

BIOFYSICA, WETENSCHAP VAN LEVEN EN DOOD

door prof.dr. Herbert van Amerongen



WAGENINGEN UNIVERSITEIT

WAGENINGEN UR

Inaugurale rede uitgesproken aan de Wageningen
Universiteit.

Biofysica, wetenschap van leven en dood

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren,

Biofysica is een fascinerende wetenschap. Het is een voor-spelbare uitspraak uit de mond van een hoogleraar Biofysica, maar wat is Biofysica nou precies? Letterlijk betekent het: natuurkunde van leven. Dat zal u niet veel helpen. Vijfenvertig minuten is te kort om de vraag uitputtend te beantwoorden; wel verwacht ik een redelijk beeld te kunnen schetsen van het onderzoek waar ons Laboratorium voor Biofysica zich mee bezighoudt, nu en in de nabije toekomst.

Er zijn diverse omschrijvingen in omloop voor het begrip Biofysica. Toen ik enige tijd geleden naar deze positie solliciteerde stond er in de profielschets: "Een nauwkeurige omschrijving van wat 'biofysica' wel en wat het niet is, is moeilijk te geven. Als grootste gemene deler wordt vaak genoemd de toepassing van moderne natuurkundige meetmethoden in de biologie, en met name geavanceerde spectroscopie." Deze karakterisering was op dat moment zonder meer bruikbaar voor het departement voor voedsel en agrotechnologie, waar Biofysica deel van uit maakt. De achterliggende gedachte is natuurlijk dat fysische technieken die gebruikt kunnen worden voor onderzoek in de biologie ook gebruikt kunnen worden voor de bestudering van voedsel. Een begrijpelijke gedachte die ook nog eens wordt ondersteund door het feit dat er sinds kort een tijdschrift bestaat onder de naam Food Biophysics en Prof. Dane Bicanic uit onze leerstoelgroep heeft zitting in de "editorial board". Hij onderzoekt o.a. voedsel met foto-thermische en foto-akoestische experimenten en hij heeft een methode ontwik-

keld om razendsnel de volgende zaken te bepalen: i) het lycopeengehalte in tomatenproducten (zoals tomatensap, -ketchup en -puree), ii) de concentratie van β -caroteen in margarine en iii) de hoeveelheid fenolische componenten in sorghum. Hij ontwikkelt momenteel een methode om de lage concentratie provitamine A constituenten in meelsoorten direct te meten (zonder noodzaak voor tijdrovende extractie). Het laatste kan interessant zijn voor de gezondheid in derde-wereld landen, de eerste twee zaken zijn interessanter voor de industrie.

Daarnaast wordt onder aanvoering van collega Dr. Henk Van As, tevens wetenschappelijk directeur van het Wageningen NMR Centrum, met geavanceerde MRI methodes onderzoek gedaan aan voedsel. Samen met Unilever wordt watermigratie in crackers onderzocht (in relatie tot houdbaarheid en knapperigheid) en het koken van rijst (in relatie tot de preprocessing daarvan). Het rijpen van kaas wordt onderzocht onder het toezicht van de grote spelers op dit gebied: Friesland Foods, Campina, Bell en DOC. Samengevat zou je kunnen zeggen dat met MRI de relatie onderzocht wordt tussen compositie, structuur en transportverschijnselen in voedsel maar ook in planten.



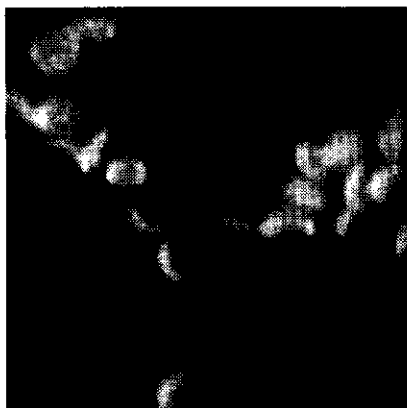
Met behulp van MRI metingen kan de watermigratie in kokende rijst van minuut tot minuut in kaart gebracht worden.

Maar Biofysica is veel meer dan alleen "Food Biophysics". De Biofysica probeert biologische processen te begrijpen in

termen van de onderliggende natuurkunde. Dat is wat mij vooral boeit. De fysische principes waarmee de dode natuur beschreven kan worden, kunnen ook gebruikt worden om de levende natuur te begrijpen.

Ter introductie van ons onderzoek verwijderen we ons een stukje van de aarde om onze planeet op afstand te overzien. Dit kunststukje is een mooi voorbeeld van waar de natuurkunde ons gebracht heeft. Als we satellietopnames van onze aarde vergelijken met die van andere hemellichamen, valt met name de groene kleur op die zo belangrijk is voor het leven op aarde: dat brengt ons al direct bij de "bio"-kant van mijn verhaal. De kleur is afkomstig van planten en algen en ze is kenmerkend voor het fotosyntheseproces dat zonne-energie gebruikt om het leven op aarde mogelijk te maken. Meer dan 99% van alle energie die op aarde gebruikt wordt is direct of indirect afkomstig van deze fotosynthese. Mijn onderzoek houdt zich voor een belangrijk deel bezig met de fysische aspecten van dit proces. Daarnaast wordt in onze groep onderzoek verricht naar de water- en sapstromen in planten en bomen die door de fotosynthese worden veroorzaakt.

Laten we eens doen wat we vaak doen met wetenschappelijk onderzoek, we gaan inzoomen en we zien en passant ons Laboratorium voor Biofysica en komen in ons MicroSpectroscopie Centrum. We gaan maar gelijk door met inzoomen, maar nu fors en we dringen een plant binnen.



Inzoomen in een spinazieblad leidt tot deze foto waarin vele chloroplasten zichtbaar zijn. Een chloroplast heeft de vorm van een poffertje met een diameter van slechts enkele micrometers.

We “zien” de contouren van enkele plantencellen met afmetingen van ongeveer 100 μm en tegen de wand liggen de bladgroenkorrels geplakt. Deze afbeelding is gemaakt in het MicroSpectroscopie Centrum van onze universiteit. Het lijkt een normaal microscopieplaatje maar het is gemaakt met een zeer speciale microscoop, de FLIM (fluorescence liferime imaging microscopy) opstelling, waarmee het ook mogelijk is om processen waar te nemen die zich afspelen op een picoseconde tijdschaal (een picoseconde betekent letterlijk een kleine seconde; om precies te zijn 0.000000000001, ofwel 10^{-12} seconde).

