

**MICROSPECTROSCOPIE: EEN UNIEKE KIJK OP
DE NANOWERELD VAN DE LEVENDE CEL**

door prof.dr. Ton Visser

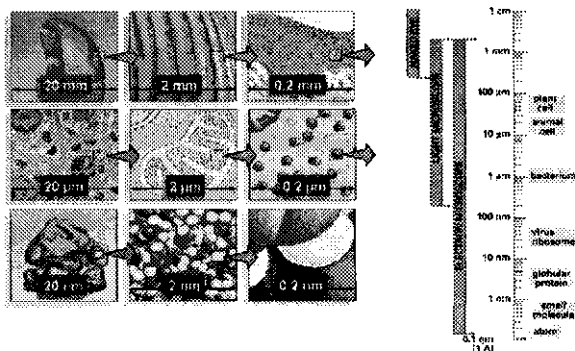


WAGENINGEN UNIVERSITEIT

Microspectroscopie: een unieke kijk op de nanowereld van de levende cel

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren,

Ik hoop u in de komende 45 minuten te vertellen over ons microspectroscopisch onderzoek naar de kleine, fascinerende wereld van de cel. Dat moet stapsgewijs gebeuren, omdat ons onderzoek vele verschillende facetten in zich herbergt. We werken met lasers, microscopen, optiek, lichtdetectoren, elektronica, computers en niet te vergeten levende cellen. Hoe kunnen we met al deze hardware in het binnenste van een cel kijken, zoals we met een telescoop sterren en planeten aan de hemel vergroot kunnen waarnemen? Daarom moeten we eerst gevoel voor de schaal van het hele kleine in de cel krijgen. En we moeten een idee krijgen van de beschikbare meetinstrumenten om kleinere van grotere celonderdelen te onderscheiden. Microspectroscopie is een samentrekking van microscopie en spectroscopie. We kunnen microspectroscopie definiëren als spectroscopie uitgevoerd op microscopische objecten. Om beide technieken goed te leren kennen moet ik putten uit de geschiedenis van de (optische) spectroscopie en de microscopie. Uit deze geschiedenis blijkt dat de fundamenteen van beide disciplines al heel lang geleden zijn gelegd. Het gezamenlijke gebruik van spectroscopie en microscopie is echter van veel recentere datum, ongeveer vanaf 1990 en daarna.



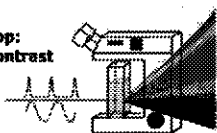
Een gevoel voor kleine afmetingen.

Bron: Molecular Biology of the Cell, B. Alberts et al., 4th Ed. Chapter 1, Garland Science, 2002

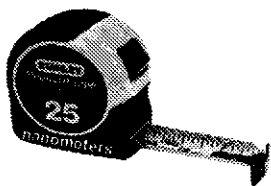
Eerst moet de vraag worden beantwoord waarom we microspectroscopie toepassen op levende cellen. De moleculen binnen een levende cel werken samen in een netwerk van systemen. Populairder gezegd een levende cel is in feite een minuscule fabriekje bestaande uit vele moleculaire machientjes. Om hun functie te vervullen moeten biomoleculen elkaar ontmoeten en herkennen. Informatie over biomoleculaire netwerken is onmisbaar om het functioneren (en slecht functioneren) van cellen te begrijpen. Het verwerven van kennis over moleculaire netwerken is daarom één van de grootste uitdagingen van het hedendaagse 'life sciences' onderzoek. De grote hoeveelheid informatie die tot ons komt dankzij de inspanningen van 'genomics', 'proteomics' en ander 'omics' onderzoek geeft slechts een geringe aanwijzing hoe biomoleculaire netwerken opereren. De DNA sequenties van een genoom verzameld van verschillende levende species vertellen ons niet hoe moleculaire machines

worden geassembleerd tot levende cellen, weefsels en organismen. Daarom moeten we naar methoden zoeken om de biochemie binnen een levende cel zichtbaar te maken. We kunnen dan pas begrijpen hoe en wanneer bepaalde eiwitten gaan samenwerken in een intracellulair netwerk, hoe uit het genoom cellen ontstaan, hoe cellen samenwerken in weefsels en organismen en hoe verkeerd geassembleerde cellen ziekten veroorzaken. Microspectroscopische technieken stellen ons in staat dankzij unieke contrastmethoden om biomoleculen aan het werk te zien in levende materie. Deze technieken verschaffen directe informatie over interacties tussen biomoleculen en hun dynamisch gedrag.

Levert op:
beter contrast



Micro is 1 miljoenste
Nano is 1 miljardste



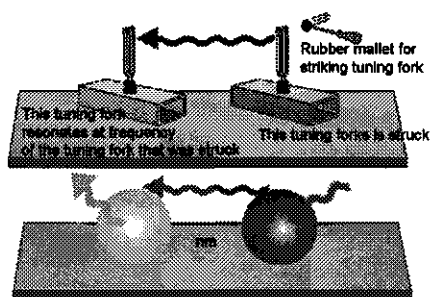
Microspectroscopie: spectroscopie toegepast op microscopische objecten. De klok tikt in nanoseconden en het meetlint meet in nanometers.

Het is precies 100 jaar geleden, in 1905, dat Albert Einstein vijf artikelen aanbood ter publicatie in het Duitse tijdschrift *Annalen der Physik* (voor een historisch overzicht zie de speciale uitgave van *Physics World*, januari 2005). Hij was toen 26 jaar oud en verdiende zijn brood als medewerker

(technisch expert 3^e klasse) aan het octrooibureau in Bern, Zwitserland. Drie van de vijf artikelen zijn van onschatbare waarde geweest voor de ontwikkeling van de fysica. Het eerste artikel ging over het onderzoek naar het foto-electrisch effect en verklaart licht als een pakketje energie: het foton. Voor dit werk dat voortbouwde op de kwantumtheorie van Max Planck kreeg hij de Nobelprijs natuurkunde in 1921. Van het fotoelectrisch effect wordt nu dankbaar gebruikt in photomultipliers en CCD camera's om lichtfotonen te detecteren en in beeldschermen voor TV en computers. In het tweede artikel wordt het gedrag van kleine deeltjes in water beschreven en het bestaan van atomen aangetoond. Deeltjes in water ondergaan Brownse beweging, genoemd naar de Schotse botanicus Robert Brown, die in 1827 onder de microscoop waarnam dat pollen van een bepaalde plant in water voortdurend in beweging waren (Bryson, 2003). Ik kom later terug op de Brownse beweging in veel kleinere eenheden, nl. levende cellen. Het derde artikel ging over de relativiteitstheorie, dat een kleine revolutie in het fysisch denken teweegbracht. Later werk van Einstein omvatte de bekende vergelijking $E=mc^2$, met E energie, m massa en c de lichtsnelheid. Massa staat gelijk aan een geweldige hoeveelheid energie en dit concept lag aan de basis van de schepping van de atoombom. In 1916 legde Einstein een verband tussen gestimuleerde emissie en spontane emissie van atomen en moleculen. Gestimuleerde emissie staat aan de basis van de laserwerking.

De vorm van optische spectroscopie die in microspectroscopie het meest wordt gebruikt is fluorescentie. Fluorescentie heeft een nog oudere oorsprong dan de fysica van Einstein ongeveer een eeuw geleden (voor een historisch overzicht zie: Lakowicz, 1999). De eerste beschrijving van het verschijnsel

is van Sir William Herschel (die eigenlijk astronoom was) in de *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* in 1845. De beschrijving gaat over de hemelsblauwe fluorescentie van dunne laagjes van kinine opgewekt door zonlicht. Niet lang daarna in 1852 verscheen in dezelfde Transactions een bijna 100 pagina's tellend verslag van Sir George Stokes naar hetzelfde fluorescentieverschijnsel in een oplossing van kinine. Stokes observeerde dat fluorescentie optreedt bij langere golflengten of lagere energie dan de golflengte van lichtabsorptie. Dit fenomeen van de fluorescentie draagt nog steeds zijn naam: de Stokes' verschuiving. Stokes gebruikte de zon als excitatiebron, een stukje blauw kerkglas als bandfilter, een fles met kinineoplossing als meetobject, een glas met witte wijn om alleen het fluorescentielicht door te laten en zijn oog als lichtdetector. In een artikel van een jaar later introduceerde Stokes de naam fluorescentie, eigenlijk ter herinnering aan mineralen fluorspar (Engels) of fluorspath (Duits), die dezelfde fluorescentieverschijnselen vertoonden (Valeur, 2001). Stokes heeft ook hydrodynamische wetten afgeleid. Dit heeft geleid tot de bekende Stokes-Einstein relatie, die het verband aangeeft tussen de diffusiesnelheid en de straal van een (bolvormig) molecuul.



