

Cellen en moleculen microscopisch in beeld

Rede uitgesproken door

Prof. Dr A.K. Raap

bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar
in de Moleculaire Cytologie aan de Universiteit Leiden
op vrijdag 10 maart 2000

“..... Cell biologists, without losing sight of the cell as a morphological and functional unit within an organism, must be prepared to study biological phenomena at all levels and to use all the methods, techniques and concepts of the other sciences. This is a great challenge, but there is no other way to proceed if the life of the cell and of the organism is to be interpreted mechanistically on the basis of combinations and associations of atoms and molecules.”

*DeRobertis and DeRobertis,
Cell and Molecular Biology, 7th Edition, Holt-Saunders International Editions, 1980, page 11*

*Mijnheer de Rector Magnificus,
Zeer gewaardeerde toehoorders,*

Beeldvorming

Beeldvorming is in de letterlijke en overdrachtelijke zin een essentieel onderdeel van het celbiologisch en genetisch onderzoek. Door beeldvorming immers kunnen de onderzoeksobjecten beschreven en benoemd worden en wordt een proces van gegevensverzameling, patroonherkenning, hypothesevorming en experimentele toetsing geïnitieerd. De interactie tussen het oog en de hersenen drijft dit wetenschappelijk proces aan en het herhaalt zich, totdat de wetmatigheden die aan het gedrag van de onderzoeksobjecten ten grondslag liggen duidelijk zijn. Bij het opstellen van de wetten van de erfelijkheid door Mendel ging het zo en in de celbiologie loopt het niet anders. Het is immers door beeldvorming met de microscoop dat de cel als eenheid van leven ontdekt is en dat we kennis hebben kunnen vergaren over zijn vele verschijningsvormen en gedragspatronen in gezonde en zieke weefsels.

Naast het morfologisch is er tevens een moleculair beeld van de cel en de zich daarin afspelende processen ontstaan. Uit de fraaie illustraties in de moderne celbiologische leerboeken is op te maken dat het op papier heel goed mogelijk is die verschillende beelden van cellen samen te voegen. Zoals ik zal toelichten is het zowel wenselijk als mogelijk deze samenvloeiing niet alleen op papier te bewerkstelligen, maar ook in de beeldvormende stap van cel- en chromosoomonderzoek.

Het is deze integratie van moleculair en morfologisch onderzoek die in mijn werk een belangrijke plaats inneemt. De titel die ik aan mijn rede heb gegeven luidt dan ook: "Cellen en moleculen microscopisch in beeld". Ik hoop U in de komende drie kwartier een beeld te geven hoe dat in zijn werk gaat en hoe het zijn toepassing vindt in klinisch en fundamenteel onderzoek.

Historisch perspectief

Eerst kort wat historie. De theorie dat de cel de structurele en functionele eenheid van levende organismes is werd door Schleiden en Schwann in de jaren dertig van de 19^{de} eeuw geformuleerd.

Zij konden de beelden die hen tot de celtheorie leidden op hun netvlies zien krijgen, omdat kort daarvoor ontwikkelingen in de optica, de lichtmicroscopie verrijkt hadden met objectieven van hoog oplossend vermogen en geringe afbeeldingsfouten. Geïnspireerd door de celtheorie werd niet lang daarna door Virchow onderkend dat cellulaire processen ook ten grondslag liggen aan ziekteverschijnselen. De cellulaire pathologie was daarmee geboren.

Het zijn cycli van verbetering van microscopie en weefselbewerking, en het empirisch toepassen van textielkleurstoffen geweest, die het mogelijk gemaakt hebben dat de geleerden van de cel, de cytologen, in de laat 19^{de}/vroeg 20^{ste} eeuw steeds beter de vormen en gedragingen van cellen en celonderdelen konden waarnemen en interpreteren.

Zo heeft men bijvoorbeeld uit de gedragspatronen van de chromosomen tijdens de celdeling kunnen afleiden dat ze de dragers van de erfelijke eigenschappen moesten zijn en stelde Boveri vast dat aan de ontwikkeling van tumoren chromosomale veranderingen ten grondslag lagen.

Met de introductie van de transmissie-elektronenmicroscopie en de ontwikkeling van elektronenmicroscopische contrastkleuringen rond het midden van de vorige eeuw kreeg het celmorfologisch onderzoek een nieuwe en buitengewoon krachtige impuls. Door het hoogoplossend vermogen van dit type microscopie werd een veel gedetailleerder, het zogenaamde ultrastructurele beeld van de cel verkregen.

Maar, hoe waardevol de cytologische kleuringen en de elektronenmicroscopische contrastmethoden ook mogen zijn geweest voor het morfologisch cel- en weefselonderzoek, ze hebben weinig tot niets bijgedragen aan de moleculaire analyse van cellen en de processen die zich er in afspelen. Dat is vooral het domein van de biochemie en moleculaire biologie.

Lange tijd hebben de biochemie en de moleculaire biologie zich onafhankelijk van de morfologisch-microscopische discipline ontwikkeld. Toch was er immer de behoefte om in celmorfologische context de biomoleculen in beeld te brengen. Ook bij de hardcore biochemicus en moleculair bioloog, want hoewel voor hen alle levensprocessen uiteindelijk een serie complexe chemische reacties zijn, realiseren zij zich maar al te goed dat ze zich afspelen in zo'n microscopisch kleine cel.

De behoefte tot integratie sproot daarmee dus zeker voort uit de wil tot verhoging van de fundamentele celbiologische kennis, maar even belangrijk was de wens tot integratie van de moleculaire en cellulaire pathologie om aldus betere inzichten in ziekteprocessen te krijgen en daarmee tot betere diagnostische methoden en rationele therapieontwikkeling te komen.

Cytochemie en Cytometrie

Het vakgebied dat er naar streeft de vanuit de biochemie en moleculaire biologie voortgekomen kennis te integreren met die van de lichtmicroscopische en ultrastructurele cytologie wordt cytochemie genoemd. Zij stelt zich tot doel specifieke biomoleculen in morfologisch intacte cellen en celonderdelen zichtbaar te maken.