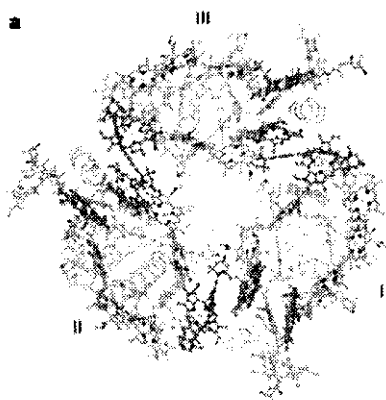
De bladgroenkorrels worden ook wel chloroplasten genoemd, ze hebben een diameter van enkele micrometers en hierin speelt de fotosynthese zich af. U ziet ook een detailopname van een chloroplast die gemaakt is met een elektronen-microscoop.



Elektronenmicroscopie opname van een chloroplast. Het thylakoïde membraan ligt opgevouwen in de chloroplast en is verdeeld in gestapelde structuren waarin fotosysteem II zich bevindt (de grana) en ongestapelde structuren waarin fotosysteem I zich bevindt (stroma lamellae).

Het thylakoïde-membraan is keurig opgevouwen in de chloroplast en heeft in feite een oppervlak dat 300 tot 1000 maal groter is dan dat van de chloroplast zelf. In zijn afscheidrede in 2002 in deze zelfde aula vergeleek professor Wim Vredenberg het thylakoïde membraan met een grote vuilniszak die in elkaar gefrommeld in een klein doorzichtig boterhamzakje zit [1]. Bij een zo groot oppervlak in een dergelijk klein volume moet de dikte van het membraan dus wel heel gering zijn en dat betekent dat we heel ver in moeten zoomen om ook de kleinste details te zien. Zelfs met een elektronen-microscoop lukt dat niet. Toch kunnen die structuren in principe opgehelderd worden. In de volgende figuur ziet u de structuur van een belangrijk eiwit uit het thylakoïde membraan, het zogenaamde LHCI (Light-

Harvesting Complex II). In feite is LHCII het meest voorkomende membraaneiwit op aarde en zoals u eerder al zag is het zelfs vanuit de ruimte te "zien". Evenals het membraan is LHCII slechts enkele nanometers dik (een nanometer is een duizendste micrometer).



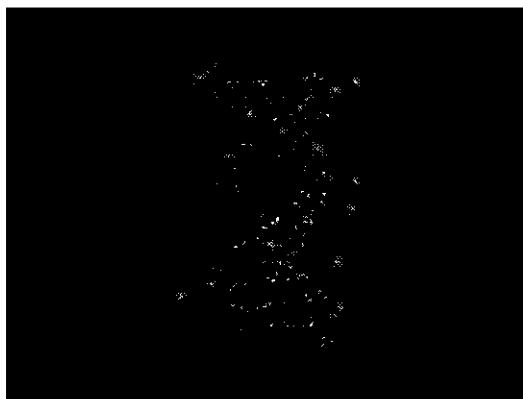
Bovenaanzicht (loodrecht op het membraan) van LHCII (een trimeer bestaande uit 3 identieke eenheden). Diameter is ongeveer 10 nanometer.

De structuur van LHCII is bepaald met röntgendiffractie [2], de techniek die meestal wordt gebruikt om eiwit-structuren op te helderen. Voor eiwitten die oplosbaar zijn in water is dat tegenwoordig relatief eenvoudig. Maar voor eiwitten zoals LHCII die zich in de (vetachtige) membranen bevinden, is dat nog altijd een tour de force en meestal (nog) niet mogelijk. Binnen onze leerstoelgroep worden momenteel alternatieve methodes ontwikkeld om de structuur van membraaneiwitten op te helderen. Collega Dr. Marcus Hemminga is hier aanvankelijk mee begonnen en

op het ogenblik zijn we bezig om de structuur te bestuderen van het CP29, een eiwit dat verwant is aan LHCII. Daartoe veranderen we het eiwit met moleculair-biologische technieken, we plakken "markers" oftewel "labels" op goed gedefinieerde plaatsen in het eiwit en vervolgens bepalen we met diverse spectroscopische technieken de afstanden tussen de labels. Hieruit willen we dan uiteindelijk de structuur van het eiwit afleiden. Daarnaast nemen we bewegingen waar, die zich afspelen in het eiwit.

Laten we even teruggaan naar de definitie van Biofysica en de onduidelijkheid die daarover bestaat. Volgens de definitie van de British Biophysical Society is Biofysica een interdisciplinaire wetenschap die fysische technieken toepast voor het begrijpen van biologische structuur en functie. Deze definitie is wat specifiekker dan degene die in de profiëlschets stond. Ze past heel goed binnen de historie van het Britse Biofysisch onderzoek, dat in de beginjaren van de huidige Biofysica (vijftig tot zestig jaar geleden) toonaangevend is geweest in de wereld. Dit onderzoek kreeg een enorme "push" na het uitkomen van een boek van Erwin Schrödinger. Schrödinger was een zeer vooraanstaand fysicus die in belangrijke mate heeft bijgedragen aan de ontwikkeling van de quantummechanica, waarvoor hij in 1933 de Nobelprijs had gekregen. Het boek dat in 1944 verscheen had als titel "What is life?" Schrödinger benadrukte het feit dat zowel dode als levende materie aan dezelfde natuurkundige en scheikundige wetten moet voldoen. Het bracht veel onderzoekers er toe om de structuur van biologische moleculen te bestuderen met fysische technieken, met name met röntgendiffractie [3]. Het meest aansprekende voorbeeld van deze onderzoeksinspanningen is de opheldering geweest van de moleculaire structuur van

DNA door Watson en Crick op basis van de experimentele resultaten van Rosalind Franklin. Zowel Watson als Crick waren geïnspireerd door het boek van Schrödinger.



Structuur van een stukje dubbelstrengs DNA met karakteristieke wenteltrap-structuur. De weergegeven lengte is ongeveer 4 nanometer. De bolletjes representeren tweewaardige ionen in de omgeving.

In dit geval was het ophelderen van de structuur cruciaal voor het begrijpen van het functioneren van DNA. Het liet zien hoe erfelijke informatie stabiel kan worden opgeslagen en kan worden doorgegeven van generatie op generatie. Maar een structuur op zich zegt in het algemeen niet zoveel. Ik kan u de structuur van LHCII nog een keer laten zien vanuit allerlei invalshoeken en u kunt er dagen en jaren naar kijken, maar u zult er nagenoeg niets uit kunnen concluderen. We hebben veel meer kennis nodig om iets te doen met een dergelijke structuur. In het geval van Watson en Crick was er al ontzettend veel onderzoek gedaan op het gebied van erfelijkheid en DNA. Alleen de puzzelstukjes

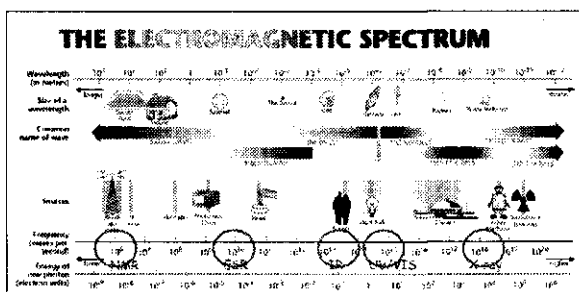
moesten nog in elkaar gepast worden en de structuurgegevens waren daarbij cruciaal; een plaatje is nu eenmaal evenveel waard als duizend woorden.