Stemvork analogie voor resonante energieoverdracht

Een belangrijke toepassing van fluorescentie is Förster Resonance Energy Transfer (FRET) (voor een historisch overzicht: zie Clegg, 2004). Theodor Förster (1910-1974) heeft het FRET proces kwantitatief en volledig correct beschreven in termen die experimenteel kunnen worden bepaald (Förster, 1948). Vaak wordt FRET als acronym gebruikt voor Fluorescence Resonance Energy Transfer, maar fluorescentie maakt geen deel uit van het stralingsloze FRET proces en wordt alleen gebruikt om de mate van resonante energieoverdracht te bepalen. FRET is een fysisch proces waarbij de energie van de aangeslagen toestand van een donormolecuul stralingsloos wordt overgedragen naar een ander molecuul (de acceptor) in de grondtoestand, dat op minder dan 7 nm van de donor verwijderd is, dus zonder enig fysisch contact tussen beide moleculen. FRET wordt nu uitvoerig toegepast om interacties tussen (biologische) macromoleculen te bepalen, intermoleculaire afstanden te meten ('spectroscopic ruler') en conformatie-veranderingen in bijvoorbeeld eiwitten te volgen. FRET is nu ook een belangrijke experimentele techniek in fluorescentiemicroscopie. In de macroscopische wereld is een analoog voorbeeld te vinden in het gedrag van stemvorken. Brengen we een stemvork in trilling dan kunnen de geluidsgolven resonant worden overgedragen naar een tweede, goed afgestemde stemvork, die op korte afstand van de eerste is geplaatst.



Juan Perrin
(1870-1942)

100 nm

Francis Perrin
(1901-1992)

20-25 nm

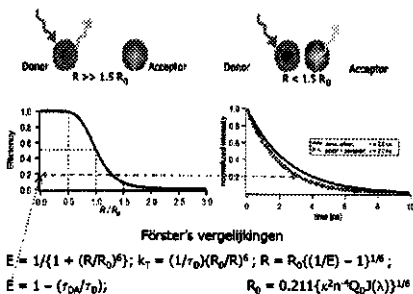
Theodor Förster
(1910-1974)

1-7 nm

Drie pioniers van stralingsloze energieoverdracht

Vader (Jean-Baptiste) en zoon (Francis) Perrin hebben eerder dan Förster een grote bijdrage geleverd aan het inzicht in het mechanisme van stralingsloze energieoverdracht (voor een historisch overzicht zie: Berberan-Santos, 2001). J.-B. Perrin's meest bekende onderzoek is naar de Brownse beweging van colloïden in waterige oplossing. Hij bestudeerde het sedimentatie-evenwicht van colloïdale deeltjes van uniforme grootte met behulp van een ultramicroscop, waarmee men voor het eerst deeltjes kleiner dan 100 nanometer (kleiner dan de golflengte van het licht, λ) kon waarnemen en bestuderen. De ultramicroscop was ontworpen door H. Siedentopf en R. Zsigmondy en beschreven in *Annalen der Physik* in 1903. J.-B. Perrin was in staat Einstein's theoretische studies naar het gedrag van colloïden experimenteel te bevestigen en het getal van Avogadro uit te rekenen. De fysische realiteit van de atomaire wereld was hiermee aangetoond en voor deze prestatie ontving hij de Nobelprijs in de natuurkunde in 1926. Het is ook waard te vermelden dat voor het verschijnen van Jablonski's bekende energiediagram in 1935, J.-B. Perrin al in de beginjaren van 1920 een energiediagram heeft gepostuleerd. De bijdrage van J.-B. Perrin en later van F. Perrin aan de stralingsloze energieoverdracht ligt ten grondslag aan de interpretatie van fluorescentiepolarisatie experimenten die al in 1920 waren gerapporteerd. In fluorescentiepolarisatie wordt de hoekafhankelijke correlatie tussen de polarisatie van de moleculaire fluorescentie ten opzichte van de polarisatie van het excitatielicht bepaald (Visser en van Hoek, 1987). De maximale waarde van de fluorescentiepolarisatie van moleculen die bewegingsloos zijn in een vaste oplossing (b.v. glycerol) is 0.5. Wanneer de moleculaire concentratie toeneemt en daardoor de gemiddelde afstand tussen de moleculen afneemt tot ongeveer 5-7 nm, begint ook de fluorescentiepolarisatie af te nemen.

J.-B. Perrin veronderstelde in 1927 dat excitatie-energie wordt overgedragen tussen oscillerende dipolen van moleculen (donoren en acceptoren) die zich in elkaars buurt bevinden. Hij noemde dit 'transfer d'activation' en redeneerde dat de energie-overdracht over een afstand van $\lambda/2\pi$ moest plaatsvinden. Deze afstand is ongeveer 100 nm en veel groter dan in werkelijkheid. Francis Perrin breidde de theorie van zijn vader uit door botsingen tussen de fluorescente moleculen en oplosmiddelmoleculen in beschouwing te nemen. Hij kwam tot een kortere kritische afstand van 20-25 nm, maar nog steeds te lang. Waarschijnlijk vanwege de tweede wereldoorlog duurde het veel langer totdat Förster het juiste antwoord wist te vinden. Francis Perrin geldt als een van de grote pioniers in de fluorescentie en zijn prestaties omvatten de volgende chronologische ontdekkingen. Het actieve-bol model in fluorescentie quenching (1924); de relatie tussen kwantumopbrengst en levensduur van de fluorescentie (1926); de theorie van fluorescentiepolarisatie in verband met Brownse rotatiebewegingen (1926) en de eerste kwalitatieve theorie van fluorescentiedepolarisatie door resonante energieoverdracht (1929). Uit de vergelijking die is afgeleid in 1926 en sindsdien zijn naam draagt is het mogelijk om de levensduur van de fluorescentie te bepalen. Eén van de moleculen die wij tot op heden gebruiken als een standaard voor fluorescentielevensduur is erythrosine. Francis Perrin vond voor de 'vie moyenne' van erythrosine 84 ps (Perrin, 1929). Dit is exact dezelfde levensduur die we zelf meer dan 60 jaren later experimenteel hebben bepaald (Bastiaens et al., 1992). Het is belangrijk op te merken dat Francis Perrin zijn ogen als lichtdetector gebruikte, terwijl wij nu de beschikking hebben over de meest geavanceerde excitatiebronnen (lasers) en meest gevoelige lichtdetectietechnieken.



Samenvatting FRET concepten

Förster heeft de correcte basis gelegd voor de beschrijving van het proces van stralingsloze energieoverdracht. Hij deed dat in een drietal stappen. 1. Hij gebruikte de kwantummechanische theorie voor spectrale overgangen. 2. Hij toonde aan dat snelheid van overdracht afhankelijk is van de spectrale overlap tussen het fluorescentiespectrum van de donor en het absorptiespectrum van de acceptor, van de oriëntatie tussen beide dipolen, van de brekingsindex en van de kwantumopbrengst (of levensduur) van de donorfluorescentie. Deze grootheden kunnen experimenteel worden bepaald. 3. Hij berekende de afstandsafhankelijkheid ($1/R^6$) van de dipolaire wisselwerking op correcte wijze en liet zien dat deze, nu correcte, afstand in de orde van grootte van 1-10 nm bedraagt. Förster's kwantitatieve theoretische beschrijving van stralingsloze energieoverdracht heeft de toon gezet voor talrijke toepassingen van FRET in vele onderzoekdisciplines.