Dit beperkt zich niet tot een kwalitatief chemische analyse, maar behelst tevens kwantitatieve aspecten, die voor zover ze het bio-fysisch meetinstrumentarium en de analyse van de meetgegevens betreffen, het vakgebied van de cytometrie afbakenen. Men zou ook kunnen spreken over analytische topbiochemie of, zoals U in de uitnodiging voor deze rede heeft kunnen lezen, over moleculaire cytologie.

In tegenstelling tot cytologische kleuringen die tot stand komen op grond van vrij specifieke fysisch-chemische interacties tussen kleurstoffen en celcomponenten, wordt er bij cytochemische procedures gebruik gemaakt van goed gedefinieerde binding tussen de kleurstof en het aan te tonen biomolecuul.

De binding van de kleurstof is meestal indirect en gestoeld op reactieprincipes uit de chemie, biochemie, moleculaire biologie of de immunologie.

Niettemin onderscheiden cytochemische analyses zich wezenlijk van biochemische, omdat de specifieke aantoning dient plaats te vinden in de aanwezigheid van al het cellulaire materiaal en niet na een zuiveringsstap zoals bij de biochemie gebruikelijk is. De cel moet als het ware zijn eigen reageerbuis en meetcuvev zijn.

Een klassiek voorbeeld

Een klassiek, maar buitengewoon belangrijk voorbeeld is te vinden in de immunocytochemische kleuring van eiwitten. Deze door Coons al in de jaren veertig van de vorige eeuw ontwikkelde techniek maakt gebruik van de specifieke binding tussen antilichaam en eiwit. De microscopische visualisatie wordt verkregen door de antistof langs chemische weg te koppelen aan een fluorescerende kleurstof of elektronenmicroscopische merker.

De specificiteit van antistofbinding kan buitengewoon hoog zijn. De substitutie van slechts één aminozuur in een eiwit is al voldoende zijn om binding te voorkomen of juist te bewerkstelligen. Men kan aldus op eiwitniveau een kleine genmutatie in één enkele cel te midden van vele ongemuteerde makkelijk aantonen. Ook het patroon van aan- en uitschakelen van genen tijdens normale of afwijkende differentiatie van cellen kan op eiwitexpressieniveau in beeld gebracht worden. Immunocytochemie speelt dan ook al jaren een belangrijke rol in het basale en diagnostische onderzoek.

FISH

Ook tegen nucleïnezuren als DNA en RNA zijn antistoffen op te wekken maar in tegenstelling tot antistoffen tegen eiwitten die specifiek binden aan unieke volgordes van de aminozuurketen, herkennen deze antistoffen slechts de globale nucleïnezuurstructuren en niet de genetische lettervolgorde. Het is daarmee onmogelijk een antistof op te wekken die specifiek is voor een bepaald gen. Gen- of gentranscriptdetectie zuiver op basis van antistoffen is dus niet mogelijk.

De principes van de moleculaire biologie hebben hier uitkomst gebracht. Het is Piet van Duijn geweest die vanaf de beginjaren zeventig van de 20^{ste} eeuw, dus al voor de moleculair biologische revolutie, op dit gebied visionair onderzoek heeft verricht, dat in 1980 culmineerde in wat nu fluorescentie *in situ* hybridisatie, kortweg FISH, heet (Bauman et al., 1980).

Als ik nu beeldvormende hulpmiddelen tot mijn beschikking had gehad, dan had ik U aan de hand van een eenvoudig schema kunnen laten zien hoe FISH werkt.

Ook had ik U dan in de loop van mijn verhaal een aantal van de resulterende microscopische beelden kunnen tonen. "A picture paints a thousand words" zeggen de Amerikanen dan.

Maar, waarde toehoorders, U zult het met de nog exact 4156 resterende woorden van mijn oratietekst en misschien Uw verbeeldingskracht moeten doen.

In de reageerbuis worden gekloneerde DNA moleculen, die een bepaald gen of gen-fragment representeren, langs chemische weg voorzien van een fluorescerende kleurstof en vervolgens in contact gebracht met een chromosoom- of celpreparaat. Op grond van een 'soort-zoekt-soort' mechanisme, dat we nucleïnezuurhybridisatie noemen, weten de fluorescerende DNA moleculen het DNA van het gen of het RNA van zijn transcripten in de cellen te vinden en binden er vervolgens stevig aan. Het resultaat is dat onder de fluorescentiemicroscoop, het gen en zijn transcripten licht gaan uitzenden en zij geven daarmee hun lokalisaties in de cel aan de onderzoeker prijs.

In combinatie met immunocytochemische technieken is het hiermee mogelijk geworden om op individueel celniveau het hele traject van DNA naar RNA naar eiwit te bestuderen. Het is alsof je met een heel fijne penseel een moleculair-biologisch plaatje van een cel schildert. Zulke plaatjes vinden dan ook makkelijk hun weg naar de leerboeken en voorpagina's van wetenschappelijke tijdschriften.

U voelt natuurlijk al aan dat het kijken naar lichtgevende DNA en RNA moleculen in genetisch, celbiologisch en pathologisch onderzoek belangrijke toepassing kan vinden. Maar voor ik op de toepassing en verdere ontwikkelingen van FISH in ga, wil ik eerst in maat en getal de gevoeligheid, die bereikt kan worden illustreren en het belang van fluorescentiemicroscopie daarin toelichten.

Gevoeligheid

Het DNA, het genoom van een menselijke cel is verpakt in 23 chromosoomparen. De lengte van dat DNA is circa 2 meter en het ligt strak opgerold in een kern met een doorsnede van een honderdste millimeter. Het weegt slechts 6 picogram, dat is zes miljoenste van een miljoenste gram. Deze geringe gewichtshoeveelheid is niettemin goed voor twee genetische boeken met elk 3 miljard letters uit het 4-letterige genetische alfabet en naar laatste schatting zo'n 100 tot 140 000 verschillende genen.