Echter, een structuur is statisch terwijl de levende natuur om ons heen uitermate dynamisch is. Hetzelfde geldt voor een DNA molecuul. Als een plaatje al zoveel waard is, wat moeten we dan denken van een filmpje. De natuurkunde leert ons dat ook een DNA molecuul niet statisch kan zijn. Biomoleculen hebben vaak een diameter van enkele nanometers (10^{-9} m) en de wereld op een nanometer schaal is een heftige wereld waar tegelijkertijd vele gigantische krachten in alle hevigheid op de moleculen inwerken. Gebaseerd op de wetten van Newton en op basis van andere fysische kennis kunnen we m.b.v. zogenaamde M(oleculaire) D(ynamica) berekeningen kijken welke gevolgen deze krachten hebben voor de structuur. De volgende "animatie" laat zien dat de statische wenteltrapstructuur van DNA drastisch vervormd wordt in deze gewelddadige wereld op een tijdschaal die ons voorstellingsvermogen te boven gaat. In feite is dit "filmpje" meer dan een miljard maal vertraagd en vinden de bewegingen plaats op een picoseconde tijdschaal.

Ik zei u al dat deze MD berekeningen slechts een benadering geven, maar voor een gedetailleerd begrip van allerlei processen is het nodig om een realistische animatie te maken. Daarvoor moeten we deze dynamica bestuderen met picoseconde technieken. Op dit moment wil ik een kleine maar in mijn ogen essentiële uitbreiding maken van de definitie van de British Biophysical Society: Biofysica is de wetenschap die theorieën en methoden uit de fysische wetenschap toepast voor de bestudering van biologische structuur, *dynamica* en functie. Dynamica is essentieel voor bio-

logische processen en ze vormt een belangrijk onderwerp van ons Biofysisch onderzoek.

Ook binnen onze groep worden MD berekeningen uitgevoerd, maar je kunt rekenen wat je wilt, op de één of andere manier moet geverifieerd worden of hetgeen je berekent ook overeenkomt met de werkelijkheid, m.a.w. er moeten ook experimenten gedaan worden. Onze Biofysica groep is in feite een experimentele groep en we gebruiken een scala aan experimentele technieken om onze biologische objecten en preparaten te bestuderen. Dat zijn voornamelijk spectroscopische technieken die gebruik maken van allerlei vormen van elektromagnetische (EM) straling. Het belangrijkste voorbeeld van EM straling is zichtbaar licht, maar daarnaast kent u allen ook andere vormen van EM straling zoals radiostraling, "magnetron"-straling, infrarood en ultraviolet (UV) straling, röntgenstraling, straling van mobiele telefoons, etc.



De spectroscopische technieken die bij Biofysica worden toegepast maken gebruik van verschillende gebieden uit het totale elektromagnetische spectrum.

Deze straling bestaat in feite uit een stroom van golvende energiepakketjes, fotonen genaamd, die zich voortspoeden met de lichtsnelheid. Deze snelheid bedraagt 300.000 km per seconde. Ter illustratie: ondanks de enorme afstand (150 miljoen km) tussen de zon en de aarde bereikt het zonlicht ons in ca. 8.5 minuten. Een andere illustratie: in 1 picoseconde legt licht maar 300 μm af. Bij zogenaamde pump-probe metingen die ik zo zal toelichten is dit laatste punt belangrijk.

De zich voortspoedende fotonen golven tegelijkertijd ook nog eens razendsnel op en neer met een bepaalde frequentie. De frequentie verschilt bijvoorbeeld voor radiostraling en licht. Hoe frequenter het foton op en neer beweegt, hoe dichter de golfjes op elkaar gedrukt zijn dus hoe korter de golflengte. Rood licht heeft een andere golflengte dan groen licht. Een rood foton heeft een golflengte van 600 nm, een groen foton heeft een golflengte van 500 nm en het trilt per seconde 600.000 miljard keer op en neer: de frequentie is 600.000 miljard Hertz (Hz). Hoe sneller een foton trilt, hoe meer energie het bevat. UV-fotonen hebben bijvoorbeeld veel meer energie dan fotonen in het zichtbare gebied.

Fotonen kunnen geabsorbeerd worden door materie, in feite door de bouwstenen waaruit die materie is opgebouwd, de moleculen. De wereld om ons heen is heel kleurrijk omdat ze is opgebouwd uit moleculen die allemaal hun eigen absorptiespectrum hebben, d.w.z. ze absorberen selectief bepaalde kleuren wel en andere kleuren niet.

Het zonlicht bestaat uit een spectrum van kleuren en m.u.v. het groene licht worden al die kleuren door de chlorofylmoleculen in bladgroenkorrels geabsorbeerd. Bloemen hebben hun eigen kleur omdat de carotenoïde moleculen hun eigen karakteristieke absorptiespectrum hebben. Andere

moleculen zoals DNA, absorberen geen zichtbaar - maar UV licht, dat zoveel energie heeft dat het gemakkelijk schade kan veroorzaken. Elk soort molecuul heeft zijn eigen karakteristieke absorptiespectrum.

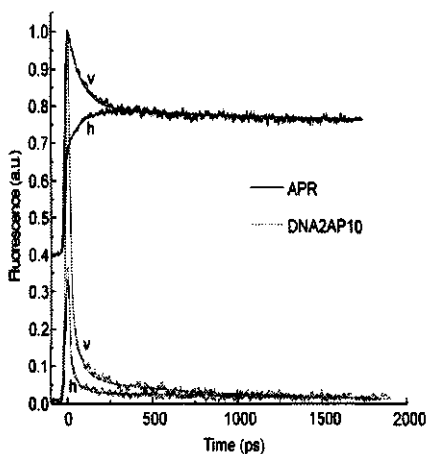
Ik heb het vooral gehad over absorptie van zichtbaar licht maar absorptie treedt op bij heel uiteenlopende frequenties van de EM-straling. Bij NMR (of MRI) hebben we te maken met frequenties van honderden mega(miljoen)hertz (MHz) en bij ESR, een andere techniek die we gebruiken zitten we in het gebied rond de 10 giga(miljard)hertz (GHz). Ook hier geldt weer: alle moleculen hebben hun eigen absorptiespectrum, waardoor ze selectief kunnen worden bestudeerd. NMR en ESR zijn ook geschikt om dynamica te bestuderen maar het voert te ver om daar nu op in te gaan. Ik ga terug naar het UV en het zichtbare gebied, naar de optische spectroscopie.

