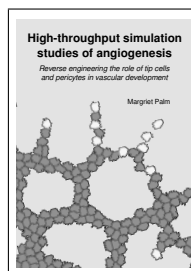


# In de verdediging

| In defence

Pas gepromoveerden brengen hun werk onder de aandacht.  
Heeft u tips voor deze rubriek of bent u zelf pas gepromoveerd?  
Laat het weten aan onze redacteur.

Redacteur: Geertje Hek  
la Voie-du-Coin 7  
1218 Grand-Saconnex  
Zwitserland  
verdediging@nieuwarchief.nl



## High-throughput simulation studies of angiogenesis – Reverse engineering the role of tip cells and pericytes in vascular development

Margriet Palm

Op 30 september 2014 promoveerde Margriet Palm bij prof.dr. Roeland Merks aan de Universiteit Leiden op het proefschrift *High-throughput simulation studies of angiogenesis – Reverse engineering the role of tip cells and pericytes in vascular development*. Haar promotiewerk heeft Palm bij de *life sciences*-groep van het Centrum Wiskunde & Informatica (CWI) in Amsterdam gedaan. Palms werk is echt toegepast: ze gebruikt een grote variatie aan wiskundige methodes en concepten om nieuwe, biologische, kennis te genereren.

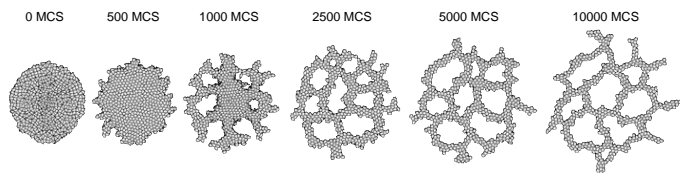
### Van voorgekauwde projecten naar echt onderzoek

Haar interesse in onderzoek begon in het laatste jaar van haar bachelor biomedische technologie in Eindhoven. Studenten werden gekoppeld aan een vakgroep waar ze kleine stukjes ‘echt’ onderzoek mochten uitvoeren, in plaats van de ‘voorgekauwde projecten’ uit de eerste twee studiejaar. Palm werkte in haar derde jaar bijvoorbeeld aan de allereerste versie van *PathVisio*, software voor het analyseren van biologische *pathways*. Het meewerken aan deze projecten motiveerde haar enorm, dus ze vervolgde de opleiding met een master biomedische technologie waarbinnen ze zich richtte op het modelleren van biologische processen en op bioinformatica. Tijdens haar stages en afstudeerproject werd het Palm duidelijk dat ze echt een onderzoeker is: ze vindt het heerlijk om zich te verdiepen in één probleem en dat helemaal uit te zoeken.

Op zoek naar een promotieplek kwam ze terecht bij een enthousiaste onderzoeker op het CWI: Roeland Merks. Zowel de methode, cel-gebaseerd modelleren, als het onderzoeksgebied, ontwikkelingsbiologie, waren compleet nieuw voor Palm, maar beide spraken haar meteen aan. Tijdens het onderzoek is haar passie voor biologie, en met name ontwikkelingsbiologie, enorm gegroeid. Palm: “Het is fantastisch om te zien hoe een verzameling, relatief eenvoudige cellen, een compleet organisme kan vormen, zonder dat er een bouwplan is.”

### Angiogenese en het cel-gebaseerd modelleren ervan

Angiogenese is het proces waarbij nieuwe bloedvaten ontstaan uit bestaande bloedvaten, hetzij door splitsing van een bloedvat, hetzij door vorming van nieuwe zijtakken, zogenaamde spruiten. In het tweede geval, de zogenaamde ‘spruitvormende angiogenese’, vertakken de ontstane spruiten en vormen ze verbindingen met andere spruiten, waardoor een netwerk van bloedvaten ontstaat. Bij dit proces zijn zowel de endotheelcellen uit de binnenste laag van het bloedvat als de daaromheen liggende perivasculaire cellen betrokken. Het collectieve gedrag van deze cellen leidt tot de vorming van spruiten en de daaropvolgende ontwikkeling van netwerken. De bij de angiogenese betrokken individuele cellen verschillen in gedrag en vorm, wat invloed heeft op het collectieve gedrag. Daarnaast kunnen de cellen elkaars gedrag



**Figuur 1** Een voorbeeld van de groei van vasculaire netwerken in een van Palms modelvarianten. MCS staat voor Monte Carlo-stap. Dit is de standaard tijdseenheid die het cellular Potts-model gebruikt. Tijdens 1 MCS worden er net zo veel pogingen tot het kopiëren van een pixel gedaan als er pixels zijn (dus bij een  $100 \times 100$  grid is 1 MCS gelijk aan 10.000 kopieerpogingen).

beïnvloeden via diffunderende en membraangebonden signaalmoleculen.