Microscopie is al ouder dan fluorescentie en dateert uit de 16e-17e eeuw. De namen van Zacharias Jansen, Antoni van Leeuwenhoek en Robert Hooke zijn zeer sterk verbonden aan microscopie (Bryson, 2003). Zacharias Jansen, een brillen-

maker uit Middelburg, heeft in 1590 waarschijnlijk de eerste samengestelde microscoop gebouwd, bestaande uit een objectief en een oculair. Antoni van Leeuwenhoek uit Delft kwam uit een familie van textielhandelaren, had geen hoger onderwijs genoten en was alleen de Nederlandse taal machtig. Hij leerde met grote nauwkeurigheid lenzen te slijpen en eenvoudige microscopen te bouwen. De microscoop bestond uit een bolvormige lens bevestigd op een koperen plaat. Het voorwerp was vastgeprikt op een beweegbare naald en door in de glazen lens te kijken kon het voorwerp tot meer dan 200 keer vergroot worden waargenomen. Eén van zijn lenzen had een oplossend vermogen van 1.35 μm , voldoende voor cytologische toepassingen. Gedreven door een grote nieuwsgierigheid maakte hij grote biologische ontdekkingen in de microscoop, zoals bacteria, parasieten, spermacellen, bloedcellen, tandplak, nematoden en nog veel meer. Robert Hooke heeft na microscopische waarnemingen aan kurk voor het eerst de term cel bedacht naar analogie van kleine kamertjes in een klooster. Hij was de auteur van het populaire boek *Microphagia* (1665), dat de wereld van het heel kleine universum beschreef. Hooke was lid van de 'Royal Society of London'. Van Leeuwenhoek rapporteerde zijn bevindingen in het Nederlands aan Hooke en de Royal Society voor het eerst in 1673. Zijn brieven, vertaald in het Engels of Latijn, zijn verschenen in de *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*.



Van Leeuwenhoek ~1670



Zeiss LSM510-Confocal2 combi MicroSpectroscopy Centre, 2000

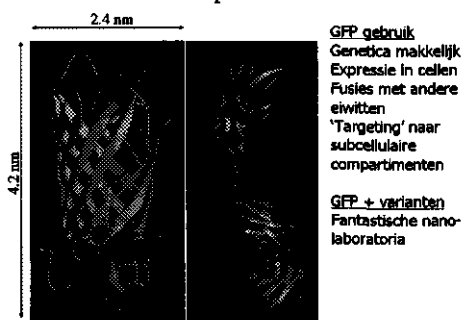


Ultra-microscop (Zsigmondy & Siedentopf), 1903

Evolutie van de microscopie.

De ontwikkeling van de moderne samengestelde microscopen verliep relatief langzaam (voor een historisch perspectief: zie Amos, 2000). Celbiologen hebben nieuwe ontdekkingen in de microscopie vaak gestimuleerd. In de negentiende eeuw is het te danken aan Ernst Abbe, Carl Zeiss en Otto Schott in Jena, Duitsland, dat er betere microscopen zijn vervaardigd. Het initiatief hiertoe kwam van de bioloog Robert Koch (de eerste waarnemer van de tuberculose bacil), die Zeiss wist te overtuigen zijn kleine optische werkplaats in tijden van economische tegenspoed open te houden. Schott was een specialist in de fabricage van verschillende soorten glas voor optische doeleinden en Abbe was de theoretisch geschoolde fysicus van de optica. Abbe stond aan de wieg van het oplossende vermogen van een microscoop, dat door de golflengte van het licht is begrensd. Abbe's zogenaamde optische diffractielimiet kan als volgt worden geformuleerd: twee naast elkaar liggende punten kunnen niet worden onderscheiden wanneer de afstand minder is dan de halve golflengte van het gebruikte licht. Dus voor groen licht van 500 nm betekent dit dat het ruimtelijk oplossende vermogen van een optische micro-

scoop ongeveer 250 nm is. Deze grens kan nu worden doorbroken door het gebruik van extra objectieven (4π -microscopie) en door het manipuleren van de zogenaamde 'point-spread' functie, zodat nanoscopie met een ruimtelijke resolutie van ongeveer 50 nm in de optische microscopie binnen bereik komt (Hell, 2003). De technische implicaties om van een gewone microscoop een nanoscoop te maken zijn echter niet triviaal. Electronenmicroscopie heeft het benodigde ruimtelijk oplossend vermogen, maar mist een zeer belangrijke vereiste: het is niet toepasbaar op levende cellen en weefsels omdat de preparaten vooraf moeten worden bewerkt. We zien dus de reconstructie van dode materie of hoe een cel er op het moment vlak voor het prepareren er uit gezien zou hebben. Verder liggen de kosten van een electronenmicroscoop beduidend hoger dan die van een lichtmicroscoop.



GFP gebruik
 Genetica makkelijk
 Expressie in cellen
 Fusies met andere eiwitten
 'Targeting' naar subcellulaire compartimenten

GFP + varianten
 Fantastische nanolaboratoria

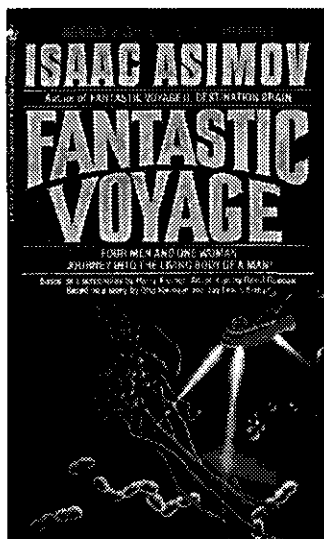
Orn6 et al. *Science* (1996) 273, 1392 Hink et al. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 17556

'Green Fluorescent Protein' (GFP) uit *Aequorea victoria* (pacific jellyfish)

Een belangrijke ontwikkeling in de celbiologie komt voort uit een samenspel van de biochemie en de moleculaire biologie: de 'green fluorescent protein' (GFP) technologie

(Tsien, 1998). Oorspronkelijk is GFP een zogenaamd antenne-eiwit dat de bioluminescentie van een kwal (genus *Aequorea victoria*) resonant ontvangt en dit als helder groen licht uitzendt. De DNA-sequentie van GFP uit die kwal is bekend en kan nu in bijna ieder organisme tot expressie worden gebracht, van bacteriën, planten tot humane cellen of weefsels. De cellen lichten in een fluorescentiemicroscoop prachtig groen op. Een groot voordeel van de GFP-technologie is dat een bepaald, interessant eiwit (b.v. een receptoreiwit) genetisch gefuseerd kan worden met GFP en in een cel tot expressie kan worden gebracht. Met behulp van dit 'eiwitlampje' kunnen we op deze manier bepaalde biologische processen zichtbaar maken. Bijvoorbeeld, een signaalmolecuul of hormoon reageert met een specifieke receptor. Dat leidt vervolgens in de cel tot een cascade van chemische reacties en tenslotte tot een cellulaire respons. Die respons kan b.v. zijn: zorg dat een bepaald functioneel eiwit wordt gesynthetiseerd of maak pseudopodiën (schijnvoetjes) zodat een ééncellig organisme kan bewegen in een bepaalde richting. Een signaal kan zelfs zo drastisch zijn dat een cel besluit niet meer in leven te blijven zoals in het geval van geprogrammeerde celdood (apoptose). Verder is er ondertussen een heel palet van gekleurde varianten van GFP beschikbaar, niet alleen uit bovengenoemde kwal, maar ook uit koralen (Verkhusha & Lukyanov, 2004). Verschillende GFP-varianten kunnen samen een donor-acceptor paar vormen, b.v. Cyan Fluorescent Protein (CFP, donor) en Yellow Fluorescent Protein (YFP, acceptor). Wanneer deze gekleurde varianten genetisch worden gefuseerd met bepaalde eiwitten die met elkaar een communicatie over en weer vertonen binnen in de cel dan kunnen we deze interacties zichtbaar maken door gebruik te maken van FRET. Op deze manier kunnen we de diffractielimiet

van fluorescenciemicroscopie omzeilen en nanometer-interacties tussen eiwitten in een cel nauwkeurig bepalen.