Wat gebeurt er bij de absorptie van een foton door een molecuul? Het molecuul wordt door het foton geëxciteerd, het komt in een zogenaamde aangeslagen toestand en voor een tijdje bezit het nu de extra energie die voorheen in het foton zat: de energie is geabsorbeerd. In het geval van DNA wordt die energie binnen een picoseconde omgezet in onschadelijke warmte en dat is maar goed ook want binnen die korte tijd is de kans heel klein dat ons erfelijk materiaal wordt beschadigd. Bij de chlorofylmoleculen in de fotosynthese is de levensduur van de aangeslagen toestand duizenden malen langer, enkele nanoseconden, en ook dit is "maar goed ook" want dat geeft de plant voldoende tijd om de geabsorbeerde energie nuttig te gebruiken.

Moleculen in de aangeslagen toestand kunnen ook iets an-

ders doen met die extra energie. Ze kunnen een deel van de energie weer uitzenden in de vorm van licht. Dit verschijnsel wordt fluorescentie genoemd. En net zoals alle moleculen hun eigen absorptiespectrum hebben, hebben ze ook hun eigen karakteristieke fluorescentiespectrum. Alle moleculen fluoresceren, maar de hoeveelheid fluorescentie kan sterk variëren. In het geval van DNA wordt de energie zo snel omgezet in warmte dat er nauwelijks tijd is om fluorescentie uit te zenden. Om DNA toch te bestuderen met fluorescentietechnieken, bouwen we fluorescente label moleculen in, die de structuur van het DNA zo weinig mogelijk verstoren.

De afgelopen jaren hebben we met financiële steun van de Stichting voor Fundamenteel Onderzoek der Materie (FOM) een prachtige fluorescentieopstelling gebouwd die niet alleen het fluorescentiespectrum kan meten maar dat ook nog eens doet met een tijdsresolutie van enkele picoseconden. Met behulp van een extreem korte laserflits (van honderd femtoseconden) brengen we een aantal moleculen in de aangeslagen toestand en vervolgens meten we hoe het fluorescentiespectrum verandert. Die veranderingen kunnen optreden op een tijdschaal van picoseconden tot nanoseconden. Ze verschaffen ons informatie over de allersnelste dynamica. Voor het gelabelde DNA kunnen we allerlei verschillende levensduren waarnemen.



De gepolariseerde fluorescentie van het label 2-aminopurine (gemodificeerde adenine) verschilt sterk wanneer het niet (bovenste 2 curves) en wel (onderste 2 curves) in DNA is ingebouwd. De fluorescentie wordt met verschillende polarisatierichtingen (v en h) gedetecteerd. De metingen verschaffen informatie over dynamica in het DNA molecuul [4].

Het feit dat er meerdere levensduren zijn, laat onmiddellijk zien dat het DNA niet in één specifieke structuur voorkomt maar dat het ene molecuul een wat andere structuur heeft dan het andere. Dat is precies wat we ook verwachten op grond van het animatiefilmpje dat ik u eerder heb laten zien. Niet alleen zien we dat er verschillende structuren voorkomen maar soms kunnen we ook zien hoe snel de ene structuur overgaat in de andere. Daarvoor gebruiken we gepolariseerde fluorescentiemetingen.

De picoseconde fluorescentie techniek is ook uitermate ge-

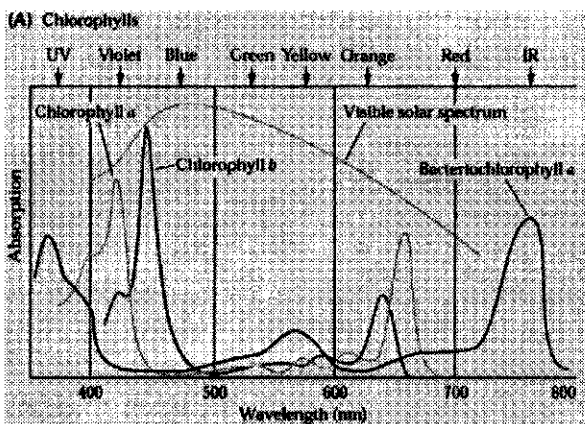
schikt om bepaalde aspecten van het fotosyntheseproces te bestuderen. Maar voordat ik daar verder op in zal gaan moet ik u eerst iets vertellen over de fotosynthese.

In het fotosynthese proces zetten planten CO_2 uit de lucht en water uit de bodem om in energierijke moleculen zoals suikers en zetmeel en in een belangrijk "afvalproduct": zuurstof. Dit (synthese) proces vereist energie en die wordt geleverd door het zonlicht (foto). Het hele proces bestaat uit talloze stappen en vereist vele verschillende eiwitten. Simpel gezegd gebeurt er het volgende. In een gespecialiseerd conglomeraat van eiwitten, het zogenaamde reactiecentrum (RC), wordt een heel specifiek chlorofyl molecuul in de aangeslagen toestand gebracht door de absorptie van een foton. Vervolgens wordt de verworven energie gebruikt om een negatief geladen elektron uit dit pigment molecuul aan een buurmanpigment te geven (ofwel er treedt ladingscheiding op). Dit leidt vervolgens tot een cascade van stappen waarbij elektronen en protonen doorgegeven worden. Er gaat als het ware een elektrisch stroompje lopen door het eiwit. Je zou het membraan waarin deze eiwitten zitten, kunnen zien als een batterij die opgeladen wordt. De opgeslagen energie wordt gebruikt om energierijke brandstofmoleculen te maken. Die worden vervolgens weer gebruikt om de plant te laten leven; en om allerlei andere moleculen te bouwen, zoals suiker en zetmeel. Het reactiecentrum vormt het hart van de fotosynthese. In planten zitten twee verschillende reactiecentra, die terug te vinden zijn in fotosysteem I en fotosysteem II. Ik zal me beperken tot fotosysteem II waaraan ik het meeste onderzoek heb verricht.

Het reactiecentrum van fotosysteem II bevat slechts enkele pigmenten en in normaal zonlicht kunnen er slechts een

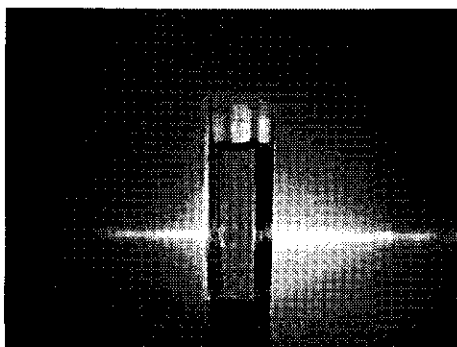
tiental fotonen per seconde geabsorbeerd worden die leiden tot de productie van chemische energie. Om het proces efficiënter te laten verlopen wordt het reactiecentrum omgeven door zogenaamde light-harvesting (lichtoogstende) eiwitten die samen honderden pigmenten bevatten. Deze pigment-eiwit-complexen hebben voornamelijk tot doel zonlicht te absorberen en de bijbehorende energie door te geven naar het reactiecentrum waar ze gebruikt kan worden. De light-harvesting complexen verhogen dus de efficiëntie van de fotosynthese en ze fungeren als een antennesysteem.