Nu is het met FISH mogelijk om één uniek segment van 3000 DNA letters temidden van de 3 miljard andere uit zo'n boek te laten fluoresceren. Dit komt in gewichtshoeveelheid overeen met 1 miljardste van een miljardste gram, voorwaar een uiterst geringe hoeveelheid.

Deze fascinerend hoge gevoeligheid is voor een groot deel toe te schrijven aan het gebruikte type microscopie: de epifluorescentie microscopie, waaraan Bas Ploem zulke essentiële bijdragen heeft geleverd (Ploem, 1967).

Toepassing

Goed, dat mag dan fascinerend zijn die hoge gevoeligheid, maar wat is nu het directe of indirecte belang voor een patiënt van het Leids Universitair Medisch Centrum zult U zich ondertussen afvragen. Het antwoord is eenvoudig te geven.

Bij vele ziekten, waaronder kanker zijn er veranderingen in aantal of structuren van genen of chromosomen opgetreden die we met FISH kunnen opsporen.

Die ziekte veroorzakende DNA veranderingen ontstaan bijvoorbeeld omdat bij het DNA kopieerproces dat voorafgaat aan de celdeling foutjes optreden. Het kan zijn dat tijdens het kopiëren een stukje DNA per abuis overgeslagen wordt, maar ook is het mogelijk dat een stukje DNA twee of meerdere malen gekopieerd wordt. Tevens kan het bij de eigenlijke celdeling mis gaan, omdat de verdeling van de zojuist gekopieerde chromosomen over de dochtercellen niet perfect verloopt. Het resultaat is dat een gen of chromosoom niet in een dochtercel terecht komt, of dat er juist te veel exemplaren in de nakomelingen verschijnen.

Ook kunnen genen breken. De cel zal pogen die schade aan zijn erfelijk materiaal te herstellen, maar soms gebeurt dat op de foute manier, waardoor de gebroken genen op de verkeerde plaats terecht komen en ontregeld raken; iets wat bij bloedkanker nogal eens voorkomt.

Met FISH kunnen die veranderingen op verassend eenvoudige wijze vastgesteld worden. In het microscopische FISH-beeld is het namelijk erg makkelijk genen en chromosomen tellen, of veranderde gen- of chromosoomstructuren zien.

Het diagnostisch belang van de techniek is daarmee nu al groot, maar zal met de voltooiing van het Humane Genoom Project en het steeds beter begrip dat we zullen krijgen van de genetische achtergrond van ziekteprocessen alleen nog maar groter worden.

Chromosomale genkartering

Ik noemde zojuist het Humane Genoom Project. Dit en soortgelijke projecten laten op vrijwel elk terrein van de biomedische wetenschap hun toenemende impact voelen onder meer door de geavanceerde technologieën, rijke bronnen aan DNA-klonen en de enorme gegevensstromen die ze opleveren.

FISH neemt in dit alles een niet onbelangrijke plaats in. En met goed recht kan gesteld worden dat het Leidse cytochemische onderzoek funderende bijdragen aan het Humane Genoom Project heeft geleverd, zelfs voordat het als zodanig geformuleerd werd. Ik noem hier graag het belangrijke pionierswerk dat door Mels van der Ploeg verricht is op het gebied van de chromosomale genkartering (Landegent et al., 1987; Landegent et al., 1985).

In mijn eigen onderzoek heb ik een aanzienlijke verbetering in die DNA-kartering kunnen aanbrengen. Dat was hard nodig, want hoe groot de doorbraak van de chromosomale FISH-kartering ook was, het was vanuit moleculair-genetisch oogpunt bezien nogal grofstoffelijk. We konden weliswaar met gepaste trots vertellen op welk onderdeel van een van een chromosoom een gen lag, maar niet meer dan dat. De kleinst waarneembare onderdelen van een chromosoom, de banden, dragen namelijk altijd nog zo'n 3 tot 6 miljoen genetische letters of baseparen en kunnen wel zo'n 100 verschillende genen bevatten. De precieze volgorde van de genen binnen een band van het chromosoom kunnen we met chromosomale FISH niet in kaart brengen. Het was dus zaak het oplossend vermogen met ordes van grootte te verbeteren en dat

liefst met zo min mogelijk verlies van overzicht. Vergelijk het met het inzoomen van de kaart van Europa naar de stadkaart van Leiden.

Fiber-FISH

Zoals al gezegd de DNA-draad zit in chromosomen strak opgerold. De idee achter de experimentele proefopzet was daarmee eenvoudig: Ontwikkel een chromosoomontrollingstechniek zodat het DNA als kale draden op het objectglaasje komt te liggen en doe dan FISH met de gekloneerde stukjes DNA die op de lineaire DNA kaart geplaatst moeten worden.

Uiteindelijk was de stap van idee tot geslaagd "proof-of-principle" een kleine (Wiegant et al., 1992). Daarmee was, wat nu wereldwijd bekend staat onder de naam DNA Fiber-FISH, geboren en ontvouwen zich voor onze ogen voor het eerst gedetailleerde en foutloze genkaarten van individuele cellen (Florijn et al., 1995).

In samenwerking met de groep van Gert-Jan van Ommen werd het principe verder in de praktijk van DNA kartering gebracht (Florijn et al., 1995; Florijn et al., 1996). Bovendien werd vastgesteld dat de resolutiegrens van Fiber-FISH op 1000 baseparen lag en daaruit bleek dat we de resolutie met meer dan drie ordes van grootte verbeterd hadden. Net zo belangrijk was evenwel dat we exceptioneel grote gebieden van wel een half tot een miljoen baseparen met die resolutie in beeld konden houden.

Uit die proeven bleek verder dat we tegen fundamentele resolutiebeperkingen van het traditionele lichtmicroscopie aangelopen waren.