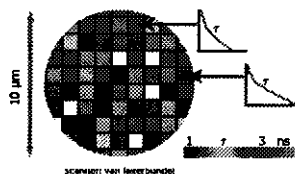


De omslag van het boek 'Fantastic Voyage' van de bekende 'science-fiction' schrijver Isaac Asimov (1920-1992) geeft een treffende vergelijking weer wat we met microspectroscopie willen bereiken. Asimov laat een 'moleculair' voertuig zien dat beweegt in de minuscule ruimte van een levende cel. Met de boordlichten van dit nanotechnologische wondervoertuig kan de bestuurder zien waar de reis naar toe gaat en ongewen-

ste botsingen met organellen en andere cellulaire obstakels vermijden. Op deze manier kan deze ontdekkingsreiziger ongestoord, d.w.z. 'niet-invasief', de magische wereld van een levende cel onderzoeken. Met dat minuscule voertuig bedoelen we natuurlijk een optische lichtmicroscop, de boordlichten zijn laserbundels en de ogen van de bestuurder zijn in werkelijkheid zeer gevoelige detectoren die enkele fotonen fluorescencielicht kunnen registreren.

Fluorescentie-microspectroscopie is misschien wel het belangrijkste hulpmiddel in de biologie en het streven is er altijd op gericht geweest om met de meest moderne hulpmiddelen zoveel mogelijk contrast en de grootste gevoelig-

heid te verkrijgen. Fluorescentie verenigt in zich de eigenschappen van grote gevoeligheid en selectiviteit. De beroemde vader van de biologische fluorescentiespectroscopie, Gregorio Weber (1916-1997), heeft eens een algemene regel geformuleerd: om fluorescentie van moleculen in een systeem van onbekende complexiteit (b.v. een levende cel) te karakteriseren moeten de spectrale verdeling, kwantumopbrengst, levensduur van de aangeslagen toestand en de polarisatie (anisotropie) van de fluorescentie worden bepaald. Door deze fluorescentie-parameters in een microscoop te meten worden unieke contrastmethoden verkregen waarmee het dynamische gedrag van enkele moleculen binnen de levende cel kan worden geobserveerd. Daarnaast maken we natuurlijk een dankbaar gebruik van de hierboven beschreven 'green fluorescent protein'-technologie. Ik heb mijn postdoc-periode bij prof. Gregorio Weber doorgebracht aan de 'University of Illinois', te Urbana, USA. Dat was een zeer leerzame periode omdat ik toen voor het eerst het inzicht kreeg in de kracht van de fluorescentietechniek toegepast op het grensvlak van de biologie, chemie en fysica. Later heb ik deze kennis gebruikt om microspectroscopische methoden en technieken te ontwikkelen.



SCHWARTZ VAN LIEFERBONDEL

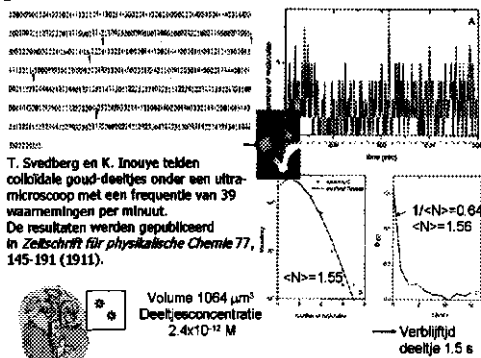
FRET: lichte afstand = 5.0 nm en levensduur zonder FRET = 2.5 ns

Levensduur (ns)	Afstand (nm)
2.0	4.0
1.75	5.7
1.5	8.3
1.25	5.0

FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Er zijn twee vormen van fluorescentiemicroscopie waarmee we in het MicroSpectroscopie Centrum (MSC) in Wageningen grote vooruitgang hebben behaald en waarmee we mondiaal gezien mede voorop lopen. Dat zijn fluorescentie lifetime imaging microscopy (FLIM) en fluorescentie fluctuatie spectroscopie (FFS). Met normale fluorescentiemicroscopie wordt de intensiteit van fluorescentie als contrastmiddel gebruikt. Met FLIM is het contrastmiddel juist de levensduur van de fluorescentie. De levensduur van de fluorescentie van een molecuul is een gevoelige parameter voor de directe moleculaire omgeving. Treedt er b.v. FRET op tussen twee moleculen in een levende cel, dan zal de fluorescentielevensduur van de donor afnemen. De mate van afname staat in direct verband met de onderlinge afstand. Dus door de fluorescentielevensduur van de donor te meten op iedere positie in de cel, kan direct worden bepaald waar en in welke mate de communicatie over en weer plaatsvindt. Het grootste voordeel van FLIM-metingen is dat in tegenstelling tot fluorescentieintensiteit de fluorescentielevensduur onafhankelijk is van de moleculaire concentratie. In het MSC hebben we een FLIM-opstelling opgebouwd uit commercieel beschikbare onderdelen. Met deze opstelling hebben we interacties opgespoord binnen een klasse van receptoreiwitten die een belangrijke rol spelen bij de embryogenese van planten (in het bijzonder de modelplant *Arabidopsis thaliana* of zandraket). Het is een belangrijk onderzoeksthema van collega prof. Sacco de Vries van de leerstoelgroep Biochemie. Brassinosteroiden (BR) zijn de plant homologen van de dierlijke steroïde hormonen en zij regelen processen als celdeling en celverlenging. Brassinosteroiden binden aan bepaalde receptoreiwitten die zich in het plasmamembraan van de cel bevinden, in tegenstelling tot de dierlijke soortgenoten, die nucleaire receptoren zijn en na ontvangst van een signaal re-

ageren door genen aan of uit te schakelen. Recent is met FLIM aangetoond dat twee leden van de BR receptorfamilie sterke wisselwerking vertonen en als gevolg daarvan endocytose ondergaan. Jan Willem Borst van ons MicroSpectroscopie Centrum (MSC) was intensief bij deze metingen betrokken.



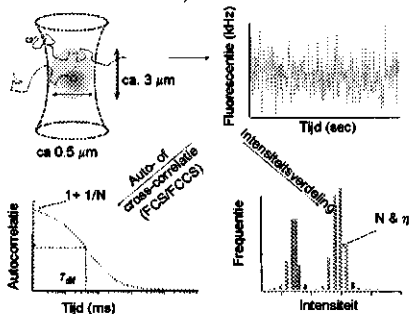
De eerste resultaten van fluctuatie spectroscopie en de analyse vele jaren later.

Bron: Y. Chen. *Analysis and applications of fluorescence fluctuation spectroscopy.*

Ph.D. thesis University of Illinois at Urbana-Champaign, 1999

Fluorescentie correlatie spectroscopie (FCS) is een afgeleide techniek van de meer algemene techniek fluorescentie fluctuatie spectroscopie (FFS). Yan Chen (1999) beschrijft in haar Ph.D. thesis de analyse van de eerste beschikbare experimentele data van fluctuatie spectroscopie. De meetgegevens zijn gepubliceerd door Svedberg en Inouye (1911) aan een suspensie van gouddeeltjes, die zij observeerden in een ultramicroscop. De gouddeeltjes hadden een afmeting van 10-20 nanometer, veel te klein voor directe waarneming, maar door lichtverstrooiing te zien voor een donker

geadapteerd oog. Een kleine spleet in het detectiegedeelte (oculair) van de microscoop definieert het observatievolume, waarbij deeltjes in en uit kunnen diffunderen. Svedberg en Inouye telden het aantal gouddeeltjes 39 keer per minuut. Pas na een statistische analyse van de data kunnen de fysische trends worden vastgesteld. Deze statistische analyses omvatten een histogramanalyse en de bepaling van de autocorrelatiefunctie van de fluctuaties. Een histogramanalyse beschrijft de waarschijnlijkheid om N deeltjes aan te treffen in het observatievolume. Von Smoluchowski heeft in 1914 dezelfde meetgegevens gebruikt om het Poisson-karakter van een fluctuerend aantal deeltjes theoretisch te onderzoeken. De autocorrelatiefunctie beschrijft het tijdsafhankelijke verval van de fluctuaties naar een evenwichtswaarde. Het rekenen van de gelijkheid uit van een signaal en een copie van hetzelfde signaal dat verschoven is over een zekere tijd. Het begrip autocorrelatie was ten tijde van Svedberg en Inouye niet bekend. Later moesten autocorrelatie-functies met de hand worden uitgerekend, een tijdrovende bezigheid, nu kan dat momentaan met een computer. De beginwaarde van de autocorrelatiefunctie op tijdstip $t=0$ geeft de reciproke waarde van het aantal deeltjes in het observatievolume.