Om het samenspel tussen cellen tijdens angiogenese te onderzoeken gebruikt Palm cel-gebaseerde computermodellen waarin het gedrag en de vorm van de cellen voorgeschreven worden en simulaties laten zien hoe de cellen zich organiseren tot een weefsel, zoals spruiten of netwerken van bloedvaten.

De modellen zijn gebaseerd op het *cellular Potts model* (CPM), een soort cellulaire automaat. Als cellulaire automaten in de biologie worden geïmplementeerd in een computermodel, stelt één pixel meestal één cel voor. In het CPM bestaat een individuele cel echter uit meerdere pixels, zodat met het CPM ook de vorm van cellen gemodelleerd kan worden. Dit is belangrijk omdat de vorm van de cel bepaalt hoe makkelijk hij zich kan bewegen tussen andere cellen, en hoe hij via het celmembraan kan communiceren met andere cellen. Cellen bewegen door stukjes celmembraan, zogenaamde ‘pseudopodia’ uit te steken. Om deze dynamica te simuleren gebruikt het CPM een Monte Carlo-algoritme dat keer op keer een pixel kopieert naar één van zijn burens, mits dit leidt tot een afname van de energiefunctie. Deze energiefunctie kwantificeert het gedrag van de cel, zoals bijvoorbeeld volumebehoud en cel-celadhesie. Op deze manier bewegen de cellen en vormen ze een patroon. Om de intrinsieke mobiliteit van cellen te simuleren kunnen ook kopieerpogingen die leiden tot een energietoename geaccepteerd worden, met een kans die afhangt van de grootte van de toename. Zie Figuur 1 voor een voorbeeld.

In de meeste modellen implementeert Palm daarnaast ook *chemotaxis*: (cel)beweging die gebaseerd is op een bepaalde chemische stimulans. Cellen verplaatsen zich als gevolg van een concentratiegradiënt in hun omgeving. In dit geval gaat het om positieve chemotaxis, een beweging in de richting van een hogere concentratie. De moleculen waardoor de cellen worden aangetrokken diffunderen. Die diffusie wordt beschreven door partiële differentiaalvergelijkingen (PDV) die worden toegevoegd aan het CPM: de PDV wordt numeriek opgelost op een vast tijdsinterval en naar aanleiding daarvan worden de lokale concentraties waarmee het CPM werkt voor de volgende tijdstap aangepast.

De output van de modellen waarmee Palm werkt is een tweedimensionaal grid met pixelwaarden, dat gemakkelijk is om te zetten in een figuur. Hierdoor zijn de simulatieresultaten eenvoudig visueel te beoordelen. Echter, kwantitatieve analyse is veel complexer. Hiervoor heeft ze dankbaar gebruik gemaakt van bekende wiskundige beeldanalysemethodes. In sommige gevallen moest ze nog verder zoeken naar methodes die konden helpen om vragen te beantwoorden. Zo heeft ze grafentheorie en mathematische morfologiemethodes gecombineerd om cellen op bepaalde posities te detecteren.

### High-throughput-simulaties leiden tot het belangrijkste resultaat

Door verschillend gedrag voor te schrijven voor een subset van de cel-

len kunnen deze modellen gebruikt worden om het samenspel tussen verschillende celtypes te bestuderen. Een model bevat echter veel parameters, waarvoor de correcte waarden niet altijd bekend zijn. Daarom is het noodzakelijk om simulaties uit te voeren met uiteenlopende parameterwaarden, wat veel rekenkracht en -tijd vergt. Voor dit soort herhaalde simulaties, zogenaamde *parametersweeps* kan een *high-throughput*-simulatieprotocol opgesteld worden dat het opzetten van simulatiescripts, het uitvoeren van de simulaties op een computercluster, en het analyseren van de resultaten automatiseert. Gebruikmakend van zo'n protocol kon Palm uiteenlopende hypothesen met betrekking tot de rol van celgedrag in angiogenese testen en zo nieuwe hypothesen ontwikkelen die daarna in een laboratorium getest konden worden.