Metingen aan de Fiber-FISH signalen maakten namelijk duidelijk dat het chromosomale DNA ontrold was tot op het niveau van de Watson-Crick dubbelhelix, hetgeen neerkomt op 1000 baseparen per 0.3 micrometer.

Nu vertelt De Wet van Abbe ons dat het ruimtelijk oplossend vermogen van lichtmicroscopie theoretisch zo rond de 0.2 micrometer ligt. Voor het door ons gebruikte microscopie was het in de praktijk 0.3 micrometer.

Veel verder dan die 1000 baseparen zullen we dus fundamenteel met dit soort DNA ontwindingsstechnieken niet komen. Verder oprekken van het DNA zou alleen maar ongewenste breuken geven.

Het lijkt overigens niet onmogelijk dat ontwikkeling op het gebied van zogenaamde scanning probe microscopy, met name de near-field scanning optical microscopy, die populair gezegd de wet van Abbe aan zijn laars lapt, uitkomst gaat brengen (Moers et al., 1996). En misschien wordt het ooit mogelijk direct op losse DNA-draden sequentie-analyses te doen.

Fiber-FISH heeft ondertussen in het dagelijks genomonderzoek stevig zijn plek gevonden. Dit mag ondermeer blijken uit het feit dat in een fameus Instituut als het Sanger Centrum in Cambridge (Engeland) dat op fabrieksmatige wijze aan sequencing van een aantal menselijke chromosomen doet, Fiber-FISH al enkele jaren een rol speelt in het DNA-kloonkarteringswerk dat voorafgaat aan de sequentie-analyse (Dunham et al., 1999).

Kleurenbarcodes voor ziektegenen

Uiteraard was er de toepassing in het patiëntgebonden onderzoek.

Met Fiber-FISH kan men namelijk niet alleen de DNA klonen netjes en kleurrijk op de lineaire DNA-kaart in beeld brengen, maar er kunnen ook 'kleuren barcodes' van ziektegenen mee gemaakt worden. Verstoringen in de barcode op DNA-draden van patiëntencellen geven dan aan of er structureel iets fout is in het gen.

Bij een aantal patiënten werden deleties in het grote gen dat verantwoordelijk is voor de Spierdystrofie van Duchenne aldus rap in kaart gebracht (Florijn et al., 1995). In samenwerking met de groep van Philip Kluin werd de methode ingezet voor het karakteren van zogenaamde chromosomale translokatiebreekpunten bij lymfomen (Vaandrager et al., 1996).

Het probleem dat zich hier voordeed was dat er wel aanwijzingen waren dat voor een bepaald type lymfoom, de detectie van een translokatie tussen de chromosomen 11 en 14 van grote diagnostische waarde was, maar dat het sluitend bewijs lastig te leveren was. Op chromosoom 11 liggen namelijk de breekpunten bij verschillende patiënten enkele 100 duizenden baseparen uit elkaar kunnen liggen en met de vigerende moleculair biologische technieken was het ondoenlijk om zo'n groot gebied in één klap in beeld te brengen.

Enkele jaren geleden is Philip Kluin hier in zijn oratie (Kluin, 1996) op ingegaan en ik volsta nu met te zeggen dat door de betere beeldvorming, de breekpunten snel en nauwkeurig in kaart gebracht konden worden, dat er als resultaat eenvoudige klinisch-diagnostische FISH tests voor lymfomen operationeel zijn geworden (Vaandrager et al., 2000) en dat het lymfoomonderzoek in een stroomversnelling is geraakt.

Een kleurrijk genoom

Waar het voor lymfomen en leukemieën onomstotelijk vast staat dat specifieke chromosomale veranderingen oorzakelijk betrokken zijn bij de pathogenese is het beeld dat we hebben van chromosomale veranderingen bij vaste tumoren nog troebel.

Door recente ontwikkelingen op het gebied van de meerkleuren-FISH verwacht ik dat hier snel verandering in komt.

Op pionierende wijze is inmiddels meer dan 10 jaar geleden de basis voor meer-kleuren FISH in Leiden gelegd (Hopman et al., 1986; Nederlof et al., 1989; Nederlof et al., 1990).

Het probleem waar we voor stonden bij het tegelijk visualiseren van meerdere chromosomen en genen in één cel was dat het aantal met fluorescentiemicroscopie goed te onderscheiden fluorescerende kleurstoffen, toentertijd slechts 3 was.

En dat terwijl de mens 24 verschillende chromosomen heeft, die we het liefst allemaal op grond van een unieke FISH kleur zouden willen onderscheiden zodat het een stuk makkelijker wordt om chromosomale herschikkingen zoals translokaties te visualiseren. Op DNA labelingsniveau lag het voor de hand combinaties van kleurstoffen toe te

passen. Tevens werd de werkzaamheid van zogenaamd ratio-labeling aangetoond (Nederlof et al., 1992). Al snel bereikten we met die drie kleurstoffen een 'multipliciteit' van 12: de helft van het humane chromosomale complement kon daarmee op basis van kleurcompositie onderscheiden worden (Dauwerse et al., 1992).

Door Hans Tanke werden met digitale microscopie en beeldbewerkingstechnieken de subjectieve kleurwaarnemingen omgevormd tot objectieve metingen en herkenningen in microscopische beelden (Tanke et al., 1999). Ik kan op goede experimentele gronden stellen dat de resulterende nieuwste Leidse meerkleuren FISH techniek, superieur is aan concurrerende. Met een knipoog naar de kunstenaarsgroep hebben we haar COBRA -voor COmbined Binary RATiolabeling- gedoopt.

De techniek wordt momenteel routinematig met 48 kleuren toegepast in de postnatale en kankercytogenetica en is aan het opstomen naar 96 kleuren (Wiegant et al., 2000).

Zij zal, zoals gezegd, in het bijzonder op het gebied van de kankercytogenetica, een belangrijke bijdrage gaan leveren. Met haar kleurenrijkdom weet ze namelijk een aantal van de fundamentele chromosoomanalyse problemen bij vaste tumoren te omzeilen (Suzhai et al., 2000; Koopman et al., 1999; Wiegant et al., 2000).

