

Application of the Band-pass Filtering for Improving 3D Tomogram of Micron-thick Sections of Biological Specimens

Keun Yong Ryu^{1,3}, Mi-Jeong Kim¹, Ki-Joo Choi¹,
A-Reum Je¹, Soo Jin Kim¹, Chulhyun Lee²,
Hyun Suk Jung¹, Jong Won Park^{3,*}, Hee-Seok Kweon^{1,*}

¹Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, 169-148 Gwahangno, Daejeon 305-806, Korea

²Division of Magnetic Resonance Research, Korea Basic Science Institute, 804-1 Ochang, Chungbuk 363-883, Korea

³Information Communications Engineering Department, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received June 5, 2012; Revised June 27, 2012;

Accepted June 27, 2012)

ABSTRACT : Electron tomography (ET) of biological specimens is performed from a series of images obtained over a range of tilt angles in a transmission electron microscope. When using the high voltage electron microscope (HVEM), various noises appear in EM images acquired from thick sections by high voltage electron beam. In order to obtain an adequate result in electron tomograms that allow visualization of rather complex and mega-cellular structure such as brain tissue, it is necessary to remove the noise in each original tilt images of thick section. Using band-pass filtering of original tilt images, the filtered images are obtained and used to assemble a reconstructed tomogram. The qualified 3D tomogram from filtered images results in a considerable reduction of the noises compared to conventional tomogram. In conclusion, this study suggests that band-pass filtering is effective to improve the brightness and intensity of HVEM produced tomograms acquired from micron-thick sections of biological specimens. (류근용, 김미정, 최기주, 제아름, 김수진, 이철현, 정현석, 박종원, 권희석: 생물시료의 3D Tomogram 정밀도 개선을 위한 Band-pass Filtering 활용)

Keywords : Band-pass filter, Electron tomography, High voltage electron microscope

Electron tomography (ET)는 3차원 구조 복원을 위한 전자현미경 분석법으로, 실험대상으로부터 얻어진 2차원 전자현미경 영상의 정보 값을 계산하여 3차원 영상으로 재구성하

도록 고안되었다(Frank, 2006). 즉 관찰 시료에 전자선을 투과시키고 x축과 y축을 중심으로 좌우 경사각도를 일정하게 증가시킴으로써 얻어진 2차원 영상을 일련의 영상처리 과정을 통하여 관심영역에 대한 3차원의 구조로 복원하는 것이다. 또한 ET 기법은 분자 수준에서의 구조와 기능 간의 관계를 연관지어 이해할 수 있다는 점에서 현대 생물학에 있어 가장 중요한 연구 기법으로 부상하고 있다(McIntosh et al., 2005). 특히 컴퓨팅 기술 및 관련 소프트웨어의 발달과 더불어 시료의 3차 구조 복원을 위한 다양한 노력이 지속되었으며 실제로 괄목할 만한 발전을 이루게 되었다(Moon et al., 2008; Rhyu & Park, 2008). 그리고 ET 기법은 전자현미경의 가속전압이 높을수록 시료에 대한 전자선의 투과력이 강하기 때문에 보다 두꺼운 두께의 구조물에 대한 3차원 구조 복원에 유리하다. 초고전압 투과전자현미경 (JEM-ARM 1300S, JEOL, Japan; HVEM)은 1,250 kV의 초고전압을 사용함으로써 고분해능과 고투과력의 특성을 보유하여 상대적으로 두꺼운 시료에 대한 ET 분석을 위하여 최고의 장비로써 활용되고 있다(Takaoka et al., 2008). 그러나 고전압의 사용으로 인해 HVEM에서 획득한 영상에는 다양한 노이즈를 포함하고 있으며, 이러한 노이즈는 전자현미경 영상의 밝기와 명암대비(contrast)를 현저히 떨어뜨리는 결과를 가져온다. 따라서 획득한 원본 영상으로부터 불필요한 노이즈를 최대한 제거하는 것은 최상의 결과 획득을 위하여 반드시 필요하다.

본 연구에서는 HVEM에 의해 얻어진 일련의 2차원 영상에 대하여 band-pass filter (Cichocki & Amari, 2002)를 적용하고 이들 영상을 이용하여 3차원 재구성을 실시한 후 각각의 결과에 대하여 초고전압의 사용으로 인해 발생한 노이즈의 제거 효과를 비교·분석하였다.