Palms belangrijkste resultaat “In silico leidt de verminderde respons van tipcellen op een door endotheelcellen afgegeven chemoattractant, mogelijk Apeline, tot migratie van tipcellen naar de sprout tip” is een mooi voorbeeld van de interactie tussen model en experimenten. Tip- en stalkcellen zijn twee subtypes van endotheelcellen: tipcellen leiden de spruiten en de stalkcellen volgen de tipcellen en delen zich vervolgens waardoor de spruit langer wordt. Om nieuwe inzichten te verkrijgen over de bijdrage van tipcellen aan de vorming van bloedvaten heeft Palm een bestaand angiogenese-model uitgebreid met tip- en stalkceldifferentiatie, zonder daarbij gebruik te maken van a priori aannames met betrekking tot het gedrag van beide celtypes. Door systematisch het gedrag van tipcellen te variëren heeft ze gezocht naar eigenschappen waarvoor het gedrag van de gemodelleerde tipcellen overeenkomt met dat van echte tipcellen. In Figuur 2 wordt de opzet van Palms high-throughput simulatie geïllustreerd voor dit model met tipcellen en stalkcellen. Zoals gezegd is bekend dat tipcellen zich vooraan een groeiende spruit bevinden en stalkcellen daarachter zitten. Ook is bekend dat de hoeveelheid tipcellen invloed heeft op de morfologie van het netwerk. Echter, precieze beschrijvingen van het verschil in het gedrag tussen tipcellen en stalkcellen ontbreken. Met behulp van simulaties zoekt Palm naar ceileigenschappen waarin tipcellen verschillen van stalkcellen. In de simulaties worden voor iedere onbekende modelparameter  $p$  de waarde van  $p$  voor tipcellen en het percentage tipcellen (de *tip cell fraction*) gevarieerd, zie Figuur 2A. Vervolgens wordt per rij bekeken of een verschil in tipcellfractie resulteert in verschillende morfologieën (Figuur 2B). Dit gebeurt zowel op het oog als door het berekenen van een aantal netwerkeigenschappen, zoals het aantal lacunea (mazen in het netwerk) en het aantal knopen. Tot slot wordt voor iedere gebruikte combinatie van parameterwaarde en tipcellfractie automatisch bekeken of de tipcellen aan de uiteinden van de spruiten zitten (Figuur 2C). De modelberekeningen suggereerden dat er een chemoattractant is die door beide typen endotheelcellen wordt afgegeven, maar waarop tipcellen minder reageren dan stalkcellen. Eerder gepubliceerde experimentele data leidden tot Apeline als kandidaat-chemoattractant, en experimentatoren bevestigden vervolgens dat Apeline inderdaad noodzakelijk is voor het vormen van spruiten.

### Een heldere kijk op simulatiesoftware

Een minder technische, maar toch wel inhoudelijke stelling bij Palms proefschrift gaat over software: “Simulatiesoftware zou ontworpen moeten worden als Lego, waarbij de onderzoeker een model bouwt door de juiste blokken te combineren.” Hiermee wil ze zeggen dat simulatiesoftware zó gemaakt moet worden dat een conceptueel model gemakkelijk omgezet kan worden in een computermodel. Dit is noodzakelijk om het voor biologen mogelijk te maken om zelf simulaties uit te voeren.

Daarnaast is dit volgens Palm de enige manier om computationeel biologen, die de kennis hebben om zelf software te schrijven, over te halen om bestaande code te gebruiken. Want waarom zou je met andermans code gaan zitten stoeien als je het net zo snel zelf opnieuw maakt? Echter, het is zonde van de tijd en energie om elke keer het wiel opnieuw uit te vinden. Bovendien zou computationeel onderzoek veel gemakkelijker te reproduceren zijn als de gemeenschap één standaard, goed softwarepakket zou gebruiken.

Een van de leukste aspecten aan haar aio-schap sluit hierbij aan. Ze vond het erg leuk en leerzaam om haar kennis en vaardigheden te kunnen overdragen in twee workshops over de door haarzelf gebruikte simulatiesoftware. Daarnaast heeft ze een protocol en software gepubliceerd voor het opzetten, uitvoeren en analyseren van grote simulatie-experimenten met diezelfde simulatiesoftware en haar code wordt nu ook gebruikt door voormalig collega's.

