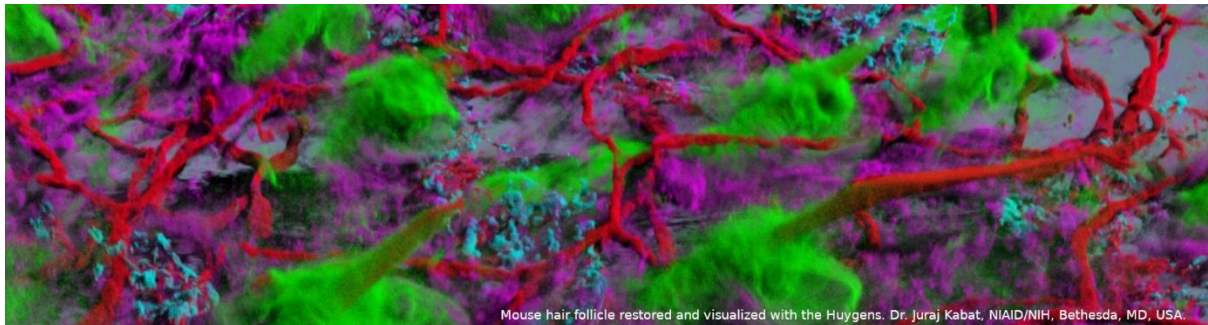


Identiek licht uit een fluorescentiemicroscopie sorteren

Met fluorescentiemicroscopie breng je verschillende onderdelen van levende cellen in beeld, door ze aan eiwitten met verschillende kleurstoffen te laten binden. Het bedrijf Scientific Volume Imaging ontwikkelt de analysesoftware voor zulke microscoopbeelden en vraagt: kun je die eiwitten ook onderscheiden als ze bijna dezelfde kleur uitzenden? De deelnemers aan de Studiegroep Wiskunde met de Industrie vinden een verrassend krachtige oplossing.

Wil je als levenswetenschapper tot binnenin een levende cel kijken, dan is *fluorescentiemicroscopie* een uitgelezen techniek. Door fluorescerende 'labels' te koppelen aan eiwitten die zich aan specifieke celonderdelen binden, kun je precies zien waar bijvoorbeeld de celkern of -wand zit, of waar veel energie wordt verbruikt. Na belichting met de juiste kleur licht (*excitatie*) zenden de kleurstoffen namelijk fluorescerend licht uit met een kenmerkende golflengte.



Fluorescentiemicroscopie-opname van een muizenfollikel, gereconstrueerd en gevisualiseerd met het softwarepakket Huygens van SVI. Bron: Dr. Juraj Kabat, NIAID / NIH, Bethesda, MD, VS.

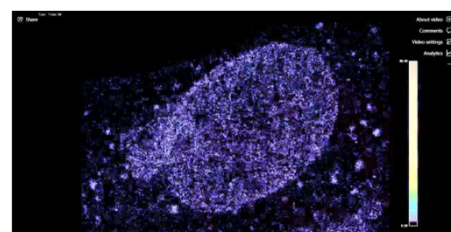
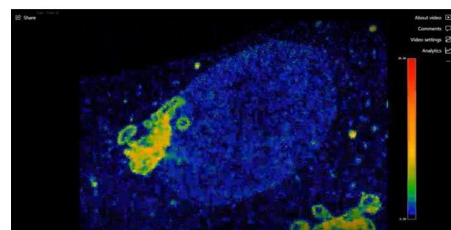
Onderscheiden

Het Nederlandse bedrijf *Scientific Volume Imaging* ontwikkelt software die data uit fluorescentiemicroscopen pixel voor pixel analyseert. "Als je meerdere celonderdelen tegelijkertijd onderzoekt, is het zaak om verschillende kleurstoffen te gebruiken. Anders zijn ze niet makkelijk te onderscheiden", legt wetenschappelijk ontwikkelaar Michel Ram van SVI uit.