실험에 사용된 시료는 소의 신장 내 chromaffin cell, 생쥐의 뇌조직 그리고 cyano bacteria이며 이를 일반적인 전자현미경 시료 제작 방법에 따라 Epon 812에 포매하여 사용하였다. Fiducial marker로는 박편의 표면에 직경 10~20 nm의 금입자를 도포하여 사용하였으며 전반적인 ET 과정은 Kweon 등(Kweon et al., 2004)의 방법을 따랐다. 각 시료들

본 연구는 한국기초과학지원연구원 미래전략연구사업 “뇌기능 융합영상기술 개발(T32404)”의 지원에 의해 이루어졌음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Hee-Seok Kweon, Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, 169-148 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea. Ph.: (042) 865-3685, Fax: (042) 865-3939, E-mail: hskweon@kbsi.re.kr

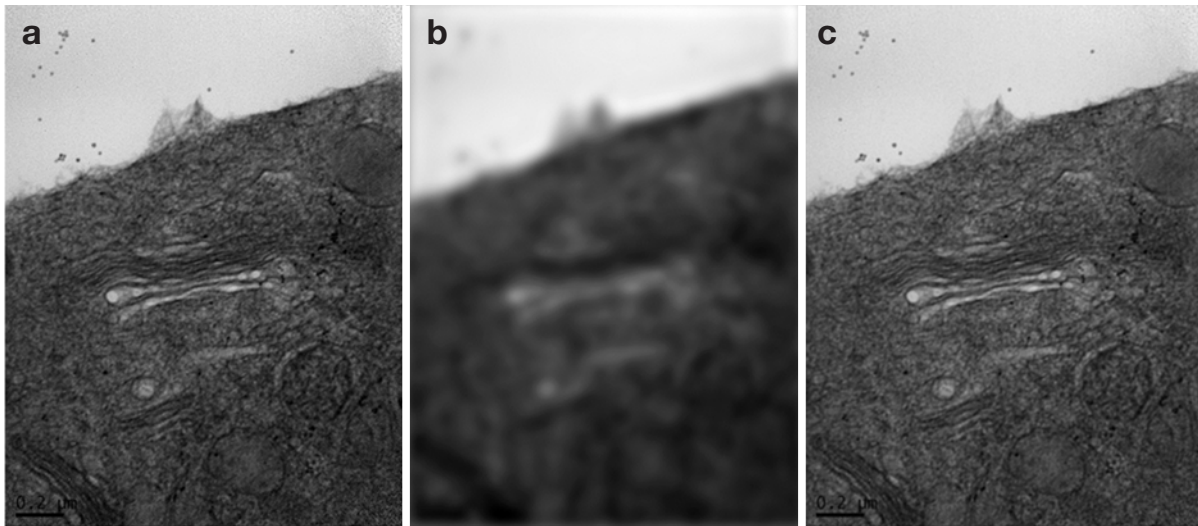


Fig. 1. TEM micrographs of the Golgi complex in chromaffin cell. (a) Example of an original image. (b) Example of a filtered image with band of 0.01~0.02/pixel. (c) Example of a filtered image with bandwidth of 0.1~0.2/pixel. Section thickness: 250 nm.

