
Samenvatting

De ontwikkeling van fluorescentie microscopie heeft in de afgelopen tien jaar bijgedragen aan revolutionaire vooruitgangen in de biologie en heeft nieuwe wegen geopend voor het bestuderen van intracellulaire dynamische processen. Een eenvoudige beschrijving van soms complexe bewegingspatronen in levende cellen kan inzicht geven in de onderliggende mechanismen die deze bewegingen bepalen. Nauwkeurige en reproduceerbare methoden voor het verwerken en analyseren van de beelden die gemaakt worden voor dergelijke studies zijn echter nog schaars. Omdat handmatige beeldanalyse tijdrovend is, mogelijk onnauwkeurig, en slecht reproduceerbaar, worden veel vraagstukken die biologisch zeer relevant zijn niet behandeld, of beantwoord met grote onzekerheid. Het is daarom cruciaal dat er automatische beeldanalysetechnieken worden ontwikkeld voor het accuraat en reproduceerbaar volgen en analyseren van intracellulaire structuren in microscopische beeldseries.

Recente onderzoeken hebben aangetoond dat het menselijk visueel systeem in hoge mate spatiële en temporele informatie integreert. Locale bewegingssignalen zijn vaak voor velerlei uitleg vatbaar, en veel van deze dubbelzinnige verschijnselen kunnen worden opgelost door het veronderstellen van samenhang in de tijd. Men heeft daarom voorgesteld om invoerdata te groeperen in de tijd en deze daarna te gebruiken voor het voorspellen en schatten van de bewegingsstromen in beeldseries. Een dergelijke groepering in de tijd kan worden beschreven in termen van een Bayesiaanse generalisatie van het zogenaamde Kalman filter. Bestaande technieken, hetzij commercieel, hetzij academisch, voor het volgen van objecten in beeldseries maken in het algemeen zeer beperkt gebruik van tijdsinformatie en a priori kennis over de (beweging van de) objecten.

Het thema van deze dissertatie is de ontwikkeling en toepassing van zogenaamde “particle filtering” methoden voor het volgen van meerdere subcellulaire objecten in biologische beeldseries. Particle filtering (PF) is een techniek voor het uitvoeren van recursieve Bayesiaanse schattingen door middel van Monte Carlo bemonstering. De Bayesiaanse aanpak biedt de mogelijkheid om informatie over het beeldvormende systeem, mogelijke ruisbronnen, en het dynamisch gedrag van de te volgen objecten te modelleren in termen van kansdichtheden. Het is echter meer een recept dan een direct toepasbare oplossing voor een gegeven probleem, en moet daarom in de praktijk geconcretiseerd en geïmplementeerd worden, bijvoorbeeld met behulp van de PF benadering. De keuze voor een PF benadering levert echter niet een uniek algoritme op, en er zullen voor verschillende toepassingen verschillende algoritmische afwegingen moeten worden gemaakt. Zoals door sommige methodologen in het vakgebied wordt

gezegd, is het ontwerpen van efficiënte PF algoritmen nog steeds meer een kunst dan een wetenschap. In deze dissertatie wordt een aantal nieuwe PF methoden beschreven voor intracellulaire bewegingsanalyse. De toepasbaarheid van deze methoden wordt gedemonstreerd en geëvalueerd, zowel voor robuuste en nauwkeurige detectie en het volgen van grote aantallen kleine objecten in 2D en 3D beeldseries verkregen met behulp van fluorescentie microscopie, als voor de analyse van dynamische parameters in zogenaamde kymografische beelden.

In tegenstelling tot de conventionele twee-staps methoden (spatiële detectie gevolgd door temporele associatie) voor het volgen van objecten, heeft de Bayesiaanse aanpak geen afzonderlijke object-detectie procedure nodig. Robuuste en nauwkeurige object-detectors komen echter wel degelijk van pas in het Bayesiaanse kader. In het bijzonder kunnen ze worden gebruikt in beslissingsprocedures voor het starten van nieuwe objectpaden en het beëindigen van de bestaande paden, respectievelijk wanneer een nieuw object verschijnt of een bestaand object uit het blikveld verdwijnt. In Hoofdstuk 2 worden acht methoden voor de detectie van kleine objecten in fluorescentie-microscopiebeelden kwantitatief geëvalueerd. Er wordt aangetoond dat zogenaamde “machine-learning” (ML) methoden (in dit geval AdaBoost en Fisher discriminant-analyse) in het algemeen beter presteren. Deze methoden resulteren in de hoogste correct-positieve detectie ratio (bij een zeer lage fout-positieve detectie ratio) en de kleinste gevoeligheid voor parameterwijzigingen, voor alle beschouwde beelddata. De verschillen in prestatie tussen de ML en sommige van de overige methoden zijn echter niet groot, vooral niet als wordt vergeleken met de zogenaamde h-dome detector (HD), die in het hoofdstuk wordt voorgesteld. Op basis van de resultaten wordt de conclusie getrokken dat wanneer een detector met goede algemene prestaties is vereist, de genoemde ML methoden of de HD detector de voorkeur verdienen. Het nadeel van de eerstgenoemde methoden is echter dat ze afhankelijk zijn van een trainingsfase, waarvoor eerst positieve en negatieve monsters uit de beelddata dienen te worden geëxtraheerd. Dit vereist de handmatige annotatie van duizenden objecten om voldoende onderscheidingsvermogen te verkrijgen, wat niet alleen vervelend en tijdrovend werk is, maar bovendien waarnemer-afhankelijke resultaten oplevert. Met het oog hierop is de HD detector veel gemakkelijker in het gebruik. Wel moet worden opgemerkt dat wanneer de signaal-ruisverhouding voldoende hoog is (>5 als vuistregel), alle bestudeerde methoden vergelijkbaar presteren, en er slechts minimale aanpassing van de parameters nodig is voor gebruik in een specifieke toepassing.

