

Betere imaging-mogelijkheden voor celbiologen dankzij FLIM-chip

Onderzoekers kunnen met een Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)-systeem live volgen welke interacties er plaatsvinden tussen eiwitten in een levende cel. Dat is bijzonder nuttig, zegt hoogleraar technische natuurkunde prof. dr. ir. Ian T. Young van de TU Delft. Maar de huidige systemen hebben wel nadelen. Hij wil die verhelpen door de complexe camera-met-beeldversterker in FLIM-systemen te vervangen door een chip.



FLIM Microscoop

FLIM is een microscopietechniek die celbiologen veel gebruiken. Net als fluorescentiemicroscopie maakt FLIM gebruik van het feit dat sommige moleculen fluorescent zijn: als ze licht absorberen, zenden ze een deel daarvan weer uit op een langere golflengte. Een conventionele fluorescentiemicroscoop meet de intensiteit van deze straling. Een onderzoeker kan een fluorescent antilichaam, dat aan een specifiek eiwit bindt, toevoegen aan een biologisch monster. Dankzij de fluorescentiemicroscoop kan hij vervolgens de concentratie en de distributie van dat eiwit bepalen.

FLIM gaat een stap verder. De microscoop verlicht het monster en fluorescente moleculen in de cel absorberen dit licht. Een molecuul dat een foton heeft opgevangen, straalt dit na enkele nanoseconden weer uit als licht met een langere golflengte. Het monster onder de microscoop produceert zo een soort 'licht-echo': de fluorescentie volgt de lichtbron met een kleine vertraging. FLIM meet deze vertraging en daaruit volgt de *fluorescence lifetime*. Dit is de tijd die fluorescente moleculen gemiddeld nodig hebben om terug te vallen naar hun oorspronkelijke toestand onder uitzending van een foton. FLIM levert dus een plaatje van de intensiteit én voor

iedere pixel de *lifetime* in nanoseconden van de fluorescente moleculen. Door twee typen goed gekozen fluorescente moleculen te koppelen aan twee verschillende eiwitten, kun je met FLIM aantonen of die twee eiwitten een interactie met elkaar aangaan en waar in de cel dit gebeurt. De lifetime zal namelijk veranderen als er interactie is.

In één klap

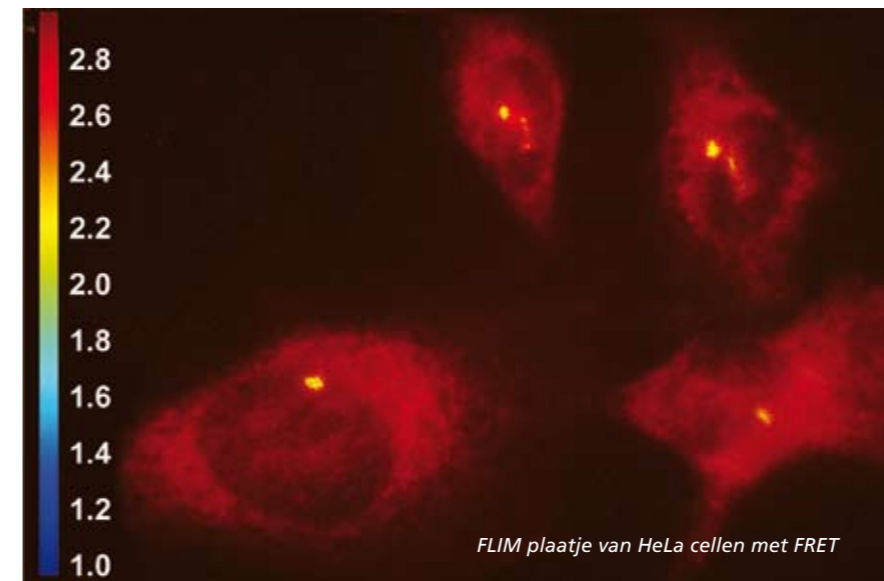
"De huidige FLIM-microscopen werken prima," zegt Young, "maar zijn voor verbetering vatbaar. Een FLIM-microscoop heeft een camera op basis van CCD-technologie met een beeldversterker. Die camera-met-versterker heeft nadelen. Zo heeft het systeem hoogfrequente versterkers nodig en hoogspanningsvoedingen die enkele kilovolts leveren. Ook is de beeldversterker gevoelig voor overbelichting. Bovendien is hij duur: een FLIM-systeem kost ruim € 100.000, microscoop niet meegerekend. Bovendien zorgen de eigenschappen van de beeldversterker en de manier waarop de beeldsensor van de camera aan de beeldversterker is gekoppeld voor ruis." Wie iets aan één van deze nadelen doet, verbetert de FLIM-microscoop, zegt Young. "Maar het is beter om alle nadelen in één klap te verhelpen. Dat zijn wij van plan." Samen met