Bewerking en transport van RNA gevisualiseerd

Eerder in mijn rede kwam ter sprake dat op individueel celniveau het genexpressie-traject van DNA naar RNA naar eiwit bestudeerd kan worden. Ik wil daar nu een deel van uitlichten en wel de lotgevallen die primaire gentranscripten moeten ondergaan om als vertaalbaar RNA de volgende stap van genexpressie in het cytoplasma mogelijk te maken, de zogenaamde splicing.

Hoe dat proces van splicing in zijn werk gaat is tot in fijn moleculair detail in beeld gebracht, maar hoe het zich in ruimte en tijd in de kern van een cel afspeelt was tot voor kort volledig onbekend.

Een van de redenen hiervoor was dat cytologisch er betrekkelijk weinig structuren in de kern waar te nemen zijn. Het leggen van structuur-functierelaties is dan zonder meer lastig. Met elektronenmicroscopisch onderzoek kunnen wel meer structuren gezien worden, waaronder bijvoorbeeld de kernporiën, de plekken waarlangs een groot deel van het transport en de communicatie tussen kern en cytoplasma plaatsvindt. Ook lichtmicroscopisch heeft de kern echter meer en meer 'structuren' prijs moeten geven door het toepassen van immuuncytochemie met antistoffen tegen eiwitfactoren betrokken bij de processen die zich in de kern afspelen. Zo laten immuunfluorescentiestudies bijvoorbeeld zien dat de eiwitcomplexen die de splicing uitvoeren op enkele tientallen plekjes geconcentreerd in de kern voorkomen.

Zo'n microscopische waarneming roept bij de moleculair celbioloog meteen een hele serie fundamentele vragen op. Ik som er een aantal voor U op.

Is een actief transcriberend gen geassocieerd met dergelijke concentraten en een inactief gen niet? Als het gen actief wordt, beweegt het zich dan naar zo'n concentraat, of

gebeurt juist het omgekeerde? Of, circuleert er een pool van functionele splicingsfactoren los door de kern op zoek naar actieve genen en zijn de concentraten misschien tijdelijke opslagplaatsen? En als een gen intronloos is en het RNA dus niet gesplacet behoeft te worden, associeert het zich dan nog steeds met dergelijke concentraten? U merkt, het is makkelijk fundamentele vragen stellen in de celbiologie.

Door Roeland Dirks wordt op het Laboratorium voor Cytochemie en Cytometrie onderzoek verricht ter beantwoording van dit soort vragen.

Hij heeft op overtuigende wijze aangetoond dat een bepaald gen in zijn actieve vorm geassocieerd is met zo'n splicingsfactor concentraat, en dat het in zijn inactieve vorm er juist los van ligt. Op het eerste gezicht lijkt het dan alsof of gen of splicingfactor-concentraat zich verplaatst, maar omdat we naar statische beelden kijken, kan niet uitgesloten worden dat er zich rondom het geactiveerde gen een nieuw concentraat vormt uit de circulerende pool.

Verder onderzoek is dus wenselijk maar vooral wordt duidelijk dat er behoefte is aan methodologie die de dynamiek van dit soort essentiële processen in levende cellen in beeld brengt. Ik kom op die levende celanalyse terug.

Deze kern RNA-lokalisatiestudies hebben ons verder als een van de eersten op de wereld een blik gegund op de route die door RNA genomen wordt van het gen naar het cytoplasma.

In 1985 was door Gunther Blobel de zogenaamde 'gene gating' hypothese opgesteld (Blobel, 1985). Deze hypothese stelt, dat een gen zich door hogere orde oprolpatronen van het DNA op een differentiatie afhankelijke wijze nestelt bij een kernporie en dat de transcripten van dat gen alleen door die specifieke porie de kern verlaten. Bij ontstentenis van de methodologie om ook maar een glimp op te vangen van de RNA-transportroutes, de juiste beeldvorming dus, moest deze ietwat speculatieve hypothese het een aantal jaren zonder experimentele toetsing stellen.

Toen wij de beeldvormende middelen eenmaal ontwikkeld hadden (Dirks et al., 1993; Raap et al., 1991), bleek dat de nieuw aangemaakte RNA moleculen, voor het door ons bestudeerde gen zich in willekeurige richtingen van het gen af verplaatsten (Dirks et al., 1995; Dirks et al., 1997). Op ultrastructureel niveau hebben we vast kunnen stellen dat wanneer het actieve gen zich al bij toeval bij de kernmembraan nestelde, de transcripten toch niet ter plekke in het cytoplasma gesprietst werden (Macville et al., 1995). Sterker zelfs, de specifieke RNAs konden vrijwel in elke kernporie waargenomen worden. Het leek er hiermee dus op dat een gen geen specifieke poortwachter heeft. En die gene gating hypothese, die kon de ijskast in.

Analyse van levende cellen

Het beeld dat we ons van de dynamiek van RNA-splicing en -transport gevormd hebben is indirect ontstaan door naar de moleculen in vele verschillende gefixeerde en dus dode cellen te kijken. Voor het bestuderen van de dynamiek van dit soort pro-

cessen is het wenselijk ze direct in een levende cel te volgen en er een filmpje van te draaien.

Het in levende cellen visualiseren van eiwitcomponenten die bij cellulaire processen betrokken zijn, is tegenwoordig routinematig mogelijk met de zogenaamde green fluorescent protein- of GFP-technologie (Chalfie et al., 1994).

Voor ons Laboratorium ligt er nu de uitdaging om in combinatie met eiwitten, RNA transcripten in levende cellen te visualiseren.

Helaas ligt het niet in de lijn der verwachting dat er zich –naar analogie met GFP-technologie- op korte termijn een green fluorescent RNA technologie zal aandienen. We zullen het dus voorlopig op basis van hybridisatie *in vivo* moeten doen.