Fluorescentie fluctuatie spectroscopie.

Bron: M.A. Hink. *Fluorescence correlation spectroscopy applied to living plant cells*. Ph.D. thesis Wageningen University, 2002.

In de periode 1990-2005 heeft fluorescentie fluctuatie spectroscopie een hoge vlucht genomen. Dit is te danken aan een grote technologische vooruitgang op het gebied van stabiele lasers, confocale microscopie, zeer gevoelige detectoren, elektronische onderdelen, computerprogramma's en aan de ontwikkeling van fluorescente probes met een grote helderheid ('brightness'). Gedurende de laatste 5 jaren is het aantal toepassingen van fluorescentie fluctuatie spectroscopie exponentieel gegroeid mede dankzij de ontwikkeling van verschillende commerciële systemen. De FFS-toepassingen in levende cellen nemen eveneens toe. Het principe is relatief eenvoudig. In een confocale microscoop wordt een laserbundel met behulp van een objectief met hoge numerieke apertuur gefocuseerd tot een heel kleine lichtbundel. We genereren met behulp van een klein gaatje van circa 40 μm (een zogenaamde 'pinhole') een heel klein observatievolume van circa 1 femtoliter, ongeveer de afmeting en vorm van een *E. coli* bacterie. Dan wachten we tot een enkel fluorescent molecuul in het observatievolume terecht komt. Het molecuul wordt aangeslagen met laserlicht en zendt fotonen uit totdat het molecuul uit het observatievolume verdwijnt door diffusie. Die fluorescentie-fotonen worden één voor één gedetecteerd door een detector en in een computergeheugen opgeslagen. Een korte tijd later komt er het volgende molecuul in het volume en herhaalt zich het proces. Dan wordt deze opgeslagen fotonenstroom als boven beschreven geanalyseerd. Uit de analyse van fluorescentie correlatie spectroscopie (FCS) krijgen we twee belangrijke grootheden: het aantal deeltjes in het observatievolume en hun verblijftijd. Uit het aantal deeltjes wordt de concentratie moleculen bepaald en uit de verblijftijd kan berekend worden hoe snel de moleculen bewegen, dat uitgedrukt wordt in de diffusieconstante. Met FCS kunnen we dus de statistische wetten van de Brownse beweging afgeleid door Einstein een eeuw geleden experimenteel

testen. De histogramanalyse levert naast het aantal deeltjes nog een belangrijke grootte op: het aantal fotonen fluorescentielicht dat 1 molecuul per seconde uitzendt. FFS is een techniek die de gevoeligheid bezit van enkele moleculen. Dit is de ultieme detectiegrens van de spectroscopie. In het MicroSpectroscopie Centrum hebben wij FFS getest, ontwikkeld en verder uitgebreid met fluorescentie-cross-correlatie methoden (Hink, 2002). Wij hebben dezelfde BR-receptoren in plantencellen als hierboven met FLIM beschreven onderzocht met FFS. Mark Hink was de drijvende kracht achter deze experimenten. We konden dezelfde interacties meten, alleen met veel lagere concentraties receptoreiwitten. Dit weerspiegelt automatisch de grote kracht van de FFS techniek. De metingen kunnen worden uitgevoerd met zeer lage concentraties biomoleculen, die vaak in het fysiologisch belangrijke bereik liggen. Wanneer FFS wordt toegepast in cellulair onderzoek, dan moeten andere problemen worden overwonnen zoals de interferentie met autofluorescentie, photobleaching, celbeweging, etc.

Ik heb al aandacht besteed aan plantreceptoren in het kader van FLIM en FFS toepassingen. Ik zal een paar hoogtepunten van andere projecten toelichten. Chemotaxis is een proces waarbij cellen zich bewegen in de richting van een chemische gradiënt. Het speelt een belangrijke rol in ons lichaam, b.v. wanneer witte bloedcellen zich naar een infectiehaard moeten haasten. Chemotaxis t.o.v. een cAMP-gradiënt speelt een essentiële rol in de levenscyclus van de sociale amoëbe *Dictyostelium*. Wanneer cAMP bindt aan receptoren van deze amoëbe komen er een hele reeks biochemische reacties op gang die er uiteindelijk voor zorgen dat een cel in een bepaalde richting beweegt. *Dictyostelium* cellen zijn behoorlijk beweeglijk en zitten eigenlijk geen moment stil.

Ruchira (in een samenwerkingsproject met prof. Peter van Haastert, RUG) heeft toch het bijna onmogelijke gepresteerd om de diffusiesnelheid te meten in het cytosol van deze cellen die met GFP getransfecteerd waren. Zij kon aantonen dat die diffusiesnelheid verandert wanneer de cellen geen voeding meer kregen en bewegen in de richting van cAMP. En dat niet alleen: ze kon zelfs laten zien dat de diffusie in de voorkant sneller is dan in de achterkant van de cel. Deze resultaten konden in verband worden gebracht met mogelijke verschillen in cytoskelet structuur in beide regio's van de cel. Ruchira heeft deze resultaten beschreven in een proefschrift dat dit jaar zal worden verdedigd.

In een door de Stichting Technische Wetenschappen (STW) gefinancierd project (samen met dr. Arjen Schots) heeft Niek Kunst een microfuidic chip (biochip) gemaakt met het doel om enkele, nanometer fluorescente deeltjes zoals virussen in water in micrometer-kanaaltjes te observeren en te sorteren. Wanneer een fluorescent deeltje in de microscoop gedetecteerd wordt is het mogelijk de vloeistofstroom zo te sturen dat het deeltje in een ander kanaal wordt opgevangen. Op deze manier is een nanosorteer-machine gebouwd.

Het MicroSpectroscopie Centrum is nu een belangrijk expertisecentrum binnen WUR, waarin geavanceerde optische microscooptechnieken zijn ontwikkeld als hulpmiddel om onderzoeksvragen uit de celbiologie, biochemie en biofysica te beantwoorden. Het is officieel ontstaan in 1996 dankzij een Mibitonsubsidie. Oud-collega dr. Hans Grande was toen de Mibiton-investeringsmanager. Het betrof toen een gezamenlijke aanvraag met prof. Hans Tanke van Leiden Universiteit, prof. Colja Laane, toen leerstoelgroep-houder Biochemie, en mijzelf. De aangevraagde apparatuur

in Wageningen bestond uit een spectrale imaging microscoop, hoge-druk apparatuur en een CCD camera. Bij Mibitonsubsidies was het nodig om de helft van de subsidie te garanderen en terug te betalen via inkomsten uit industriële samenwerking. Dat was toen geen enkel probleem. Het MSC biedt aan universiteiten, onderzoeksinstituten en industriële bedrijven 'state-of-the-art' faciliteiten van microspectroscopie om biomoleculaire interacties te onderzoeken zoals tussen eiwitten, koolhydraten, lipiden, nucleïnezuren en metabolieten of in geïsoleerde vorm, in microchips of binnen cellen. Het MSC richt zich op het concentreren en uitbreiden van de expertise en de kennis van microspectroscopie met nadruk op plant- en voedingswetenschappen. Naast de Mibitonsubsidie is de periode 1990-2000 uitermate succesrijk geweest in het binnenhalen van externe fondsen. Het is met recht een gouden decade geweest. Door onze lange ervaring met de 'single-photon timing' techniek waren wij ook de eersten die in Nederland fluorescentie correlatie technieken hebben geïntroduceerd. Dit was mede mogelijk door genereuze steun van de firma Zeiss uit Jena, die zowel een FCS-systeem in bruikleen gaf en fondsen beschikbaar stelde voor personele ondersteuning om het FCS-systeem te gebruiken voor pionierend onderzoek. Door een toegekende NWO-Groot investeringssubsidie uit 2000 konden we het instrumentenpark uitbreiden met moderne lasers, confocale microscopen, detectoren en electronica. We hebben twee microscopie-opstellingen gebouwd: 1 voor multiphoton excitatie in samenhang met FLIM toepassingen, een andere voor 1-photon excitatie met iedere mogelijke golflengte voor excitatie en multimodale toepassingen (anisotropie, levensduren, fluctuatiespectroscopie).