Het sleutelwoord bij deze processen is snelheid. Een fotosynthetisch pigment (chlorofyl) verkeert normaal gesproken slechts enkele nanoseconden in de aangeslagen toestand voordat het zijn energie weer kwijtraakt in de vorm van warmte of fluorescentielicht. M.a.w. nadat een foton geabsorbeerd is moet de energie veel sneller dan een nanoseconde doorgegeven worden naar het reactiecentrum om een hoog rendement te verzekeren. In het verleden heb ik aan de Vrije Universiteit te Amsterdam in de Biofysica groep van Prof. Rienk van Grondelle veel onderzoek verricht naar dit energie overdrachtsproces in LHCII. LHCII bevat verschillende soorten pigmenten, chlorofyl (Chl) *a*, Chl *b* en diverse carotenoïden, allen met hun eigen absorptiespectrum.



Het zonnenspectrum dat het aardoppervlak bereikt, wordt opgevangen door verschillende soorten chlorofylmoleculen met hun eigen karakteristieke absorptiespectrum.

We hebben het proces van energie-overdracht bestudeerd met behulp van ultrasnelle "pump-probe" experimenten. Een dergelijk experiment werkt als volgt. We schieten een korte laserflits (100 fs) van een bepaalde kleur op een glazen cuvet, dat een oplossing van LHCII bevat. Deze laserflits imiteert als het ware de zon en brengt één van de pigmenten in LHCII in de aangeslagen toestand. Door de kleur van de laser in te stellen kunnen we naar keuze Chl *a* of Chl *b* exciteren.



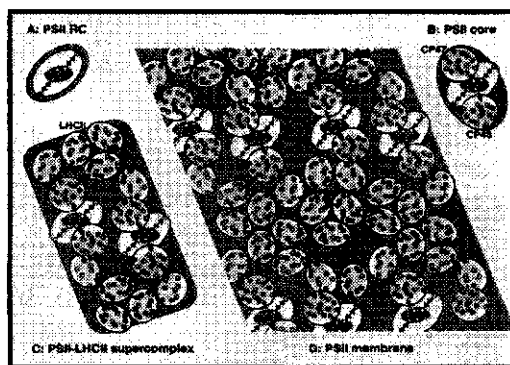
Veel metingen worden verricht in een glazen cuvet waarin fotosynthetische eiwitten zijn opgelost. Vervolgens schieten we vanaf de zijkant met een laserflits op het cuvet en kijken hoeveel licht er doorgelaten wordt (absorptie) of weer uitgezonden wordt (fluorescentie).

Vervolgens bepalen we met een tweede korte lichtpuls, die alle kleuren van de regenboog bevat, hoe het absorptiespectrum van ons preparaat er uit ziet nadat we een Chl *a* of Chl *b* molecuul geëxciteerd hebben. Deze tweede lichtpuls laten we iets later bij het preparaat arriveren door hem een kleine omweg te laten maken op weg naar het preparaat. Een omweg van 300 μm betekent immers dat hij 1 ps later arriveert. De grootte van de omweg kunnen we variëren en zo zijn we in staat om te bepalen hoe het absorptiespectrum van LHCII verandert gedurende de eerste picoseconden na absorptie van een foton. We hebben de spectroscopie en dynamica van LHCII op vele manieren bestudeerd en ik wil hier volstaan met de conclusie dat de overdracht in LHCII beduidend langzamer is dan algemeen gedacht werd/wordt [5, 6, 7]. Samen met Prof. Vladimir Novoderezhkin hebben we de bijbehorende overdracht van excitatie-energie kunnen vertalen in een filmpje. Dit filmpje laat zien dat het totale overdrachtsproces in

LHCII tientallen picoseconden in beslag neemt.

We weten in groot detail hoe de excitatie-energie in LHCII doorgegeven wordt. De volgende stap is nu om te kijken hoe de overdracht in fotosysteem II in intacte membranen plaatsvindt. In het verleden is hier al veel onderzoek naar verricht en algemeen werd en wordt aangenomen dat de excitatie energie in ongeveer 10 ps in het reactiecentrum belandt. Maar op grond van onze metingen aan LHCII zou dat wel eens beduidend langzamer kunnen zijn.

Enkele jaren geleden hebben wetenschappers laten zien hoe fotosysteem II georganiseerd is en dat is samengevat in bijgaande figuur.



De organisatie van fotosysteem II (PSII) rond het reactiecentrum (RC) is schematisch in beeld gebracht in dit bovenaanzicht op het membraan. Het RC (A) vormt met de antenne-eiwitten CP43 en CP47 de zogenaamde "core" (B), die wordt omringd door een zee van LHCII moleculen (C en D) en enkele vergelijkbare eiwitten [8].

Met behulp van picoseconde fluorescentie metingen hebben we onlangs in ons laboratorium metingen verricht aan intacte fotosysteem II preparaten. De gemeten levensduur van de fluorescentie is een maat voor de tijd die er nodig is na absorptie van een foton om een ladingsscheiding te creëren in het reactiecentrum. We hebben nu inderdaad aan kunnen tonen dat de tijd die de geabsorbeerde energie nodig heeft om het RC te bereiken aanzienlijk langer is dan veelal gedacht [9]. Dit is o.a. belangrijk voor het mechanisme waarmee planten zich beschermen tegen een overdosis aan zonlicht.

Een andere parameter die de fluorescentielevensduur bepaalt in de fotosynthese is de snelheid waarmee de ladingsscheiding zelf plaatsvindt en het energieverlies dat daarbij optreedt. In overeenstemming met eerdere metingen hebben we gevonden dat deze ladingsscheiding slechts enkele picoseconden in beslag neemt maar het lijkt er op dat er bij dit proces meer energieverlies optreedt dan tot nu toe gedacht werd [9].

De hoeveelheid energieverlies bij ladingsscheiding in combinatie met de snelheid van ladingsscheiding is van groot belang voor de totale efficiëntie van het proces. Als het energieverlies klein is dan kunnen de overgedragen elektronen weer teruggegeven worden aan de oorspronkelijke elektrondonor en kan de energie vervolgens in zijn geheel verloren gaan, bijvoorbeeld als warmte of als fluorescentie. Enerzijds moet deze terugreactie voorkomen worden door wat energie op te offeren en deze reactie irreversibel te maken, anderzijds mag dit energieverlies niet te groot zijn anders houden we niet genoeg energie over.