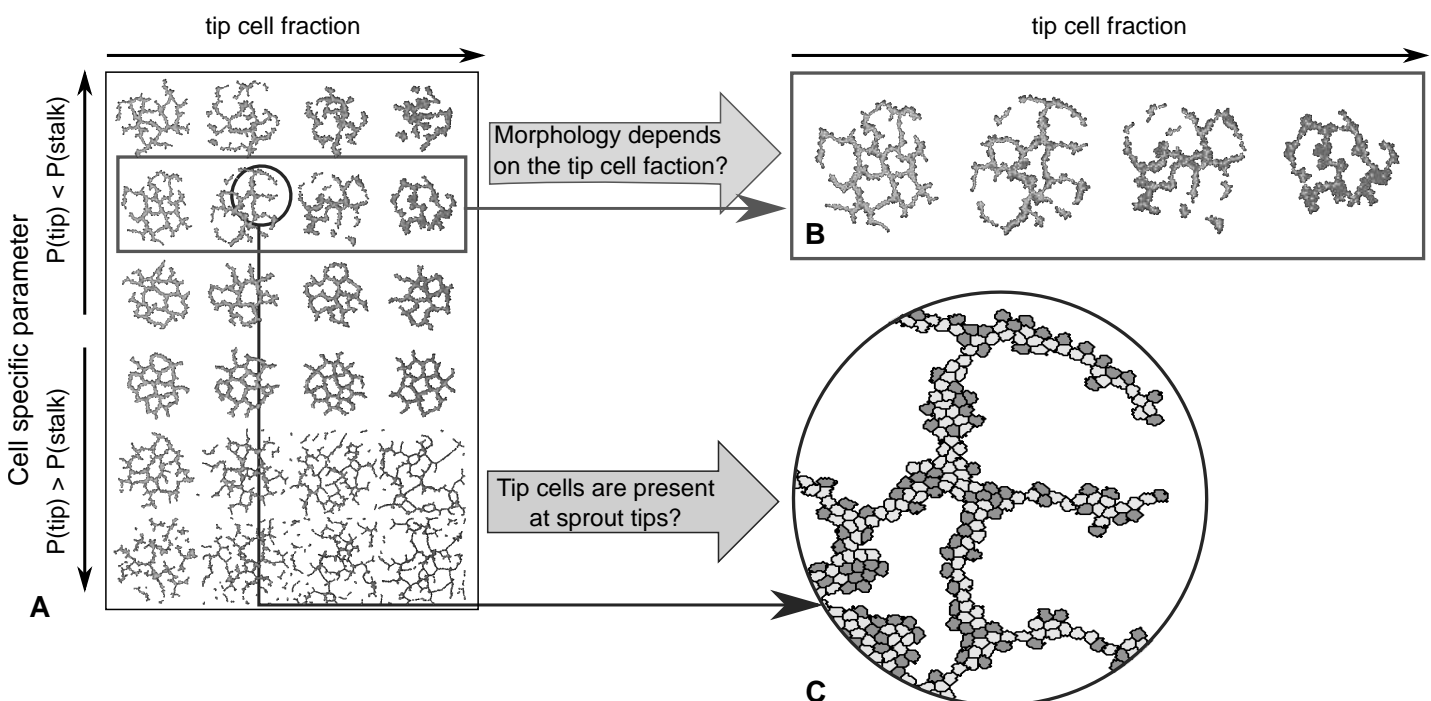
### Niet zo goed in het voorspellen van haar toekomst

Met het overdragen van kennis op papier heeft ze meer moeite. Zelf zegt Palm beter te zijn in het oplossen van problemen dan in het bedenken en beschrijven van problemen. Hierdoor heeft ze moeite met het schrijven van introducties en discussies. Haar teksten voldeden ook niet altijd aan de verwachtingen van haar promotor. Zijn kritiek was achteraf gezien echter zeer leerzaam. Door de moeite met het schrijven, twijfelde Palm de laatste maanden weleens aan eigen kunnen, maar gelukkig is het uiteindelijk allemaal goedgekomen. Niet alleen is

ze gepromoveerd, maar ook werkt ze inmiddels als postdoc bij INRIA in Parijs. Daar werkt ze met ook weer aan cel-gebaseerde modellen, maar gebruikt ze een andere techniek. Ze hoopt haar kennis te verbreden opdat ze vervolgens diverse methodes toe kan passen om biologische groei te onderzoeken. Het liefst in Nederland en ook het liefst in de academische wereld, maar een leuke baan in het bedrijfsleven zou ook mooi zijn.

Palm waarschuwt echter dat het in haar ogen onmogelijk is om te zeggen wat je in de toekomst gaat doen. Een jaar of zes geleden riep ze dat ze *nooit* in Amsterdam wilde wonen, en nu denkt ze vanuit Parijs met heimwee terug aan Amsterdam waar ze ondanks haar aanvankelijke tegenzin vier jaar lang met veel plezier heeft gewoond en genoten van het culturele aanbod. Wat ze ook erg leuk vond was het contact met collega's en mede-onderzoekers die van over de hele wereld kwamen. "Het is erg leuk te zien hoe mensen die ergens anders vandaan komen naar jou, jouw land en jouw taal kijken. Dit contact is misschien wel een van de dingen die ik erg zou missen als ik ooit de wetenschap zou verlaten."

Nog geen twee jaar geleden wist Palm dat ze best postdoc wilde worden in het buitenland, maar niet in een land waar ze geen Engels spreken en zeker niet in Frankrijk. En nu is ze daar zelf die collega met een frisse blik op de Franse taal en gewoonten. Ze geeft dus toe niet zo goed te zijn in het voorspellen van haar eigen toekomst. Ze sluit af: "Voor mij is het belangrijkste dat ik werk doe waar ik gelukkig bij ben op een plek waar ik me thuis voel." ←



Figuur 2