Soms is de keuze van kleurstoffen echter beperkt, bijvoorbeeld door de bindingsmechanismen aan de biologische componenten. Om de verschillende eiwitten dan toch te kunnen onderscheiden, gebruikt SVI de levensduur van het fluorescentieproces. Ram: "Na excitatie duurt het typisch 1 tot 5 nanoseconden voor de kleurstof een lichtdeeltje uitzendt. Die vervaltijd verschilt per kleurstof."

Vervaltijden

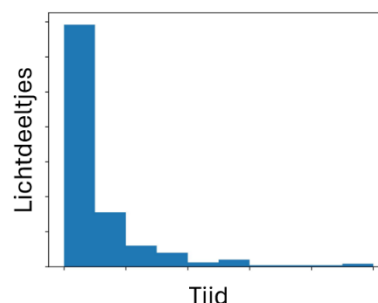
Een nieuw type sensor kan de aankomsttijd van lichtdeeltjes in de fluorescentiemicroscopie meten. Is daaruit de vervaltijd te bepalen om zo kleurstoffen te onderscheiden? Dat zou interessant zijn, want die vervaltijden zijn deels afhankelijk van de temperatuur of zuurtegraad. Afwijkingen van de standaard geven dus extra informatie over het binnenste van de cel. En als je die vervaltijden eenmaal weet, kun je dan per pixel bepalen wat de verhouding is van de twee kleurstoffen? Michel Ram en zijn collega Frans van der Have leggen het vraagstuk voor aan SVI.



Fluorescentie van getagde eiwitten op verschillende tijdstippen. Bron: SVI

De case van SVI lijkt op maat gesneden voor wiskunde-promovendus Koen Keijzer: aan de Universiteit Leiden onderzoekt hij namelijk de wiskunde van biologische systemen zoals de groei van bloedvaten. "Dit leek me een mooie manier om de andere kant van mijn dagelijkse samenwerking met biologen te bekijken, namelijk hoe de microscoop-opnames van mijn collega's worden omgezet in bruikbare data."

Simpelweg de aankomsttijd van lichtdeeltjes per pixel plotten en exponentieel vervallende functies door de datawolk trekken is niet genoeg, geeft SVI de wiskundigen alvast mee. Per pixel komen maar zo'n 10 lichtdeeltjes binnen. Door meet-onzekerheden zijn daarom altijd meerdere combinaties van vervaltijden te vinden die hetzelfde gedrag geven.

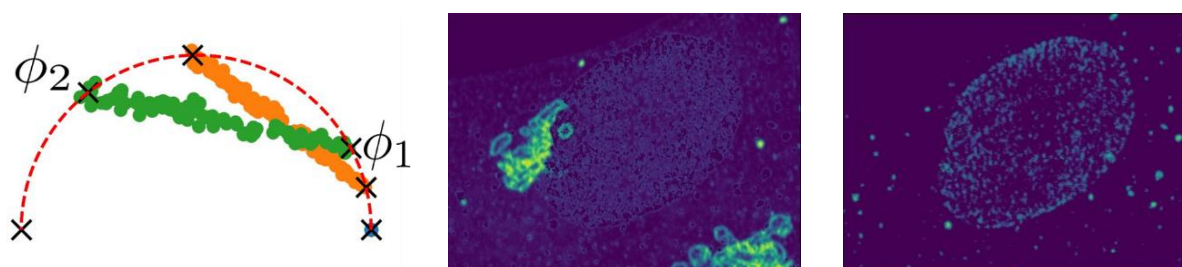


Gemeten lichtdeeltjes in de tijd.
Bron: SVI

Robuust

De wiskundigen bouwen daarom in een kleine week een tool die kunstmatige fluorescentiedata maakt om hun analyses op uit te voeren. Ze gebruiken eerst de *phasor*-analyse die SVI zelf ook heeft getest. Deze analyse onderscheidt trage en snelle veranderingen in de uitdovende kleurstoffen met een wiskundige *Fouriertransformatie*.

"De phasor-aanpak was heel populair in de recente literatuur, maar wiskundig was op voorhand niet duidelijk waarom dit de beste keus zou zijn", stelt Keijzer. Toch blijkt de methode onverwacht 'robuust'. Na wat analyse snaptten de onderzoekers waarom: "Deze aanpak is heel effectief in het onderdrukken van meetruis." Beter zelfs dan standaardmethoden uit de statistiek die de wiskundigen uitproberen, waaronder de 'method of moments'; een techniek om eigenschappen van een verzameling metingen te analyseren.