de projectpartners ontwikkelt Young een FLIM-systeem waarin de camera met beeldversterker plaatsmaakt voor een chip. Young: "Die camera-met-versterker is een complex apparaat met verschillende optische en elektronische componenten. Een chip is *solid state*, kleiner en lichter, werkt bij lage spanning en is de helft goedkoper." Dit maakt de technologie later ook geschikt voor andere toepassingen, zoals endoscopie. Young: "Bij de huidige FLIM-camera's is dat volkomen ondenkbaar."

Maar de beeldsensor voor een FLIM-microscoop moet wel aan een aantal voorwaarden voldoen. Zo moet hij in staat zijn om met een frequentie van 40 MHz en hoger uiterst nauwkeurig te meten. Young: "Er mag niet te veel ruis zijn. Warmte zorgt voor thermische ruis, dus de chip moet een goede energiebalans hebben. Er mag ook niet veel elektronische ruis zijn, want dat leidt tot storingen in het beeld." Projectpartner Dalsa test chipontwerpen in een virtuele omgeving om te bepalen welke variabelen belangrijk zijn om ruis te minimaliseren.

Reuzenpixels

Youngs groep houdt zich voornamelijk bezig met de software en de hardware om de chip heen. Young: "De hardware bestaat bijvoorbeeld uit



FLIM plaatje van HeLa cellen met FRET

het *printed circuit board* (PCB) waarop de chip wordt geïntegreerd, de voedingen en bekabeling. Deze hardware-lay-out is ook belangrijk voor het voorkomen van ruis en storing."

Bij het ontwikkelen van software die de signalen van de camera analyseert, gaan de onderzoekers uit van de algoritmen voor de huidige FLIM-systemen die door Lambert Instruments ontwikkeld zijn en geproduceerd worden. Die passen ze

vervolgens aan om tot een optimaal systeem te komen. De grootste uitdaging hierbij is het feit dat één pixel veel groter is dan één molecuul, zegt Young: "Een signaal dat een pixel binnenkomt, kan in feite een combinatie zijn van verschillende signalen. De software moet die ontvlechten."

Het doel van het project is bewijzen dat *solid state* FLIM-technologie werkt. Young: "We

In het project werken samen Participants

- Delft University of Technology
- Dalsa
- Lambert Instruments
- The Netherlands Cancer Institute

Projectnummer: IPD083412
Contact: Prof. dr. ir. I.T. Young
Telephone: +31 (0)15 278 53 90
Email: i.t.young@tudelft.nl

maken een prototype-microscoop voor onze eigen labtoepassing, maar die is ongeschikt voor massaproductie. We gaan straks een nieuwe chip en een conventionele camera op één microscoop bouwen om ze te kunnen vergelijken. Bewijzen dat onze FLIM-technologie beter is, werkt overtuigender dan het beweren."

FLIM-chip improves live cell imaging

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) enables real-time examination of protein interactions in a living cell. A FLIM-microscope uses modulated light to excite fluorescent markers in a sample. By measuring the lifetime of the marker, fluorescence decay in response to the excitation light, the microscope enables cell biologists to analyze, for example, protein-protein interactions.

"The current FLIM-microscopes serve their purpose well," says prof. dr. ir. Ian T. Young from Delft Technical University, "but there's room for improvement. A FLIM-microscope uses an Intensified CCD camera, a complex device that requires several kilovolts to operate and costs over € 100.000." Young intends to improve the current FLIM-design with solid-state technology: "The current FLIM-camera has a lot of optical and electronic parts. A solid-state chip-based camera will be smaller, cheaper, more robust and doesn't require high voltages."

Such a FLIM-chip must be able to perform accurate measurements at 40 MHz and higher. Young: "And the amount of noise and artifacts should be minimal. We, therefore, have to ensure a good energy balance to minimize thermal noise. And there can't be too much electronic noise, either. Project partner Dalsa creates and tests chip designs to optimize several variables."

Young's research group is working on the FLIM camera hardware that uses the chip. The researchers are developing the software in close collaboration with Lambert Instruments, manufacturer of image intensifier-based FLIM systems. Young says: "A molecule is much smaller than a pixel, so one pixel actually receives a combination of several signals. The software has to untangle these signals." Eventually, Young and his group will build and test to demonstrate that the new FLIM-design is superior to the existing solution.