Het reactiecentrum bevat een keten van moleculen waarlangs het elektronentransport optreedt. Elke stap gaat gepaard met wat energieverlies maar het verlengt ook de periode waarbinnen iets nuttigs gedaan kan worden met de energie, voordat ze verloren gaat. Hetzelfde principe geldt voor alle daaropvolgende chemische en biologische processen: er gaat steeds weer iets energie verloren maar de periode waarbinnen de benodigde processen uitgevoerd kunnen worden, wordt verlengd. We willen begrijpen hoe de eerste stappen in de fotosynthese werken. Hoe langer je wacht met het gebruiken van de energie, hoe meer energie er verloren gaat. Wil je bijvoorbeeld efficiënt brandstoffen maken met de geabsorbeerde zonne-energie, dan moet je dat snel doen. Wacht je bijvoorbeeld tot de plant dood is om vervolgens m.b.v. de resterende biomassa brandstoffen te produceren, dan heb je ondertussen al behoorlijk wat energie verloren.

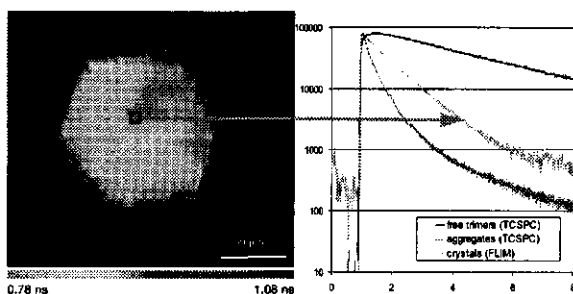
Één van onze plannen is om in meer detail naar de eerste stappen in de fotosynthese te kijken door gebruik te maken van preparaten uit gemuteerde planten, waarbij de organisatie en samenstelling van fotosysteem II veranderd is. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen we dan gebruiken bij de bestudering van intacte chloroplasten en intacte planten onder allerlei verschillende omstandigheden. We hebben een voorzichtig begin gemaakt om picoseconde fluorescentiemetingen te verrichten in bladeren m.b.v. de al eerder genoemde FLIM opstelling. De resultaten bieden goede hoop op een succesvol vervolg van dit onderzoek.

Er is nog één belangrijk en interessant aspect van ons fotosynthetisch onderzoek dat aandacht verdient en ik zal dat kort behandelen. Als er weinig zonlicht is dan probeert de

plant met zijn uitgebreide antennesysteem alle beschikbare fotonen te absorberen. Als de zon echter feller wordt dan kan het reactiecentrum alle fotonen niet meer verwerken en kan er schade aangericht worden. Er worden dan allerlei beschermingsmechanismen door de plant in werking gezet, kortweg NPQ genoemd (nonphotochemical quenching). Binnen enkele seconden wordt het eerste mechanisme ingeschakeld, het zgn. qE mechanisme, en de plant schakelt om naar een toestand waarin een belangrijk deel van de energie omgezet wordt in onschadelijke warmte. Deze omschakeling vindt plaats in het antennesysteem. We verrichten onderzoek naar de werking van dit proces. LHCII kan daarbij een belangrijke rol spelen. Preparaten van LHCII vertonen normaal gesproken een lange fluorescentielevensduur van 4 ns. Er is echter altijd een kleine fractie (ongeveer 5%) die een aanzienlijk kortere levensduur heeft. We hebben onlangs ontdekt met experimenten onder zeer hoge druk (4000 maal zo hoog als de druk van de atmosfeer) dat het hier geen verontreiniging betreft maar dat LHCII kan schakelen tussen een toestand waarin de energie lange tijd beschikbaar is en een toestand waarin de energie snel omgezet wordt in warmte [10]. Door de structuur van LHCII te reguleren zou de plant zichzelf dus kunnen beschermen.

Ik heb u al eerder de structuur van LHCII laten zien zoals die bepaald is met röntgendiffractie. Het is onmogelijk om op grond van deze structuur te zeggen in welke van de twee toestanden LHCII zich bevindt en dit toont eens te meer aan dat structuren een mooi hulpmiddel vormen maar op zich niet voldoende zijn om de werking van een eiwit te kunnen begrijpen. Samen met onderzoeksgroepen uit Frankrijk, Engeland en China hebben we vorig jaar laten zien dat deze structuur een korte levensduur heeft. Hierbij

waren onze experimenten aan LHCII kristallen met de FLIM microscoop van cruciaal belang



FLIM metingen aan LHCII kristallen laten zien dat de fluorescentielevensduur beduidend korter is dan wanneer LHCII is opgelost in detergens (free trimers) [11].

We zijn er trots op dat dit werk al kort na het begin van ons onderzoek heeft geleid tot een publicatie in Nature [11]. Er zijn nog talloze aspecten van NPQ te onderzoeken en daar zullen we in de toekomst mee verder gaan.

Één van de dingen die we recent ook gevonden hebben m.b.v. NMR experimenten, is dat er een reorganisatie optreedt van het thylakoïde membraan onder invloed van fel licht. Het is aantrekkelijk om te denken dat dit correspondeert met een structuurverandering in LHCII en met de schakeling tussen de twee bovengenoemde toestanden.

Wat is het belang van dit onderzoek? Allereerst zijn we ingebed in een universiteit en door studenten en promovendi in ons onderzoek te betrekken leiden we kritische onderzoekers op die in instituten, universiteiten en bedrijven aan

de slag kunnen. Het onderzoek is grotendeels fundamenteel van aard en we proberen te begrijpen hoe levensprocessen functioneren en we dragen bij aan de algemeen beschikbare kennis die anderen weer kunnen gebruiken voor toepassingen. Toepassingen laten vaak lange tijd op zich wachten maar iedereen weet dat fundamentele kennis in belangrijke mate heeft bijgedragen aan de talrijke technologische mogelijkheden die we tegenwoordig hebben en die continu worden vergroot. Fundamentele kennis is bijvoorbeeld ook belangrijk voor de energievoorziening in de toekomst.