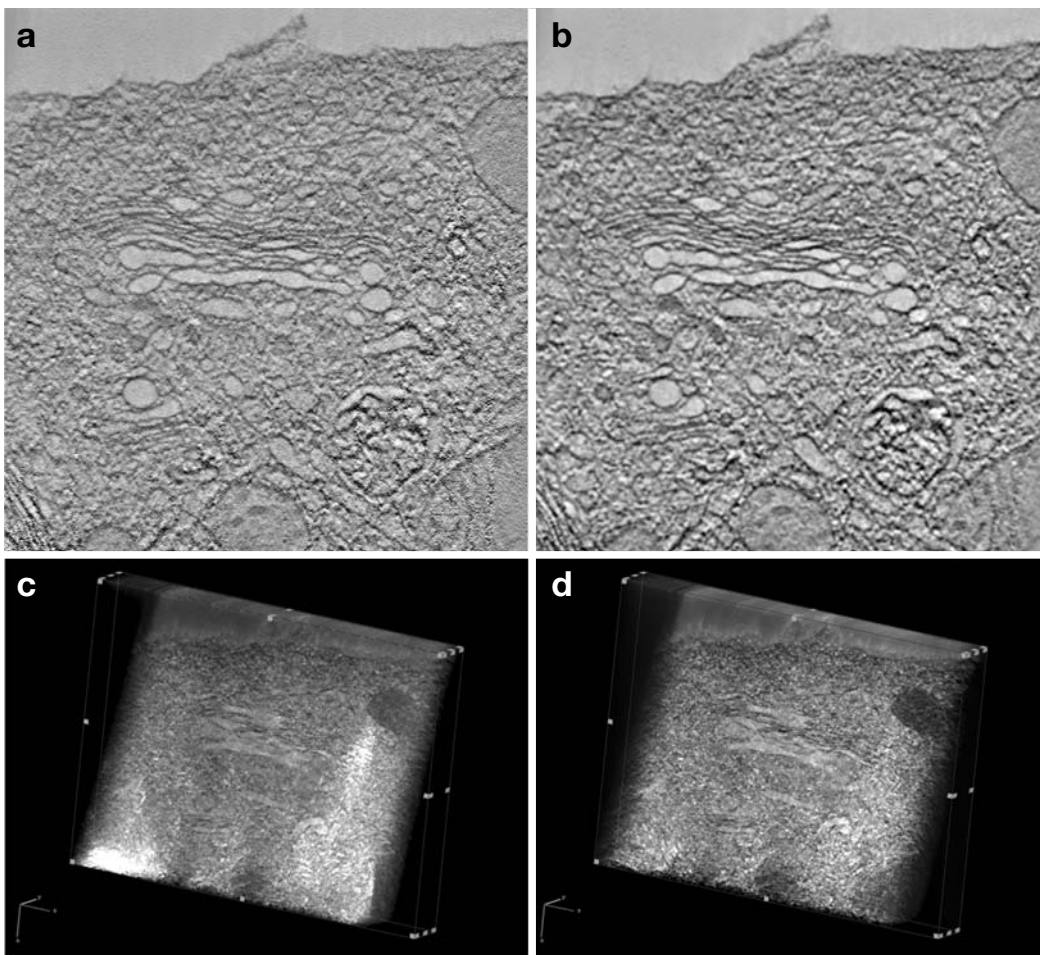


Fig. 2. Electron tomograms and 3D views of Golgi complex in chromaffin cell. The upper panels show a central image of electron tomographic slices generated from original images (a) and images filtered with band of 0.1~0.2/pixel (b) and the lower panels show a reconstructed tomogram of original images (c) and images (d) filtered image with bandwidth of 0.1~0.2/pixel. Section thickness: 250 nm.