Van links naar rechts: phasor-berekening en reconstructies van twee verschillende kleurstoffen. Bron: SWI

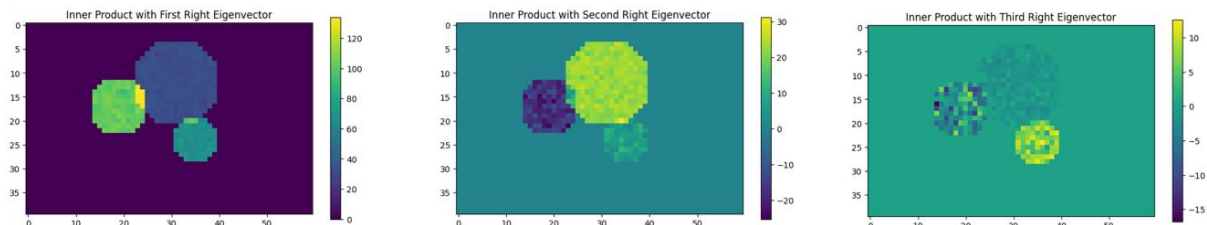
Onverwacht

Door op de ingeslagen weg dus, voor SVI? Niet helemaal. In een eindsprint werkt een van de wiskundigen een compleet nieuwe manier uit om de vervaltijden van fluorescerende eiwitten te bepalen.

De nieuwe aanpak werkt niet per afzonderlijke pixel, maar kijkt juist naar de relatie tussen naburige pixels. Die is te vangen in een tijdsafhankelijke matrix, en door die op de juiste manier uiteen te rafelen met *singular value decomposition* scoort het team een onverwacht resultaat: de analyse blijkt te kunnen voorspellen hoeveel verschillende kleurstoffen er in een meting aanwezig zijn. Die informatie moet je in andere methodes handmatig toevoegen.

"We waren onder de indruk dat de groep in zo'n korte tijd verschillende, vernieuwende oplossingsrichtingen heeft getest", kijkt Michel Ram terug. Zo is er ook een model opgezet dat het vervalgedrag van kleurstoffen voorspelt met exacte formules. Dat kost wel extra rekentijd, omdat je de uitkomst steeds verder verfijnt met herhaalde rekenstappen. Ram: "Dit *Discrete Time Multi-Rate Decay Model* is mogelijk te combineren met de *Maximum Likelihood*-methode die wij zelf ook al toepassen en verdient zeker een eervolle vermelding!"

Ook de singular value decomposition valt in de smaak: "Deze methode lijkt goed geschikt als screening vooraf, om te zien hoeveel verschillende stoffen er in de data zitten", denkt Michel Ram. "Op basis van deze eerste schatting kunnen we de phasor-methode vervolgens gericht uitvoeren. We zijn zeker van plan deze bevindingen verder uit te diepen."



Singular value decomposition-aanpak, die door analyse van naburige pixels het aantal verschillende kleurstoffen in een opname kan bepalen. Bron: SWI

Bij de hoorns

Michel Ram is positief over de deelname aan SWI: "De deelnemers stelden doelgerichte vragen en vatten het probleem meteen bij de hoorns. We hebben ook genoten van hun bezoek aan ons bedrijf om te praten over het probleem en de mogelijke oplossingsrichtingen, ondanks de tijdsdruk voor dit project. Dat klikte zo goed dat we zijn blijven zitten voor een gezellige borrel."

Ook Koen Keijzers is tevreden met het resultaat. "Ik was geïnteresseerd in het soort problemen dat je als wiskundige tegenkomt buiten de universiteit en onderzoeksinstituten. Dat bleek erg leuk. Deze workshop was anders dan de universiteit, waar je soms op een eilandje alleen werkt. Hier kreeg ik veel energie van werken aan een gezamenlijk doel met een diverse club mensen. Nu terug naar het afronden van mijn proefschrift!"