De eerste proeven op dit gebied zijn zonder meer gunstig, maar er doemt een gevoeligheidsprobleem op doordat de ongebonden fluorescerende moleculen niet verwijderd kunnen worden waardoor er te veel storende ruissignalen in het microscopisch beeld optreden.

Het zijn weer nieuwe manieren van beeldvorming die hier uitkomst gaan brengen.

U moet hiervoor weten dat fluorescerende kleurstoffen bijzonder gevoelig zijn voor hun naaste omgeving. Als bijvoorbeeld twee fluorescerende moleculen van verschillende kleur heel dicht bij elkaar gebracht worden, kan de een het bij de ander binnengekomen licht in zijn eigen kleur uit gaan zenden.

Gebruikmakend van deze zogenaamde fluorescentie resonantie energy transfer fenomenen kan dan met behulp van een techniek die fluorescence life time-imaging genoemd wordt, de ‘nabijheid’ van die twee moleculen in beeld gebracht worden (Bastiaens and Squire, 1999). Men zou kunnen zeggen dat er een “nabijheids”-beeld gegenereerd wordt. Die nabijheid moet U overigens in nanometers meten.

Door nu in de *in vivo* hybridisatiestrategie twee verschillende fluorescerende moleculen tot op nanometerniveau op het doelwit RNA te laten buurten, kunnen alleen die moleculen onderscheiden worden in het nabijheidsbeeld. De los in de cel rond zwemmende moleculen vallen uit het beeld weg. Voorwaar een elegante manier van ruisonderdrukking.

Ontwikkeling en toepassing

U heeft mij veel horen zeggen over onderzoek en ontwikkeling van methodologie, maar evenzeer over toepassingen in patiëntgebonden en fundamenteel onderzoek en ik zou nog veel meer kunnen verhalen.

Ik prijs mij gelukkig dat ik beide typen onderzoek in multidisciplinair samenwerkingsverband kan doen. Het is namelijk mijn vaste overtuiging dat juist op het grensvlak van toepassing en methodiekontwikkeling, de vernieuwing tot stand komt. Het begrip van iets kan namelijk niet beter zijn dan de gereedschappen waarmee het bestudeerd wordt en alleen door toepassing van de onderzoeksgereedschappen leer je de grenzen kennen en zul je naar fundamenteel nieuwe middelen gaan zoeken om ze te doorbreken.

DNA microarrays en chips

Hoewel het niet uit de Leidse koker komt, kan ik een recente doorbraak in de celbiologie en genetica niet onbesproken laten. Ik zal het kort moeten houden en wil me beperken tot wat wel grootschalige genexpressie-analyse genoemd wordt.

Eerst even wat droge feiten ter inleiding. Ik heb al verteld dat iedere menselijke cel naar schatting 100 tot 140 000 genen telt. Hiervan hebben zo'n zeventienduizend een naam gekregen omdat we denken te weten wat hun producten als taak in de diverse celsoorten hebben. Van meer dan 90 % weten we dat dus nog niet.

Ongeduldig als we zijn, willen we dat onbekende terrein liefst snel leren kennen. Want pas als je alle losse elementen van een systeem kent, heb je de goede basis om kennis te vergaren van het systeem in zijn geheel.

De doorbraak zit hem technisch in miniaturisering van fluorescentie hybridisatie met zogenaamde DNA-microarrays en DNA-chips. Door een soort van omgekeerde FISH toe te passen kunnen in één experiment met een stukje glas van een paar vierkante centimeter, de expressieniveaus van duizenden zelfs tienduizenden genen in een celmonster kwantitatief in beeld gebracht worden (Lipshutz et al., 1999; Brown and Botstein, 1999).

Een aantal Universiteiten en Instituten in den lande is volop bezig deze uit de Verenigde Staten afkomstige technologie te implementeren. Het Leids Universitair Medisch Centrum heeft door een samenwerkingsverband tussen de Afdeling Moleculaire Celbiologie en het Centrum voor Humane en Klinische Genetica een vooraanstaande rol in Nederland te spelen op dit gebied. Het is overigens wel even wennen en geduld oefenen, want voor het doen van de goede proef komt er organisatorisch en budgettair nogal wat kijken.

Hoe dit ook zijn mag, voor de moleculair celonderzoeker zit de revolutie uiteindelijk in de aantallen, want tot voor kort konden van slechts zo'n tiental genen in een redelijk tijdsbestek de expressieniveaus in een celmonster geanalyseerd worden.

Ons vermogen de onderzoeksobjecten te beschrijven en te benoemen is dus gigantisch toegenomen.

Maar de wetenschappelijke procesgang bij dit massale genexpressieonderzoek verschilt natuurlijk niet van de kleinschalige, want na het binnenhalen van de genexpressiegegevens volgt de patroonherkenning, die plat gezegd neerkomt op "zoek de verschillen in de plaatjes". Er kan dan uit de genexpressiepatronen afgeleid worden welke genen, benoemd of onbenoemd, een rol spelen in het bestudeerde proces en daarmee is de basis gelegd voor nieuwe hypothesevorming en experimentele toetsing.

Overigens, dat "zoek de verschillen" en de daarop volgende analyses is beslist niet triiviaal. Het maakt onderdeel uit van een vrij nieuw vakgebied dat Biomoleculaire Informatica genoemd wordt dat met slimme computerprogramma's de hersenen van de biomedisch onderzoeker moet bij gaan staan, want de oog-hersen interactie kan het echt niet meer alleen af.

Het lijkt geen twijfel dat het onder meer deze grootschalige genexpressieanalyses zullen zijn die, met hun sterk exploratieve karakter, grote kansen op nieuwe ontdekkingen bieden. Zij zullen de basis vormen waar vandaan de moleculair celonderzoeker, al of niet met DNA-chips, de diepte in zal duiken om fundamenteel de deelprocessen te ontfaelen en om nieuwe aanknopingspunten voor diagnostiek en therapeutisch ingrijpen te vinden.