De wereld heeft energie nodig. Tot nu toe is alle energie die gebruikt wordt, direct of indirect afkomstig van de zon. Maar de energievoorraden raken op en met de huidige trend zou er in het jaar 2050 wel eens heel weinig olie en gas over kunnen zijn; met steenkool kunnen we nog iets langer vooruit. Er worden vele voorspellingen gedaan over het energiegebruik in het jaar 2050 maar alle voorspellingen zijn het er over eens dat om aan de toenemende energiebehoefte te voldoen, het onvermijdelijk is dat we op nieuwe manieren energie produceren. Een treffende illustratie van de ernst van de zaak is de volgende. Willen we in 2050 aan de energiebehoefte voldoen m.b.v. kernenergie dan moeten we vanaf nu tot 2050 wereldwijd 2 nieuwe kerncentrales per dag bouwen [12]. Dit lijkt niet erg realistisch gezien het feit dat er op dit moment wereldwijd maar 450 centrales aanwezig zijn maar bovendien zou dit ook nog eens een enorme belasting betekenen voor het milieu en daarnaast is de hoeveelheid beschikbaar uranium, dat cruciaal is, beperkt [12].

Het gebruik van biomassa, een indirect product van de fotosynthese, kan bijdragen tot de oplossing van een deel van het

probleem, maar de efficiëntie is relatief laag omdat slechts een gering deel van de opgevangen zonne-energie uiteindelijk wordt omgezet in biomassa. Als bijvoorbeeld in Europa alle geschikte grond wordt gebruikt voor de productie van het zeer snel groeiende olifantsgras (*Miscanthus Giganteus*) en als de biomassa hiervan wordt gebruikt voor energieproductie dan kan dit voorzien in 90% van de benodigde elektriciteit [13]. Maar elektriciteit voorziet slechts in 30% van ons energieverbruik en bovendien moeten we ook nog grond overhouden om voedsel te verbouwen. Kortom, biomassa kan zeker niet de gehele behoefte dekken.

Het gebruik van zonnecellen zal zeer waarschijnlijk ook bij gaan dragen aan onze toekomstige energieproductie maar dit is vooral goed om elektriciteit te produceren, die vooralsnog niet goed opgeslagen kan worden. Zoals ik al zei wordt momenteel slechts 30% van de benodigde energie op aarde geleverd in de vorm van elektriciteit, de resterende 70% wordt geleverd via brandstoffen. De elektriciteit kan uiteraard weer gebruikt worden om brandstoffen te produceren maar het is onvermijdelijk dat hierbij veel energie verloren gaat. Het zou energetisch veel gunstiger zijn om brandstoffen te maken in gespecialiseerde zonnecellen, zo snel mogelijk na lichtabsorptie en ladingsscheiding. Het succesvol ontwikkelen van een dergelijk zonnecel zou een wereldwijde revolutie betekenen en vormt daarom een enorme intellectuele uitdaging. De bijbehorende principes worden al gebruikt in het fotosyntheseprocess en thermodynamisch gezien is dit proces nagenoeg optimaal. We hoeven dus "alleen maar" de Natuur op een slimme manier te kopiëren. Maar daarom moeten we wel eerst weten hoe de Natuur het doet. Met mij heeft een groeiend aantal wetenschappers de hoop gevestigd op de uiteindelijke productie

van een kunstmatig blad (enigszins vergelijkbaar met het blad van een plant) dat rechtstreeks brandstoffen produceert waarbij de efficiëntie van energieomzetting beduidend hoger is dan bij de productie van biomassa. Het spreekt voor zich dat ook het benodigde aardoppervlak in dat geval beduidend lager zal zijn. De energieproductie zal flexibel kunnen gebeuren, bijvoorbeeld voor een regio, een stad, een industrieterrein, een wijk of voor een huishouden. Bovendien is deze vorm van energieproductie milieuvriendelijk. Het immer stijgende CO₂ niveau dat verantwoordelijk wordt gehouden voor het broeikas-effect, zal mogelijk zelfs verlaagd kunnen worden.

Veel geld wordt momenteel gestopt in de ontwikkeling van kernfusie als methode om in de toekomst energie te produceren en daar gaan enorme bedragen in om. Kernfusie is het proces dat zich afspeelt in de zon en dat verantwoordelijk is voor de productie van zonne-energie. Een groot voordeel is dat de benodigde brandstof voor dit proces, waterstof, vrijwel onuitputtelijk is en er worden geen belastende stoffen voor het milieu geproduceerd. Maar of dit proces op een gecontroleerde manier op aarde plaats zal kunnen vinden is nog hoogst onzeker. De vraag is ook waar we de benodigde centrales neer gaan zetten, hoe de vrijkomende energie moet worden getransformeerd in bruikbare energie en hoe we die energie vervolgens op de plaats krijgen waar we haar nodig hebben.

Ik vraag me af of het echt nodig is dat we onze eigen zonnepanelen hier op aarde gaan proberen te bouwen als we al een werkende centrale hebben op 8.5 minuten afstand van vrijwel elke plaats op aarde. De centrale werkt al en hoe. De hoeveelheid zonne-energie die de aarde per uur bereikt is voldoende om de wereld één jaar van energie te voorzien.

Het enige serieuze probleem dat er overblijft, maar dat evenzeer geldt voor kernfusiecentrales, is de vraag hoe we de aangeboden energie om gaan zetten in bruikbare energie. De Natuur heeft ons een prachtig voorbeeld gegeven: de fotosynthese. De opgedane kennis van dit proces zal moeten leiden tot kunstmatige fotosynthese waarbij de energie direct wordt omgezet in brandstoffen. Er is geen enkele reden om te denken dat deze methode minder kans van slagen heeft dan de ontwikkeling en het gebruik van kernfusie. Er is m.i. dus ook geen goede reden te bedenken om minder geld te besteden aan dit onderzoek.

Er lopen verschillende initiatieven om beleidsmakers en politici in Europa er van te overtuigen dat we de komende tientallen jaren hard aan de slag moeten gaan met het voorgestelde onderzoek: ontwikkel zonnecellen die rechtstreeks brandstoffen maken. Het plan van aanpak is aanwezig [12, 14]. Ik denk niet dat we veel alternatieven hebben als we onze welvaart in stand willen houden en ook de rest van de wereld daar in willen laten delen. Het bestaande en geplande onderzoek bij onze Biofysica groep past goed binnen dit plan al is het natuurlijk maar een fractie van het totale vereiste onderzoek. Ik zal me de komende jaren graag voor dit onderzoek in willen zetten, niet alleen binnen onze Biofysica groep, maar ook daarbuiten.

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren, ik wil graag deze rede afronden met woorden van dank. Ik heb in de loop der jaren met honderden mensen samen gewerkt en die kan ik niet allemaal gaan bedanken. Ik zal mij wederom moeten beperken.

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

Het departement voor Agrotechnologie en Voeding doet zijn best om in deze financieel moeilijke tijden ons onderzoek en onderwijs door te laten gaan. Ik hoop ook in de toekomst op een constructieve samenwerking.