Het MSC was en is betrokken bij vele onderzoeksprojecten, zoals:

- chemotaxis in *Dictyostelium* cellen;
- plant receptor kinases betrokken bij embryogenese;
- plant resistentie genen en hun rol in geprogrammeerde celdood;
- plant transcriptie factoren betrokken bij bloemvorming;
- eiwitadsorptie aan vaste oppervlakken;
- mechanisme van eiwit-hervouwing bestudeerd met 'single-moleculen' en 'ensemble' fluorescentietechnieken;
- fotosynthese;
- microfluidics en screening van 'biolibraries';
- analyse van secretie-paden in *Aspergillus niger*;
- humane nucleaire receptoren als dieetsensoren.

Het MSC heeft eveneens een taak als trainingscentrum. Ph.D. studenten en postdocs krijgen instructie en training om zelf de geavanceerde microscopieapparatuur te bedienen. Wij hebben tot nu toe drie 'FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Advanced Courses' georganiseerd.

- In 2000: 'Microspectroscopy: Monitoring Molecular Behaviour in Living Cells',
- in 2002: 'Microspectroscopy: Monitoring Molecular Interactions and Reactions in Living Cells' en
- in 2004: 'Microspectroscopy: Visualisation of Biochemistry in Living Cells'.

Deze cursussen werden bijgewoond door Ph.D. studenten en postdocs uit heel Europa en waren een groot succes. Een aantal van hen is later teruggekomen om een gedeelte van hun eigen onderzoeksprogramma op het MSC uit te voeren.

Om het MicroSpectroscopie Centrum handen en voeten te geven en als officieel expertisecentrum WUR-breed te laten functioneren, heb ik in 2000 een businessplan geschreven en ingediend bij de Raad van Bestuur. Een gewijzigd businessplan is in 2003 ingediend.

De drie strategische speerpunten waar het MSC zich op richt zijn:

1. Visualiseren en manipuleren van processen in de levende cel: Eén van de belangrijkste doelstellingen in de celbiologie is te begrijpen hoe, waar, wanneer en in welke mate eiwitcomplexen ('eiwitmachines') in een levende cel de informatie verwerken in antwoord op externe stimuli, die leiden tot differentiatie, proliferatie of apoptose (geprogrammeerde celdood). Deze meer holistische benadering verdringt de klassieke reductionistische benadering meer en meer.
2. Functionele genomica: Inzicht in de hogere orde organisatie van de kern binnen plantencellen en humane cellen wordt steeds belangrijker om de ontwikkeling en het functioneren van deze cellen te kunnen begrijpen. Geavanceerde micro(spectro)scopie is eveneens een belangrijk hulpmiddel om 'eiwitmachines' (zie speerpunt 1) en hun interacties in de cel te visualiseren. Ons inzicht in deze processen zal worden vergroot en draagt bij aan de vooruitgang in het genomics en proteomics onderzoek.
3. Bionanotechnologie: De cel is een complexe eenheid bestaande uit een aantal samenwerkende onderdelen met elk een specifieke functie zoals membraan (structuur, signalen), kern (reproductie), cytoskelet (stevigheid), Golgi (eiwitsortering), endoplasmatisch reticulum (eiwitsynthese, routing), mitochondriën (energiebeheer), etc. Om het functioneren van de cel en cel-

onderdelen te begrijpen is het nodig om in te zoomen op deze structuren en hun fysische en chemische eigenschappen te bepalen met nieuwe 'single-molecule' gereedschappen zoals een optisch pincet en 'single-molecule' fluorescentie detectiemethoden. Onderzoek naar de nano-eigenschappen (zowel in ruimte als tijd!) van enkele eiwitmoleculen, membraan-geassocieerde receptoren, moleculaire motoren en andere supra-bio-moleculaire structuren *in vitro* en *in vivo* is daarom uitermate belangrijk.

De reactie op dat plan heeft heel lang op zich moeten wachten, omdat er eerst een Wagenings Technologieplatform moest worden opgericht om het plan te toetsen. Eindelijk, met ingang van 1 januari 2005 heeft het MicroSpectroscopie Centrum binnen WUR officiële status gekregen met 2 fte personeel.

De studierichting Moleculaire Wetenschappen is een unieke multidisciplinaire afstudeerrichting opgericht in begin 1970 binnen de enkele faculteit die de universiteit toen rijk was. Het multidisciplinaire karakter kwam naar voren omdat biologische, chemische en fysische richtingen waren geïntegreerd in de studie Moleculaire Wetenschappen. Voordat de leerstoelgroep Moleculaire Fysica (prof. Tjeerd Schaafsma) was opgericht, kregen Hans Grande en ik het verzoek van prof. Cees Veeger van de vakgroep Biochemie om als pas afgestudeerde fysisch chemici van de Universiteit van Amsterdam colleges kwantummechanica, chemische binding en molecuulspectroscopie te verzorgen voor de eerste lichting studenten in de Moleculaire Wetenschappen. Dat hebben we met heel veel plezier gedaan totdat Tjeerd Schaafsma deze taken overnam. Ik memoreer dit feit omdat

het allang niet meer in de annalen terug te vinden is. Met het teruglopende aantal scheikunde- en natuurkunde studenten hebben andere universiteiten in Nederland dit Wageningse concept gevolgd zonder dat openlijk te bekennen, overigens. Huidige studenten in de Moleculaire Wetenschappen en van andere studierichtingen zoals Biologie en Biotechnologie krijgen nu onderwijs in de meest moderne vormen van microspectroscopie. De cursussen waaraan het MicroSpectroscopie Centrum tegenwoordig bijdraagt, zijn:

- 'Advanced Methods in Biochemical Research',
- 'Advanced Spectroscopy',
- 'Biological Spectroscopy',
- 'Biophysical Imaging',
- 'Cell Biology and Advanced Imaging Technologies',
- 'Control of Cellular Processes and Cell Differentiation',
- 'Molecular Biophysics',
- 'Toolbox for Molecular Biology and Biochemistry'

Ik heb altijd met heel veel plezier studenten onderwezen in de microspectroscopie. Ik wil een dringend advies aan Wageningen Universiteit meegeven: koester de studierichting Moleculaire Wetenschappen als een kostbare diamant.

Ik hoop te hebben aangetoond dat de microspectroscopie een belangrijke rol speelt en nog zal spelen in het onderzoek en onderwijs binnen WUR. Voor wat betreft het onderwijs in de toekomst, moeten we doorgaan op dezelfde koers. Het onderzoek in de nabije toekomst zal zich naast de plantsystemen meer gaan richten op humane systemen. Er is al onderzoek opgestart naar humane nucleaire receptoren die een belangrijke rol spelen als dieetsensoren (samenwerking met prof. Michael Müller van de leerstoelgroep

Humane Voeding en Epidemiologie). De samenwerking met Plant Research International (PRI) op het gebied van plant transcriptiefactoren wordt intensief voortgezet (samen met prof. Gerco Angenent). Een pilot study over het ontwerp van een elektronische neus (via FRET) is net gestart samen met dr. Maarten Jongasma van PRI. Samen met dr. Carlo van Mierlo hopen we binnen het huidige NWO-project 'van molecuul tot cel' een onderzoeksstrategie te ontwikkelen om de vouwing van een eiwit in een levende cel te bestuderen. We houden zelf de vinger aan de pols door methoden te ontwikkelen die aan de grens staan wat mogelijk is met de huidige apparatuur. De meest recente resultaten zijn dat we de katalyse kunnen volgen van één enkel flavoenzym met een combinatie van FRET en FCS. Een andere recente vondst is dat we FRET in een CFP-YFP systeem direct in de tijd kunnen volgen met tijdopgeloste fluorescentie anisotropie, waarmee we naast de snelheid van het FRET proces ook voor het eerst de onderlinge oriëntatie tussen beide eiwitten kunnen vaststellen.