Het lijkt voor mij geen twijfel dat individuele celanalyse in zulk diepteonderzoek een essentiële rol zal blijven spelen, omdat DNA chip technologie, hoe waardevol ook, niet de panacee voor het celbiologisch onderzoek is. Zo zullen, bijvoorbeeld, functionele redistributies van genproducten en daaruit voortvloeiende celfysiologische veranderingen, niet met DNA-chips of -arrays door de moleculair celbioloog ontdekt worden. De microscopische beeldvorming van cellen en moleculen zal voor hem, net als voor de cytogeneticus en de patholoog, een belangrijke rol blijven spelen.

Eigen schoonheid

Waarde toehoorders, ik heb mijn verhaal niet kunnen verluchten met lichtbeelden. Niettemin hoop ik dat U zich een voorstelling heeft kunnen maken van de beelden van cellen en moleculen, die de microscoop dagelijks aan ons toevertrouwt en van hetgeen we er mee doen.

Waarschijnlijk heeft U tussen de regels door begrepen dat die beelden niet alleen van wetenschappelijke waarde zijn, maar dat ze ook een eigen schoonheid in zich dragen. Daarnaast hoop ik U vooral duidelijk gemaakt te hebben dat op het kruispunt van fundamenteel en patientgebonden onderzoek, moleculaire cytologie een essentiële rol te spelen heeft.

Ik ben dan ook het College van Bestuur van de Universiteit Leiden en de Raad van Bestuur van het Leids Universitair Medisch Centrum dankbaar dat ze met mijn benoeming uiting aan de erkenning van dit vakgebied hebben gegeven.

Dames en Heren Studenten in de Geneeskunde en de Biomedische Wetenschappen.

Van U wordt verwacht kennis te ontwikkelen op het hele traject van molecuul tot mens, anders gezegd van bench to bedside.

Op Uw heen- en terugreizen zult U vaak op het tussenstation van de cel vertoeven. Het zal mij dan een genoegen zijn met U in discussie te treden.

Dat geldt ook voor Uw buitenlandse collega's die we in de komende jaren in het kader van de Internationalisering van het onderwijs in Leiden zullen verwelkomen.

Bijna aan het eind van mijn rede gekomen, wil ik tenslotte een aantal van de hier aanwezigen persoonlijk toespreken.

Hooggeleerde van Duijn, beste Piet,

Jij bent in hoge mate bepalend geweest voor mijn wetenschappelijk denken en han-

delen. Ik heb vooral door jou de fascinatie voor de individuele celanalyse gekregen. Als pionier op FISH-gebied –ik weet dat je liever hybridocytochemie zou horen- heb je een fundament neergelegd waar ik en velen met mij op voort heb kunnen bouwen. Ik ben je daar, en voor de vele waardevolle persoonlijke gesprekken dankbaar.

Hooggeleerde van der Ploeg, beste Mels,

Mijn jaren als post-doc bij jou zijn bijzonder vruchtbaar geweest. Met je wetenschappelijke diplomatie heb je vele deuren voor me geopend. Daarnaast heb ik van je geleerd toepassingen te ontwikkelen zonder het basale werk te veronachtzamen. Voor je vriendschap ben ik je dankbaar.

Mijn fascinatie voor microscopie en innoverende beeldvorming is mede door de hooggeleerde Ploem tot stand gekomen. Helaas kon Bas in verband met beeldvormende activiteiten in het buitenland vandaag niet aanwezig zijn.

Hooggeleerde Tanke, beste Hans,

Veel van wat ik de revue heb laten passeren is mede door jouw energieke inzet tot stand gekomen. Het zijn de vruchten van zeer intensieve samenwerking in wetenschappelijke en bestuurlijke complementatie. Er zullen nog vele mooie vruchten volgen.

Hooggeleerde van Ommen, beste Gert-Jan,

Grenzen tussen celbiologie en genetica bestaan niet. De vruchtbare samenwerkingen die ik met jou en vele mensen van jouw Afdeling erop na houd getuigen daar in de dagelijkse onderzoekspraktijk van. We zullen het zo voortzetten.

Medewerkers en oud-medewerker van het Laboratorium voor Cytochemie en Cytometrie
Onderzoek doe je niet alleen. Het is ook jullie verhaal is dat ik heb mogen houden en het zijn jullie veren waar ik mee heb mogen pronken. Dank aan jullie allemaal.

Van mijn familie, wil ik speciaal mijn moeder danken voor de vele jaren van vriendschap.

En lieve Anna, jij bent de laatste die ik hier in deze rede persoonlijk toespreek, maar de tijd dringt dus ik zal het kort moeten houden. En dat komt wel goed uit, want met duizend woorden zelfs kan ik niet verbeelden wat jij voor mij betekent.

Mijheer de Rector Magnificus,
Zeer gewaardeerde toehoorders,

Ik heb gezegd.