Hoofdstuk 3 beschrijft het ontwerp van een nieuw PF algoritme voor kwantitatieve analyse van de beweging van subcellulaire objecten, in dit geval de groei van microtubuli. Het algoritme gebruikt a priori informatie over het dynamisch gedrag van microtubuli en het beeldvormingsproces. Hierdoor levert het bij lage signaal-ruisverhoudingen (<5) superieure prestaties vergeleken met de eerder genoemde twee-staps methoden. Bovendien houdt het algoritme op een natuurlijke manier rekening met blekingseffecten, welke vaak voorkomen in fluorescentie microscopie. Experimenten met synthetische data bevestigen dat het voorgestelde algoritme betrouwbare resultaten levert, zelfs wanneer de signaal-ruisverhouding in de data kleiner is dan 2, dit in tegenstelling tot twee andere populaire methoden waarmee wordt vergeleken. Ook wordt aangetoond dat het algoritme potentieel nauwkeuriger is dan handmatige data-analyse door ervaren menselijke waarnemers. Toegepast op echte

fluorescentie-microscopiebeeldseries van microtubuli, levert het algoritme prestaties die vergelijkbaar zijn met die van menselijke waarnemers. Dit is te verklaren doordat de laatstgenoemde experimenten beperkt waren tot het vergelijken van verdelingen en gemiddelden van bewegingsparameters, waarbij kleine lokale verschillen onopgemerkt kunnen blijven, vooral wanneer de snelheden van de objecten variëren. Instantane snelheden zijn ook per object geanalyseerd, maar konden niet kwantitatief worden gevalideerd vanwege het gebrek aan objectieve referentiedata.

Over het algemeen wordt er bij de ontwikkeling van Bayesiaanse algoritmen voor het volgen van objecten uitgegaan van slechts één type dynamisch gedrag. Hierdoor kunnen deze algoritmen falen wanneer ze worden gebruikt voor biologische toepassingen waarin complexere bewegingspatronen moeten worden geanalyseerd. Daarom wordt in Hoofdstuk 4 het in Hoofdstuk 3 ontwikkelde algoritme uitgebreid zodat het verschillende typen subcellulaire objecten met verschillende soorten bewegingspatronen kan volgen. De nauwkeurigheid van het algoritme is verbeterd door marginalisatie van de kansdichtheden en één van de toestandsvariabelen, waarvoor de optimale, analytische oplossing (het Kalman filter) wordt gebruikt. Verder is de robuustheid verbeterd door gebruik te maken van een zogenaamd jump-Markov-systeem, wat het gebruik van meerdere dynamiekmodellen voor de voorspelling van objectbeweging toelaat. Het voorgestelde algoritme is op zowel synthetische data als op echte fluorescentie-microscopiebeeldseries getest. De laatstgenoemde data komen voort uit studies naar het dynamisch gedrag van drie verschillende typen intracellulaire objecten: microtubuli, vesicles, en androgeenreceptoren. De resultaten van de experimenten met synthetische data tonen duidelijk aan dat het voorgestelde algoritme superieur presteert ten opzichte van handmatig verkregen resultaten en eerdere Bayesiaanse benaderingen, waarvan reeds werd aangetoond dat deze beter presteren dan alternatieve niet-Bayesiaanse algoritmen. De experimenten met echte data bevestigen de geldigheid van de resultaten geproduceerd door het voorgestelde algoritme. Gebaseerd op deze resultaten wordt nu in de praktijk onderzocht of de algoritmen kunnen helpen bij het oplossen van specifieke biologische vraagstukken.

Tenslotte wordt in Hoofdstuk 5 de toepasbaarheid van PF methoden op een andere biologische applicatie gedemonstreerd: de analyse van het dynamische gedrag van microtubuli *in vitro*, afgebeeld door middel van differentiële interferentiecontrast microscopie. Er wordt een nieuw algoritme voorgesteld dat “variable-rate” PF (VRPF) combineert met multischaal-trendanalyse voor het analyseren van de beweging van groeiende of krimpende uiteinden van microtubuli in 2D spatiotemporele beelden (kymografen). Het voorgestelde VRPF combineert beeldinformatie met bestaande kennis van de onderliggende dynamiek van microtubuli en is in staat het uiteinde van het microtubulus te volgen zelfs in situaties waarin snelle bewegingsveranderingen optreden. Zoals aangetoond door experimenten op synthetische data is de methode in staat de belangrijke kinematische parameters nauwkeurig te schatten. In deze experimenten is de fout in het localiseren van het uiteinde van microtubuli in kymografen gemeten, en is de invloed van deze fout op de schatting van belangrijke kinematische parameters (zoals groei- en krimpsnelheden en de frequenties van schakelen tussen groei en krimp en vice versa) bestudeerd. Vanuit de theorie is bekend dat zelfs relatief kleine fouten in de localisatie van de uiteinden van de microtubuli kunnen leiden tot grote fouten in de parameterschattingen, door het niet-lineaire verband tussen de geschatte

hellingen en de berekende snelheden. De experimentele resultaten laten inderdaad een verhoogde onzekerheid zien in de snelheidsschatting bij hogere snelheden. Toegepast op echte data produceert de voorgestelde methode parameterschattingen die overeenkomen met schattingen die handmatig zijn verkregen door ervaren biologen.