Bij deze positieve ontwikkelingen wil ik toch enige kanttekeningen plaatsen. Het MicroSpectroscopie Centrum heeft de geavanceerde apparatuur in eigen beheer. De huidige waarde van deze apparatuur bedraagt ongeveer 2 miljoen euro. Om de apparatuur te onderhouden en te upgraden, zijn we genoodzaakt tarieven voor gebruikers te hanteren. De tarieven zijn relatief laag voor academische gebruikers. Voor industriële gebruikers zijn de personeelskosten geïntegreerd in het tarief en daardoor hoger. Ook de huur van de ruimtes moet tegenwoordig worden betaald. Dit alles leidt in toenemende mate tot scheve gezichten van (in het bijzonder) de academische gebruikers, omdat de fondsen waaruit tarieven moeten worden betaald steeds schaarser worden. Het heeft

hoge prioriteit om in de nabije toekomst naar een juiste oplossing voor deze problemen te zoeken.

In tegenstelling tot een aantal jaren geleden verloopt de externe (personele) steun vanuit tweede geldstroomfondsen (NWO) veel moeizamer. Er is een hogere aanvraagdruk voor individuele projecten en het honoreringspercentage ligt zo laag (<10%) dat men zich kan afvragen of alle inspanningen nog de moeite van het schrijven van projecten lonen. Ook is het Nederlandse NWO-wereldje in de biochemie en biofysica zo klein dat men de neiging heeft om elkaar als ongewenste concurrenten te zien dan als goede collega's. Deze conclusie is eenvoudig te destilleren uit het commentaar van referenten op ingediende voorstellen. Mijn voorstel voor een meer objectieve beoordeling van projectvoorstellen zou zijn om het Vlaamse IWT-model te hanteren. IWT staat voor het Instituut voor de Aanmoediging van Innovatie door Wetenschap en Technologie in Vlaanderen, misschien de Vlaamse tegenhanger van de Nederlandse STW. Zo is FWO (Wetenschappelijk Onderzoek Vlaanderen) de Vlaamse NWO. Alle referenten komen uit het buitenland en worden bij elkaar gebracht in twee dagen om alle ingediende Vlaamse onderzoeksvoorstellen te prioriteren. In plaats van Brussel (IWT) kan één van de Waddeneilanden tot plaats van samenkomst worden gekozen.

Ook apparaatuaanvragen via NWO (ALW/CW) verlopen moeizaam. Per jaar is er ruimte voor het honoreren van gemiddeld 5-6 aanvragen van de circa 40-50 apparaatuaanvragen. Een belangrijk criterium is dat de apparatuur vernieuwend moet zijn. Voor standaardapparatuur zijn er geen NWO-fondsen beschikbaar. Dit was 10 jaar geleden an-

ders, omdat de toenmalige stichting Scheikundig Onderzoek Nederland (SON) van NWO nog een inhaal-slag apparatuur heeft uitgevoerd waarmee wij onze circulair dichroïsme spectrometer hebben vervangen door een nieuwe en 'rapid mixing' apparatuur hebben verworven. Voor de NWO-aanvragen van geavanceerde, dure apparatuur moeten de eigen instellingen voor minimaal 25% garant staan. In het geval van het MicroSpectroscopie Centrum betekent het dat we de 25% zelf uit andere inkomsten moeten genereren. Dit kan echter alleen als daar inkomsten van b.v. 3^e geldstroom-onderzoek tegenover staan. We hebben steeds een goede samenwerking met het Wageningen Centre for Food Sciences (WCFS; contact met dr. Harmen de Jongh) gehad. In de toekomst hopen we op dezelfde goede samenwerking in het kader van WCFSplus. Om als MSC te overleven is het nodig om het bedrijfsleven blijvend te interesseren voor MSC-contractonderzoek. De tijd is voorbij dat we puur fundamenteel onderzoek kunnen doen. We moeten serieus denken aan het zelf oprichten van een bedrijfje. We hebben een grote hoeveelheid innovatieve kennis in huis. Valorisatie van deze kennis moet hoog op de MSC-agenda staan. Voor Mibiton-subsidieaanvragen is nu de balans helemaal doorgeslagen naar het starten van een eigen bedrijf: geen bedrijf, geen subsidie.

De situatie voor de nabije toekomst is dus niet zonnig, wanneer het benodigde onderzoeksgeld uitsluitend van de overheid moet komen. Dit wordt eveneens weerspiegeld in de heersende kritiek op het Innovatieplatform en op de manier waarop het huidige kabinet met platformadviezen om-springt. 'De klok tikt voor Innovatieplatform' kopte het Wb van 17 maart jl. Het aandachtsgebied 'food and flowers' is één van de speerpunten in innovatie en Wageningen

is één van de meest belovende innovatieregio's van Nederland. Het blijft voorlopig bij het opnoemen van prioriteiten, terwijl het wachten is op innovatie-impulsen die maar niet komen. Deze problemen beperken zich niet tot Nederland, maar strekken zich uit over heel Europa. Het hoger onderwijs in Europa raakt achterop ten opzichte van dat in de USA en Canada (NRC Handelsblad van 21 april jl.). In de laatste twee landen wordt meer dan 2.5% van de nationale produktie uitgegeven aan hoger onderwijs, in de 25 landen van de Europese Unie is die uitgave 1.1%. Om op peil te blijven met de Amerikaanse investeringen zou Europa jaarlijks 150 miljard euro extra moeten steken in het hoger onderwijs, aldus Jan Figel, de Slowaakse Europees Commissaris voor Onderwijs.

De initiatieven die in Wageningen worden ontwikkeld om de bio-nanotechnologie van de grond te tillen passen naadloos in het strategisch onderzoek van het MSC. Er zijn heel veel raakvlakken tussen nanotechnologie en biologische wetenschappen. De functionele eenheden van biologische systemen (eiwitten, nucleïnezuren, membranen, etc.) bestaan immers uit componenten op nanoschaal. Motoreiwitten in het bijzonder verschaffen inspiratie voor het maken van synthetische nano-motoren. Ik heb uitgebreid beschreven hoe wij de FRET-methode gebruiken als een nanometer meetlat. We doen heel graag mee met BioNT, het Wageningse Centrum voor Toepassingen van Nanotechnologie in Voeding, en het landelijke NanoNed. Het is heel goed mogelijk dat we straks de naam 'MicroSpectroscopie Centrum' moeten veranderen in 'NanoSpectroscopie Centrum'.

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren, ik wil graag deze rede afronden met woorden van dank. In de herfst van mijn academische loopbaan realiseer ik mij dat het onmogelijk is om iedereen te noemen aan wie ik dank verschuldigd ben. Dat zou nog eens 45 minuten vergen. Ik wil mij daarom grotendeels beperken tot diegenen met wie ik de laatste 5 jaren heb samengewerkt.

Ik dank de Raad van Bestuur van Wageningen Universiteit voor het in mij gestelde vertrouwen.