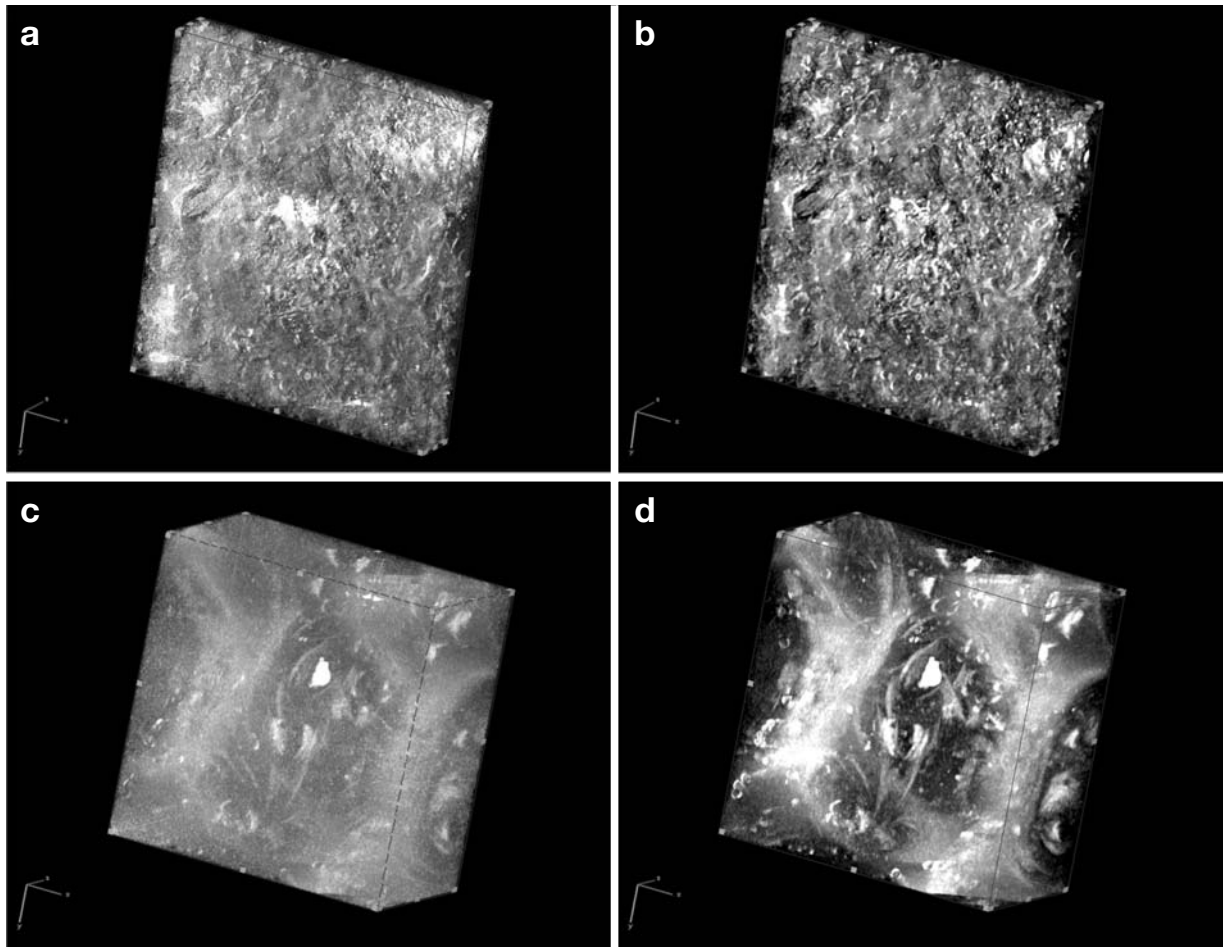


Fig. 3. Reconstructed tomograms of thick sections of mouse brain (a and b) and cyanobacteria (c and d). The left panels show 3D volumes generated from original images and the right panels show 3D volumes generated from filtered images with bandwidth of $0.1 \sim 0.2/\text{pixel}$. Section thickness: (a) $1 \mu\text{m}$; (c) $2 \mu\text{m}$.

은 일반 전자현미경으로는 관찰이 불가능한 $500 \text{ nm} \sim 5 \mu\text{m}$ 두께로 절단하여 *En bloc* 염색을 실시한 후 HVEM으로 관찰하였다. 모든 시료의 electron tomogram은 각 2° 간격으로 $\pm 60^\circ$ 까지 tilting을 실시함으로써 총 61장의 원본 이미지를 획득하여 사용하였다.

상기 방법에 따라 준비한 결과에 대하여 필터링의 효과를 확인하기 위하여 원본 데이터와 $0.01 \sim 0.02/\text{pixel}$ filter radius 대역으로 band-pass filtering을 적용한 데이터, 그리고 $0.1 \sim 0.2/\text{pixel}$ filter radius 대역으로 band-pass filtering을 적용한 데이터의 3개 그룹으로 분리한 뒤 각각을 IMOD (Kremer et al., 1996)를 이용하여 tomogram으로 재구성하였다. 그리고 band-pass filtering의 데이터 연산은 SPIDER (Frank et al., 1996)의 FQ (Filter-Quick Fourier) routine을 통해 수행하였다. 이어서 원본 데이터로부터 재구성한 tomogram과 필터링한 영상으로부터 재구성한 tomogram에 대하여 Amira 5.3 (Visage Imaging, USA)을 통해 3차원 영상으로

비교하였다.

Fig. 1은 원본 데이터와 band-pass filter를 이용하여 필터링한 영상들을 각각 비교한 결과이다. Fig. 1a는 전자현미경에서 직접 찍은 원본 영상으로써 세포질의 전자밀도가 상대적으로 높아 대부분의 막성 구조물들의 명암대비가 떨어지는 현상이 나타나고 있다. 이 원본 데이터에 band-pass filter를 이용하여 영상의 개선 정도를 확인하였다. Fig. 1b는 $0.01 \sim 0.02/\text{pixel}$ filter radius의 대역 값으로 band-pass filtering을 적용한 결과이고, Fig. 1c는 $0.1 \sim 0.2/\text{pixel}$ filter radius의 대역 값으로 band-pass filtering을 적용한 결과이다. Fig. 1c는 필터링에 의해 노이즈가 제거되었지만 영상 자체로는 그 효과를 분명하게 확인하기 힘들고, Fig. 1b는 오히려 영상 자체가 너무 흐려져서 세포 내 구조를 파악할 수가 없었다. 따라서 Fig. 1b는 제외하고 Fig. 1a와 Fig. 1c를 선택하여 tomogram 상의 필터링 효과를 확인하기 위하여 IMOD를 이용해 tomogram으로 재구성하였다.

