다 작은 크기의 세포 구조를 정확하게 이해하는데 제한점이 있지만, 임의의 두께의 가상절편을 얻을 수 있어 미세구조를 좀 더 명확하게 관찰 할 수 있게 된다. 세 번째 방법은 바이러스나 상대적으로 크기가 큰 단백질의 3차 구조를 구성하는 방법으로

\* Correspondence should be addressed to Im Joo Rhyu, M.D., Ph.D., Department of Anatomy, Korea University College of Medicine, 126-1 Anam-Dong 5-Ka, Sungbuk-Ku, Seoul 136-705, Korea. Ph.: (02) 920-6149, Fax: (02) 929-5696, E-mail: irhyu@korea.ac.kr

다양한 방향으로 나타나는 2차 영상을 projection된 방향에 따라 분류, 정렬하여 모델을 만들고 이를 검증하는 과정을 거쳐 만든다(Thuman-Commike, 2001). 마지막으로 완벽한 3차원은 아니지만 입체시의 원리를 이용하여 한 쌍의 기울어진 영상을 입체시를 이용하여 우리 뇌속에서 3차원 영상을 인지하는 것이다. 이는 입체 영화 등에서 사용하는 기법으로 정확하게는 후면의 영상을 볼 수 없는 관제로 2½차원 영상이라고 한다. 이는 간단하게 원하는 구조물의 3차원적인 정보를 빨리 확인할 수 있어 자주 활용되는 기법이다(Kim et al., 2007).

이 논문에서는 2006년 11월에 미국 샌디에고에서 개최된 4th International Conference on Electron Tomography (4ICET)에 참석하는 것을 기반으로 구연발표 내용과 포스터 발표 내용을 분석하여 최근 ET 연구의 동향을 파악하고자 하였다.

우선 ET 연구의 현황과 앞으로 발전방향을 이해하기 위해 2006에 개최된 4 ICET의 초록집에 있는 약사를 인용하고자 한다. 제1회 ICET는 1997년 3월 16일~19일에 걸쳐 독일에서 개최되었고, 49명이 참가하였고, 그 결과의 일부가 Journal of Structural Biology 12월호에 특집으로 게재되었다. 4년 후인 2001년에 네덜란드 암스텔담에서 2회 ICET가 개최되었으며, 다시 3년 후 2004년에 미국 렌슬러(뉴욕주)에서 제3회 ICET가 열리게 되었다. 다시 2년 후인 2006년 11월에 미국 샌디에고에서 제4회 ICET가 개최되어 150명의 참가자가 등록하였다(Marko et al., 2008).

제4회 ICET는 2006년 11월 5일에서 8일까지 진행되었으며, 주로 최근에 중요한 연구결과를 얻은 분들이 초청되어 특강위주로 진행되었으며, 5일 저녁은 환영만찬과 Mark Ellisman과 Roger Y. Tsien의 ICET의 역사와 현재까지의 배경에 대하여 설명하였다.

6일 오전은 Instrumentation에 관한 주제가 발표가 되었는데 주로 토모그래피를 위한 전자현미경 및 CCD 카메라 시스템 등의 다양한 장비들에 대한 소개와 시료제작기법 등에 대한 연구가 소개되었다. Ellisman 등은 고압전자현미경이 ET에 효과적으로 사용될 수 있음을 역설하였고, Marko 등이 Focused Ion Beam (FIB)를 이용하여 효과적으로 동결절편의 박편을 제작할 수 있는 방법 등이 소개되었다(Marko et al., 2006). 오후에는 Imaging of Dynamic Structures (Correlative Microscopy)로 주로 형광현미경을 이용한 관찰과 형광으로 표시된 구조물을 효과적으로 전자현미경에서 연동하여 관찰한 연구들이 소개 되었다. 특히 형광 표시된 구조물을 Photo-oxidation을 이용하여 DAB신호로 전환하는 연구와, quantum dot 같은 nano particle을 이용하여 공초점현미경과 전자현미경을 이용하여 동시에 표시된 구조물을 관찰할 수 있는 기법 등이 소개되었다(Geipman et al., 2006).

7일 오전에는 3-D reconstruction algorithms, 오후에는 Visualization and quantitative analysis라는 주제로 발표가 진행되었다. ET작성에 기본이 되는 tilt/alignment 기법에 대한 소개로 참조점을 사용하는 방법과 참조점을 사용하지 않는 방법들에 대하여 논의되었고(Castaño-Díez et al., 2007), 또 다른 3-D 재구성방법인 Fourier and Radon 변환방법에 기초한 conical ET의 구성기법에 대하여 소개하였다(Zampighi et al., 2008). 오후에는 많은 연구자들에 의해 사용되고 있는 ET 소프트웨어인 IMOD의 구동 원리에 대한 소개가 있었다(Kremer et al., 1996). 주로 virus와 같은 single particle의 시각화와 모델에 활용되었던 Bsoft에서도 tilting ET를 구현할 수 있게 개선된 프로그램이 발표되었고(Heymann et al., 2008), 책장의 분비샘의 세포전체를 cryo-ET를 수행하고, 그 세포 소기관을 정량적으로 분석한 연구도 소개되었다(Noske et al., 2008).