Ik wil mijn Wageningse collega-professoren die het MicroSpectroscopie Centrum een warm hart toedragen bedanken voor hun steun en plezierige samenwerking: Ton Bisseling, AnneMie Emons, Herbert van Amerongen en Sacco de Vries. Ton, ik heb grote waardering voor jouw enthousiaste ondersteuning van het MSC. Je bent een grote stimulans voor het MSC. Je was medeindiener van de NWO-Groot aanvraag. Wij van het MSC zijn steeds bereid om nog eens een graduate course voor de onderzoeksschool Experimentele Plantenwetenschappen te organiseren. AnneMie, we werken heel goed samen in het onderwijs via het populaire praktikum CBAIT. We hebben uitgebreid gediscussieerd over de bi-lokatie van het MSC en hoe dat in de toekomst moet wanneer de grote verhuizing op handen is. Ik heb nog steeds grote interesse om gezamenlijk onderzoek te doen met jouw nieuwe optical tweezers opstelling. Herbert, wij hebben dezelfde puur spectroscopische achtergrond. Het is goed te weten dat onze FLIM opstelling interessante resultaten oplevert voor jouw fotosynthese onderzoek. Ik hoop dat je kunt bijdragen aan de promotie van het MSC met toekomstige investeringsaanvragen. Sacco, er is veel veranderd in positieve zin sinds jij leerstoelhouder

Biochemie bent geworden. Je bent een groot supporter van het MSC. Jouw AIO's en postdocs maken dankbaar gebruik van de MSC faciliteiten en doen mee met onze MSC werkbeprekingen. Dat is een goede kruisbestuiving. Ik hoop op voortzetting van de constructieve samenwerking met jullie allen.

Ik ben mijn VU-collega's van het departement Structurele Biologie, Faculteit Aard en Levenswetenschappen van de Vrije Universiteit zeer erkentelijk: Ruud Kraayenhof (nu emeritus) en Holger Lill. Ik beschouw mijn wekelijkse tocht sinds 1 januari 2000 naar de VU als een welkome afwisseling. Mijn VU-leeropdracht is dezelfde als de WU-leeropdracht als 'biochemie' wordt vervangen door 'biologie'. Dat maakt het niet altijd eenvoudig om Wageningse taken in te wisselen voor VU-taken. Ik ben er van overtuigd dat mijn VU-periode eindelijk rendement gaat opbrengen dankzij verworven externe projecten. Mijn VU-benoeming zou best eens een WU-benoeming bespoedigd kunnen hebben.

Ik wil al mijn collega's binnen en buiten Wageningen bedanken voor de vruchtbare samenwerking.

Ik ben zeer erkentelijk voor de inspanningen van ex-promovendi, promovendi en postdocs die onder mijn supervisie stonden en staan. De goede wetenschappelijke reputatie van het MicroSpectroscopie Centrum is gevormd door hun intellectuele inspanningen en noeste arbeid. Zonder afbreuk te doen aan de inspanningen van de vorige generatie wil ik eigenlijk alleen de generatie van na 2000 noemen: Petra van den Berg, Mark Hink, Maarten Engel, Ruchira, Niek Kunst, Sergey Laptenok, Andrey Matorin, Helena Koudriachova, Rodrigo Almeida.

En dan de mensen die rechtstreeks betrokken zijn bij het reilen en zeilen van het huidige MSC.

Laura Ausma voor het nauwgezette financiële beheer en administratie.

Adrie Westphal voor zijn heel brede expertise in de moleculaire biologie, biochemie, 'molecular modelling' en spectroscopie.

Boudewijn van Veen voor zijn belangrijke microscoopcontacten met de 'plant' leerstoelgroepen, 'image processing' en algemene computerondersteuning.

Arie van Hoek voor zijn uitstekende vakmanschap op het gebied van de electro-optica, essentieel voor het omgaan met complexe opstellingen. Arie, we kennen elkaar al een 'lifetime' en hebben veel meegemaakt, te veel om hier te vertellen. Ik heb er bewondering voor hoe je het principe van laserwerking aan studenten kunt uitleggen. Jouw bijdrage is van zo'n groot belang, dat het MSC terecht een expertisecentrum is.

Mark Hink voor zijn brede kennis van zowel biologie, biochemie en biofysica. Mark, jij bent wereldwijd één van de grootste experts in fluorescentie fluctuatie spectroscopie. Vanwege jouw bescheidenheid zal je dat zelf nooit bekenen. Je helpt anderen met FFS experimenten. Je verricht een grote hoeveelheid onderwijs met een enthousiasme een universitair docent waardig. Je helpt met de organisatie van de FEBS cursussen. Kortom, je bent een MSC-motor. Ik wens jou veel succes met de Veni-aanvraag.

Jan Willem Borst voor zijn tomeloze inzet. Jan Willem, jij hebt jezelf ontwikkeld als een expert in microscopie en in het bijzonder FLIM. Jij bent de contactpersoon en vraagbaak voor alle gebruikers van het MSC. Je hebt bijna een dagtaak aan het begeleiden van bezoekers die experimenten komen doen. Ook jij was sterk betrokken bij de organisatie van FEBS cursussen, Ik heb jouw wetenschappelijke ontwikkeling van

nabij mogen meemaken gedurende de laatste 10 jaar. Je wordt tegenwoordig als spreker uitgenodigd voor EMBO cursussen. Ik hoop dat je in 2006 dr. J.W. Borst zal zijn.

Ik ben blij dat mijn vader hier in goede gezondheid aanwezig kan zijn.

'Last but not least' wil ik mijn vrouw Nina bedanken. Lieve Nina, jij bent het rustpunt in mijn leven, mijn steun en toeverlaat. Je hebt zelf een wetenschappelijke achtergrond, maar andere zaken dan wetenschap zijn voor jou en mij minstens zo belangrijk. Jij zorgt voor de goede balans tussen de verschillende zaken. Wat ben ik blij je voor het eerst ontmoet te hebben in november 1990 op het besneeuwde vliegveld van Moskou, waarna je mij per trein begeleidde naar Kiev en Minsk. Ik beloof je dat we eindelijk naar Venetië zullen gaan.

Ik dank u allen voor de aandacht.

Ik heb gezegd

Referenties

Amos, B. Lessons from the history of light microscopy. *Nature Cell Biology* 2, E151-E152 (2000).

Bastiaens, P.I.H., A. van Hoek, W.F. Wolkers, J.C. Brochon & A.J.W.G. Visser. Comparison of the dynamical structures of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase by time-resolved polarized flavin fluorescence. *Biochemistry* 31, 7050-7060 (1992).

Berberan-Santos, M.N. Pioneering contributions of Jean and Francis Perrin to molecular luminescence. In: *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*, B. Valeur & J.-C. Brochon (Eds.), pp. 7-33, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2001.

Bryson, B. A short history of nearly everything. Doubleday, London, 2003.

Chen, Y. Analysis and applications of fluorescence fluctuation spectroscopy. Ph.D. thesis University of Illinois at Urbana-Champaign, 1999.

Clegg, R.M. The vital contributions of Perrin and Förster. *Biophotonics International* 11, no. 9, 42-45, September 2004.

Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 2, 55-75 (1948).

Hell, S.W. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology* 21, 1347-1355 (2003).

Hink, M.A. Fluorescence correlation spectroscopy applied to living plant cells. Ph.D. thesis Wageningen University, 2002.

Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd Ed., Chapter 1, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 1999.

- Perrin, F. La fluorescence des solutions. Induction moléculaire – Polarisation et durée d'émission – Photochimie. *Annales de Physique* (Paris) 12, 169-275 (1929).
- Svedberg, T. & K. Inouye. Eine neue Methode zur Prüfung der Gültigkeit des Boyle-Gay-Lussacschen Gesetzes für Kolloide Losungen. *Zeitschrift für physikalische Chemie* 77, 145-191 (1911).
- Tsien, R.Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67, 509-544 (1998).
- Valeur, B. Introduction: on the origin of the terms fluorescence, phosphorescence, and luminescence. In: *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*, B. Valeur & J.-C. Brochon (Eds.), pp. 3-6, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2001.
- Verkhusha, V.V. & K.A. Lukyanov. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature Biotechnology* 22, 289-296 (2004).
- Visser, A.J.W.G. & A. van Hoek. Fluorescentie polarisatie. *Natuur & Techniek* 55, 298-309 (1987).