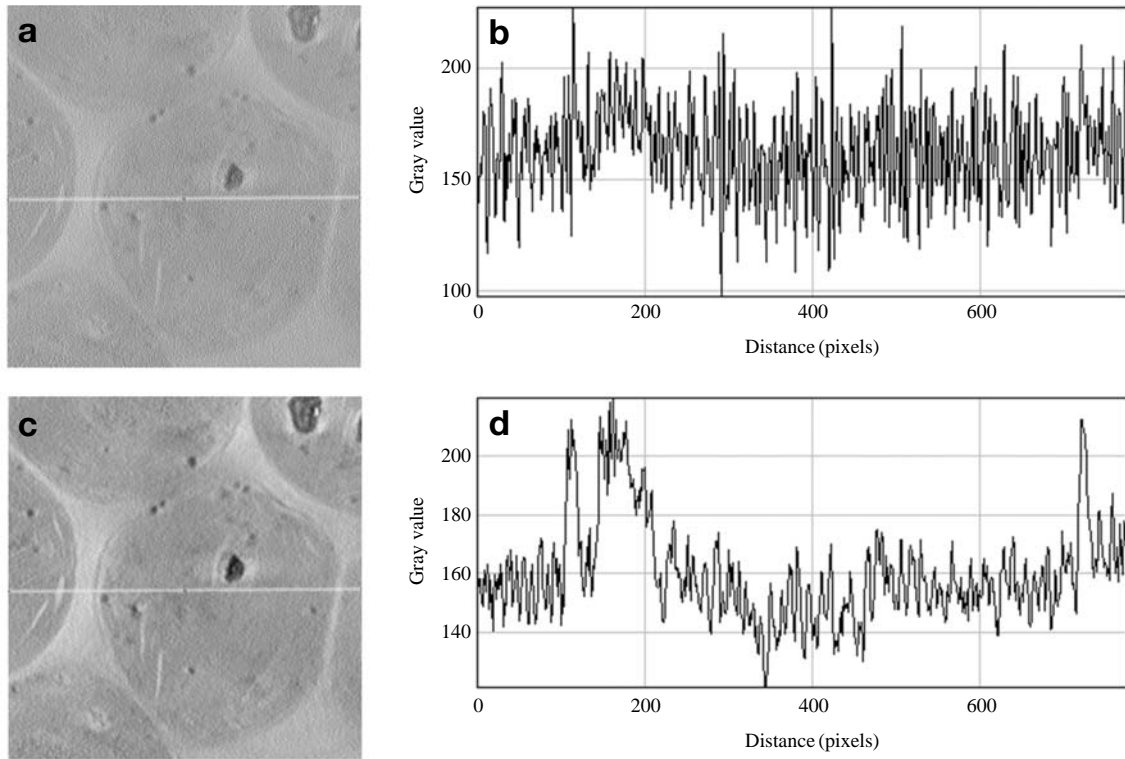


Fig. 4. The left panels show the middle slice of each tomogram generated from original images (a) and filtered images (b) and the right panels show the grey value profiles along the middle line of each images.

Fig. 2는 원본과 필터링한 데이터를 이용한 tomogram을 비교한 것으로서 원본으로부터 재구성한 tomogram (Fig. 2a) 보다 band-pass filtering을 적용하여 재구성한 tomogram (Fig. 2b)의 경우 명암차와 선명도가 더 증가했음을 보여주고 있다. 즉 tomogram으로 만들기 전의 필터링된 독립 영상들에서는 필터링의 효과를 구분하기 어려웠으나 tomogram으로 재구성한 경우에는 명암차와 선명도의 개선된 효과를 분명하게 확인할 수 있었으며, 이러한 차이를 통하여 세포 내의 골지체를 비롯한 다양한 막성 구조물들을 더욱 선명하게 관찰할 수 있었다.