8일에는 실험실 단위로 만들어진 ET자료를 체계적으로 관리하고 지식을 확산할 수 있는 방안들에 대해 논의되었다. 특히 국내의 기초과학지원연구소의 초고압전자현미경실에서도 참여하고 있는 국제공동과제인 E-Science Grid 체계의 활용에 대해서도 논의 되었고, ET자료의 보고 및 검색을 위한 데이터베이스로 미국을 중심으로 한 Cell Centered Database (Martone et al., 2008)에 대한 소개가 이루어졌다.

위에서 소개한 내용은 전체 발표 내용 중에 일부에 불과하며, 본 논자의 연구방향의 특성이나 이해정도에 따라 발췌된 것임을 밝힌다. 4 ICET에서 특강 및 포스터로 발표 내용 중 일부원고를 모은 특집호(Journal of Structural Biology 2008년 3월호)를 참고하면 좀 더 자세한 정보를 얻을 수 있을 것이다(Marko et al., 2008).

최근의 ET 연구의 동향을 분석하기 위하여 초록집을 중심으로 등록된 참석자의 국가 분포, 발표된 연구에 사용된 현미경의 종류 및 시료의 종류들을 분석함으로써 현재 주로 활용되고 분야와 현미경시스템에 대한 개괄적인 상황 파악을 하고자하였다.

최종적으로 등록된 인원은 모두 150명으로 등록된 연구자들은 모두 12개 국가로부터 참석하였고, 71%에 해당되는 107명이 미국에 주소를 두고 있었다. 다음으로 많은 지역은 EU로부터 참석한 연구자들로 36명으로, 네덜란드 12명, 독일 11명, 핀란드 5명, 영국 4명, 이탈리아 2명, 스페인 1명 그리고 스위스 1명이 참석하였다. 그 외 아시아 태평양 지역에서 소수가 참석 하였는데, 일본 3명, 호주 2명, 이스라엘 1명, 한국 1명이었다(Fig. 1). 지리적으로 미국에서 학술대회가 개최되었다는 것을 고려하더라도 ET에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 국가는 미국과 EU국가로 나타났으며, 특히 네덜란드와 독일에서 많은 연구가 진행되고 있음을 알 수 있다. 한국이 속해있는 아시아 태평양지역에는 일본과 호주의 연구자들이 ET연구에 관심을 갖고 있음을 알

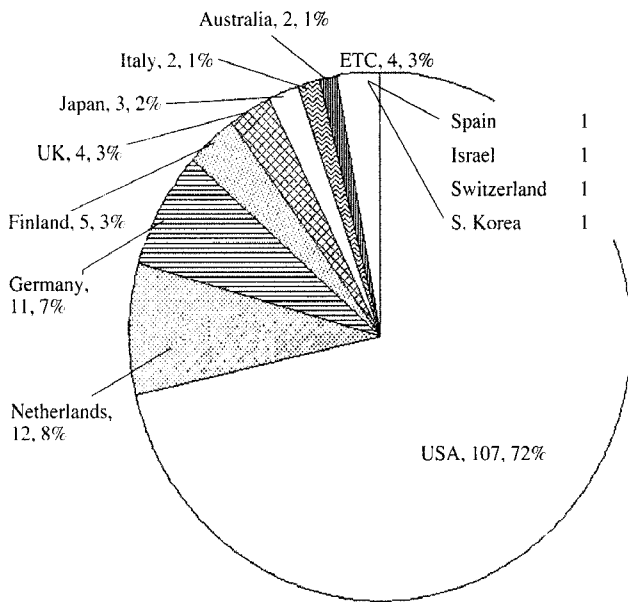


Fig. 1. Status of participants according to their nationality.

Table 1. Electron microscopic systems for electron tomography

Electron microscope	Number of abstract	Percentage
CryoTEM	32	44
TEM	31	43
HVEM*	4	6
STEM	3	4
SEM	1	1
X-ray	1	1
Total	72	100

\* includes intermediate voltage electron microscopy

Table 2. Fields of research using electron tomography

Research topic	Number of abstract	Percentage
Tissue	20	28
Cell line	16	22
Bacteria	13	18
Virus	10	14
Instrument and techniques	10	14
Nano material	3	4
Total	72	100

수 있다.