Van mijn Wageningse collega-professoren ben ik de meeste dank verschuldigd aan Ton Visser. Ik zie hem als de belangrijke wetenschappelijke motor achter het MicroSpectroscopie Centrum Wageningen, kortweg MSC. De beschikbare faciliteiten in dit centrum waren voor mij een belangrijke reden om te solliciteren naar mijn huidige functie. Ton, het is uitermate jammer dat je binnenkort zult stoppen in Wageningen. Ik ben er trots op dat ik je opvolg als directeur van het MSC, maar ik realiseer me dat dit absoluut niet eenvoudig zal zijn. Ik hoop dat onze universiteit het belang van dit centrum op zijn waarde schat en het voldoende zal steunen. De onvermijdelijke verhuizing van een deel van het centrum zal een nieuwe koers onvermijdelijk maken, terwijl tegelijkertijd de financiële mogelijkheden zeer beperkt zijn.

Van de vele hoogleraren wil ik hier Martien Cohen Stuart en Gerard Flier bedanken voor hun steun in met name mijn beginperiode in Wageningen. Er is nl. een wereld van verschil tussen het reilen en zeilen aan de Vrije Universiteit in Amsterdam en in het Wageningse. Sacco de Vries wil ik ook niet ongenoemd laten, hij heeft me op verschillende manieren geholpen in het recente verleden. Sacco, we hebben beide belang bij een goed draaiend WNMRC en MSC en ik hoop op een goede samenwerking in de toekomst. Daarnaast hoop ik op een goede samenwerking met de leerstoelgroepen binnen ons cluster "Biobased" maar er zijn

voldoende andere groepen met wie een samenwerking voor de hand ligt.

De leden van mijn leerstoelgroep en de mensen van het MSC en WNMRC ben ik ook grote dank verschuldigd. Mijn inaugurele rede heb ik om verschillende redenen enkele jaren uitgesteld en in de tussentijd heb ik jullie leren kennen als mensen die weten waarover ze praten en die in staat zijn om uitstekend onderzoek te doen, vakmensen dus. Als hoogleraar zit je altijd in een spanningsveld tussen directies en werknemers en een groot deel van mijn werkzaamheden is niet altijd direct zichtbaar. Wees ervan verzekerd dat ik mijn uiterste best zal doen om te werken aan een goede toekomst van onze groep.

Ik wil ook nog enkele collega's buiten Wageningen bedanken, te beginnen in Amsterdam, waar ik gestudeerd heb, gepromoveerd ben en tot 2002 gewerkt heb. Allereerst Rienk van Grondelle. Rienk, jij bent mijn grote inspirator geweest, gedurende mijn studie, promotie en de vele jaren daarna. Ik heb ontzettend veel van je geleerd. Ik heb grote bewondering voor de manier waarop jij jouw onderzoeksgroep hebt opgezet en de vele prachtige resultaten die je behaald hebt. Ik hoop dat we in de toekomst nog veel zullen samenwerken. Jan Dekker, Frank van Mourik en Ivo van Stokkum, ook jullie zijn heel belangrijk geweest tijdens mijn periode in Amsterdam. Ook met jullie hoop ik in de toekomst nog vruchtbaar samen te werken. Daarnaast wil alle oud-medewerkers in Amsterdam bedanken met een speciaal woord van dank aan mijn promovendi, die ik niet met name zal noemen.

Buiten Amsterdam zijn er teveel collega's om op te noemen, ik wil mij beperken tot Walter Struve, mijn uiterst kundige

baas tijdens mijn postdoc periode in de Verenigde Staten, en Leonas Valkunas, met wie ik een ontzettend leerzame en ook leuke tijd heb doorgebracht tijdens het schrijven van ons boek Photosynthetic Excitons.

Grote dank ben ik verschuldigd aan mijn ouders. Ze hebben me altijd enorm gesteund. Op een dag als vandaag besef ik weer heel goed hoe jammer het is dat mijn moeder de dingen niet meer kan meemaken die ze eigenlijk voor geen goud had willen missen. Pap, je bent nog steeds een enorme steun en zonder jouw geweldige hulp zou mijn leven er heel anders hebben uitgezien.

En dan Bo, Dion en Cai. Ik ben ontzettend blij met jullie en ik ben enorm trots hoe jullie je door deze moeilijke jaren heen slaan. Ik hoop dat alles snel beter wordt.

En tot slot Roberta, tu sei per me tutto quello che un uomo sognare potra.

Ik heb gezegd

References

- 1- Vredenberg WJ (2002) "Om niet licht te vergeten", afscheidsrede Wageningen.
- 2- Liu ZF, Yan HC, Wang KB, Kuang TY, Zhang JP, Guo LL, An XM, Chang WR (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 angstrom resolution, *Nature* 428: 287-292.
- 3- Maddox B (2002) "Rosalind Franklin. The dark lady of DNA" HarperCollinsPublishers, London.
- 4- Larsen OFA, van Stokkum IHM, Gobets B, van Grondelle R, van Amerongen H (2001) Probing the structure and dynamics of a DNA hairpin by ultrafast quenching and fluorescence depolarization, *Biophysical J.* 81, 1115-1126.
- 5- Barzda V, Gulbinas V, Kananavicius R, Cervinskas V, van Amerongen H, van Grondelle R, Valkunas L (2001) Singlet-singlet annihilation kinetics in aggregates and trimers of LHCII, *Biophysical J.* 80, 2409-2421
- 6- Novoderezhkin VI, Palacios MA, van Amerongen H, van Grondelle R (2005) Excitation dynamics in the LHCII complex of higher plants: Modeling based on the 2.72 angstrom crystal structure, *J. Phys. Chem. B* 109, 10493-10504.
- 7- Van Amerongen H, Valkunas L, Van Grondelle R (2000) *Photosynthetic Excitons*, World Scientific Publishing, Singapore.
- 8- Van Amerongen H & Dekker JP (2003) in "Light-harvesting antennas in photosynthesis" (eds. B.R. Green and W.W. Parson) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 219-251
- 9- Broess K, Trinkunas G, van der Weij-de Wit CD,

Dekker JP, van Hoek A, van Amerongen H van (2006) Excitation Energy Transfer and Charge Separation in Photosystem II Membranes Revisited, *Biophysical J*, 91: 3776-3786.

- 10- Oort B van, Hoek A van, Ruban AV, Amerongen H van, publicatie in voorbereiding
- 11- Pascal A, Broess K, van Oort B, van Amerongen H, Wang C, Horton P, Robert B, Chang W and Ruban AV (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting, *Nature* 436, 134-137.
- 12- "Harnessing solar energy for the production of clean fuels" white paper about clean solar fuels" (http://www.ssnmr.leidenuniv.nl/content_docs/clean-solarfuels.pdf)
- 13- Clifton-Brown JC, Stampfl PF, Jones MB (2004) *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change Biology* 10, 509-518.
- 14- Rapport FOM-verkenning energie, augustus 2006 (<http://www.fom.nl>)