Literatuur

1. Bastiaens,P.I. and Squire,A. (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.* 9, 48-52.
2. Bauman,J.G., Wiegant,J., Borst,P., and van Duijn,P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp. Cell Res.* 128, 485-490.
3. Blobel,G. (1985). Gene gating: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 8527-8529.
4. Brown,P.O. and Botstein,D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21, 33-37.
5. Chalfie,M., Tu,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W., and Prasher,D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
6. Dauwerse,J.G., Wiegant,J., Raap,A.K., Breuning,M.H., and van Ommen,G.J. (1992). Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum. Mol. Genet.* 1, 593-598.
7. Dirks,R.W., Daniel,K.C., and Raap,A.K. (1995). RNAs radiate from gene to cytoplasm as revealed by fluorescence in situ hybridization. *J. Cell Sci.* 108, 2565-2572.
8. Dirks,R.W., de Pauw,E.S., and Raap,A.K. (1997). Splicing factors associate with nuclear HCMV-IE transcripts after transcriptional activation of the gene, but dissociate upon transcription inhibition: evidence for a dynamic organization of splicing factors. *J. Cell Sci.* 110, 515-522.
9. Dirks,R.W., van de Rijke,F.M., Fujishita,S., van derPloeg, M., and Raap,A.K. (1993). Methodologies for specific intron and exon RNA localization in cultured cells by haptenized and fluorochromized probes. *J. Cell Sci.* 104, 1187-1197.
10. Dunham,I., Shimizu,N., Roe,B.A., Chissole,S., Hunt,A.R., Collins,J.E., Bruskiewich,R., Beare,D.M., Clamp,M., Smink,L.J., Ainscough,R., Almeida,J.P., Babbage,A., Bagguley,C., Bailey,J., Barlow,K., Bates,K.N., Beasley,O., Bird,C.P., Blakey,S., Bridgeman,A.M., Buck,D., Burgess,J., Burrill,W.D., and O'Brien,K.P. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402, 489-495.
11. Florijn,R.J., Blonden,L.A., Vrolijk,H., Wiegant,J., Vaandrager,J.W., Baas,F., den

- Dunnen,J.T., Tanke,H.J., van Ommen,G.J., and Raap,A.K. (1995). High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum. Mol. Genet.* 4, 831-836.
12. Florijn,R.J., van de Rijke,F.M., Vrolijk,H., Blonden,L.A., Hofker,M.H., den Dunnen,J.T., Tanke,H.J., van Ommen,G.J., and Raap,A.K. (1996). Exon mapping by fiber-FISH or LR-PCR. *Genomics* 38, 277-282.
 13. Hopman,A.H., Wiegant,J., Raap,A.K., Landegent,J.E., van der Ploeg,M., and van Duijn,P. (1986). Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemistry* 85, 1-4.
 14. Kluin,Ph.M. (1996). Hemathopathologie: van diagnose tot DNA. (Inaugurele rede, Universiteit Leiden).
 15. Koopman,L.A., Szuhai,K., van Eendenburg,J.D., Bezrookove,V., Kenter,G.G., Schuuring,E., Tanke,H., and Fleuren,G.J. (1999). Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 59, 5615-5624.
 16. Landegent,J.E., Jansen in de Wal, Dirks,R.W., Baas,F., and van der Ploeg,M. (1987). Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum. Genet.* 77, 366-370.17. Landegent,J.E., Jansen in de Wal, van Ommen,G.J., Baas,F., de Vijlder,J.J., van Duijn,P., and van der Ploeg, M. (1985). Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature* 317, 175-177.
 18. Lipshutz,R.J., Fodor,S.P., Gingeras,T.R., and Lockhart,D.J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* 21, 20-24.
 19. Macville,M.V., Wiesmeijer,K.C., Fransen,J.A., Dirks,R.W., and Raap,A.K. (1995). Detection of specific messenger RNA by electron microscopic in situ hybridization: implications for nucleocytoplasmic transport. *Eur. J. Cell Biol.* 68, 470-474.
 20. Moers,M.H., Kalle,W.H., Ruiter,A.G., Wiegant,J.C., Raap,A.K., Greve,J., de Grooth,B.G., and van Hulst,N.F. (1996). Fluorescence in situ hybridization on human metaphase chromosomes detected by near-field scanning optical microscopy. *J. Microsc.* 182, 40-45.
 21. Nederlof,P.M., Robinson,D., Abuknesha,R., Wiegant,J., Hopman,A.H., Tanke,H.J., and Raap,A.K. (1989). Three-color fluorescence in situ hybridiza-

tion for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10, 20-27.

22. Nederlof,P.M., van der Flier, S., Vrolijk,J., Tanke,H.J., and Raap,A.K. (1992). Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry* 13, 839-845.
23. Nederlof,P.M., van der Flier,S., Wiegant,J., Raap,A.K., Tanke,H.J., Ploem,J.S., and van der,P.M. (1990). Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 11, 126-131.
24. Ploem,J.S. (1967). The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incidental light. *Z. Wiss. Mikrosk.* 68, 129-142.
25. Raap,A.K., van de Rijke,F.M., Dirks,R.W., Sol,C.J., Boom,R., and van der Ploeg,M. (1991). Bicolor fluorescence in situ hybridization to intron and exon mRNA sequences. *Exp. Cell Res.* 197, 319-322.
26. Szuhai,K., Bezrookove,V., Wiegant,J., Vrolijk,H., Dirks,R.W., Rosenberg,C., Raap,A.K., and Tanke,H.J. (2000). Simultaneous molecular karyotyping and mapping of viral DNA integration sites by 25-color COBRA-FISH. *Genes Chromosomes. Cancer in press.*
27. Tanke,H.J., Wiegant,J., van Gijlswijk,R.P., Bezrookove,V., Pattenier,H., Heetebrij,R.J., Talman,E.G., Raap,A.K., and Vrolijk,J. (1999). New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: Combined Binary RAtio labelling. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 2-11.
28. Vaandrager,J.W., Schuurin,E., Raap,T., Philippo,K., Kleiverda,K., and Kluin,P. (2000). Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes. Cancer* 27, 85-94.
29. Vaandrager,J.W., Schuurin,E., Zwikstra,E., de Boer,C.J., Kleiverda,K.K., van Krieken,J.H., Kluin-Nelemans,H.C., van Ommen,G.J., Raap,A.K., and Kluin,P.M. (1996). Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 88, 1177-1182.
30. Wiegant,J., Bezrookove,V., Rosenberg,C., Tanke,H.J., Raap,A.K., Zhang,H., Bittner,M., Trent,J.M., and Meltzer,P. (2000). Differentially painting human

chromosome arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridization. *Genome Research* 10, 861-865.

31. Wiegant, J., Kalle, W., Mullenders, L., Brookes, S., Hoovers, J.M., Dauwerse, J.G., van Ommen, G.J., and Raap, A.K. (1992). High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum. Mol. Genet.* 1, 587-591.