다음으로 포스터로 발표된 72개의 연구 내용을 조사하여 ET에 사용되는 현미경 시스템의 현황을 분석한 결과 Cryo-TEM과 TEM이 가장 많이 활용되고 있었으며, 특히 Cryo-TEM을 이용한 연구가 가장 많은 부분을 차지하고 있음을 알 수 있다. 특히 STEM이나 SEM을 이용한 ET기법들이 활용되기 시작하고 있음을 알 수 있다(Table 1).

연구대상을 분석한 결과를 살펴보면 주로 조직과 세포를

대상으로 한 연구가 50%를 차지하고 있었고, 미생물분야의 연구도 활발하여 32% 정도의 포스터가 박테리아 및 바이러스의 구조 연구를 위해 ET를 활용하고 있었다. 약 14% 정도가 ET를 위한 기기 및 제반 기술에 대한 연구에 관한 내용이었다. 그 외 최근 개발이 되어 활용되고 있는 nano material의 구조에 관한 연구도 소개되기 시작하였다(Table 2). 이러한 경향은 앞으로 ET가 생물조직, 미생물 및 나노기술 분야에 중요한 연구수단으로 적용될 수 있음을 시사한다.

이상으로 ET에 대한 간단한 소개와 제4차 ICET의 발표 내용을 분석함으로써 최근 ET분야의 최신 연구 동향을 살펴보았다. ET를 이용한 연구가 지속적으로 발전하고 양적으로도 증가하고 있음을 알 수 있었다. 특히 ET의 기술적 특징이 생물학(BT) 분야뿐 아니라 NT 및 IT 망라하는 다학문적 접근을 요구하는 것을 알 수 있어, 최근 과학 분야에서 지향하는 융합연구의 좋은 모델로 판단되며 많은 국내 외적으로 많은 연구결과가 도출될 것으로 기대한다.

## 사 사

이 논문의 작성시 자료 분석에 도움을 준 이세정, 박종희 양에게 감사를 포함합니다.

## 참 고 문 헌

Castano-Díez D, Al-Amoudi A, Glynn AM, Seybert A, Frangakis AS: Fiducial-less alignment of cryo-sections. *J Struct Biol* 159 : 413-423, 2007.

Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY: The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312 : 217-224, 2006.

Heymann JB, Cardone G, Winkler DC, Steven AC: Computational resources for cryo-electron tomography in Bsoft. *J Struct Biol* 161 : 232-242, 2008.

Kim IS: High voltage electron microscopy of structural patterns of plastid crystalline bodies in *Sedum rotundifolium*. *Korean J Electron Microscopy* 36 : 73-82, 2006. (Korean)

Kim JW, Lee SJ, Rhyu IJ: Construction of anaglyphic stereo pair image using adobe photoshop program. *Korean J Electron Microscopy* 37 : 143-146, 2005.

Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR: Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116 : 71-66, 1996.

Lee KJ, Kweon HS, Kang S, Rhyu IJ: 3-Dimensional reconstruction of parallel fiber-purkinje cell synapses using high-voltage electron microscopy. *Korean J Electron Microscopy* 35 : 31-39, 2005a.

Lee KJ, Park CH, Rhyu IJ: Efficient three-dimensional reconstruction

- tion of synapse with high-voltage electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 54 : 139-41, 2005b.
- Marko M, Ellisman M, Medalia O: The 4th international conference on electron tomography. *J Struct Biol* 161 : 219, 2008.
- Marko M, Hsieh C, Moberlychan W, Mannella CA, Frank J: Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryo-ultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples. *J Microsc* 222 : 42-47, 2006.
- Martone ME, Tran J, Wong WW, Sargis J, Fong L, Larson S, Lamont SP, Gupta A, Ellisman MH: The cell centered database project: an update on building community resources for managing and sharing 3D imaging data. *J Struct Biol* 161 : 220-231, 2008.
- McIntosh R, Nicastro D, Mastronarde D: New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* 15 : 43-51, 2005.
- Mun JY, Lee KE, Han SS: Techniques for Cryo-electron Tomography in Biological Field. *Korean J Microscopy* 38 : 73-79, 2008. (Korean)
- Noske AB, Costin AJ, Morgan GP, Marsh BJ: Expedited approaches to whole cell electron tomography and organelle mark-up in situ in high-pressure frozen pancreatic islets. *J Struct Biol* 161 : 298-313. 2008.
- Thuman-Commike PA: Single particle macromolecular structure determination via electron microscopy. *FEBS Lett* 505 : 199-205, 2001.
- Zampighi GA, Fain N, Zampighi LM, Cantele F, Lanzavecchia S, Wright EM: Conical electron tomography of a chemical synapse: polyhedral cages dock vesicles to the active zone. *J Neurosci* 28 : 4151-4160, 2008.