Fig. 2의 c와 d는 각각의 영상을 3차원으로 확인했을 때 필터링의 효과를 더욱 확실하게 확인할 수 있음을 보여주고 있다. Fig. 2의 c와 d는 원본 데이터 (Fig. 2a)와 band-pass filtering을 적용한 데이터 (Fig. 2b)로부터 재구성한 tomogram을 Amira software를 통해 동일한 부분을 3차원으로 관찰한 결과이다. Fig. 2c는 노이즈에 의하여 세포 내 미세구조의 확인이 불분명하지만, Fig. 2d는 원본 이미지에서 노이즈를 제거함으로써 세포 내의 다양한 막성 구조를 보다 정확하게 확인할 수 있다. Fig. 3은 상대적으로 두꺼운 시료에 대하여 Fig. 2와 동일한 방법으로 band-pass filter를 적용하여 생산된 tomogram을 관찰한 결과로써 Fig. 2와 마찬가지로 필터링을 적용하기 전의 경우에서 보다 증강된 선명

도와 명암차로 조직 내의 미세구조를 명확하게 확인할 수 있음을 보여준다. Fig. 4는 각 tomogram으로부터 생산된 이미지에 존재하는 전체 픽셀에 대한 grey value의 변화 양상을 ImageJ software (Michael et al., 2004)의 “Plot profile” tool을 통하여 비교한 결과로써, 제시된 grey value의 highest and lowest peak값들은 각 이미지에 존재하는 명암차를 표현할 수 있는 척도로 활용할 수 있다. 각 이미지상의 중앙 라인을 따라 측정된 결과를 볼 때 (in Fig. 4a & c), Fig. 4d의 grey value profile이 동일 distance구간 (20 pixels)에서 Fig. 4b에 비해 진폭 차가 현저하게 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

일반적으로 Band-pass filtering 기법은 디지털 영상 기기를 통하여 제작된 영상의 품질에 대해 특정한 대역의 노이즈를 상쇄시킴으로써 원본보다 개선된 영상을 얻는데 사용하고 있다. 본 연구에서는 전자현미경에서 생산된 2차원 영상에 대해 영향을 미치지 못하는 Band-pass filter가 필터링된 동일 영상에 대하여 3차원 tomogram으로 재구성했을 경우 노이즈 제거 효과가 현저히 증강된다는 사실을 증명하였다. 이 기법은 특히 노이즈 발생 가능성이 높은 수 마이크로 두께의 시료 및 에너지 필터 사용이 불가능한 장비에서 생산된 영상에 대하여 선명도와 명암차의 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 향후 HVEM을 활용한

whole cell tomography 기법과 함께 뇌 과학 분야의 구조 및 기능 연구에 적용할 경우 보다 나은 결과를 얻을 수 있음을 제시하였다.

참 고 문 헌

- Cichocki A, Amari S: Adaptive Blind Signal and Image Processing: Learning Algorithms and Applications. In: Using Bank of Adaptive Bandpass filter, pp. 202-204, John Wiley & Sons, New York, 2002.
- Frank J: Electron tomography: Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell. In: Principle of Electron Tomography, pp. 1-13, Springer, New York, 2006.
- Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A: SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related field. *J Struct Biol* 116: 190-199, 1996.
- Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh J: Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116 : 71-76, 1996.
- Kweon HS, Beznoussenko GV, Micaroni M, Polishchuk RS, Trucco A, Martella O, Giandomenico D, Marra P, Fusella A, Pentima A, Berger EG, Geerts WJC, Koster AJ, Burger KNJ, Luini A, Mironov AA: Golgi enzymes are enriched in perforated zones of Golgi cisternae but are depleted in COPI. *Mol Biol Cell* 15 : 4710-4724, 2004.
- Macro S, Boudier T, Messaoudi C, Rigaud JL: Electron tomography of biological samples. *Biochem* 69 : 1219-1225, 2004.
- McIntosh R, Nicastro D, Mastronarde DN: New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* 15 : 43-51, 2005.
- Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ: Image processing with ImageJ. *Biophotonics Intl* 11 : 36-42, 2004.
- Moon JY, Lee KE, Han SS: Techniques for cryo-electron tomography in biological field. *Kor J Microsc* 38 : 73-79, 2008.
- Rhyu IJ, Park SN: A glance of tomography through 4th international congress on electron tomography. *Kor J Microsc* 38 : 275-278, 2008.
- Takaoka A, Hasegawa T, Yoshida K, Mori H: Microscopic tomography with ultra-HVEM and applications. *Ultramicrosc* 108 : 230-238, 2008.