



WAGENINGEN UNIVERSITEIT

Om niet licht te vergeten

Door Prof. dr. W.J. Vredenberg

NN02963,720

WAGENINGEN UR

OM NIET LICHT TE VERGETEN

door Prof. dr. W.J. Vredenberg

hoogleraar Plantenfysiologie met bijzondere aandacht
voor de fysische aspecten



WAGENINGEN UNIVERSITEIT

Afscheidscollege uitgesproken op 18 april 2002 in de Aula
van Wageningen Universiteit

OM NIET LICHT TE VERGETEN

*Het licht doet me van tijd
tot tijd herinneren
aan het licht*
uit: 'Ik hoor het licht'
een bloemlezing uit de poëzie van
Hans Andreus (1926 -1977)

Mijnheer de Rector Magnificus,
Geachte aanwezigen, beste allemaal,

Bij het nadenken over, en voorbereiden van deze openbare les trok de hierboven geciteerde dichtregel van Hans Andreus mijn aandacht. Een dichter is in staat om in enkele regels treffend te verwoorden hoe het licht van invloed is op de belevingswereld van mensen. In veel culturen speelt in de beschrijvingen van het oerbegin het licht een belangrijke rol. Het bijbelse scheppingsverhaal onderscheidt zich niet van dat van andere godsdiensten en culturen. In het begin wordt scheiding gemaakt tussen donker en licht: 'en God sprak: er zij licht'. Licht heft iets op. Het staat aan het begin van wat daarna volgt: van stratosfeer tot biosfeer, van chaos tot structuur tot leven. Licht is een voorwaarde voor het leven op deze planeet.

Ruim twee en twintig jaar geleden hield ik op deze plek mijn eerste openbare les aan deze universiteit met als titel 'Licht en Leven'. De herinnering daaraan en het feit dat een gelegenheid als deze een terugblik op je werkzame periode mogelijk maakt, brengt me op mijn onderwerp dat aanleunt tegen de dichtregel van Hans Andreus. Ik heb als titel gekozen "Om niet licht te vergeten".

Een nog al eens gestelde vraag bij ontmoetingen in collega-, kennissen- of familiekring is die naar wat je doet, of naar wat je aan het doen bent in je dagelijks werk. Zo zou mij vandaag de vraag gesteld kunnen worden "Wat

deed je nou in Wageningen". In het verdere betoog wil ik bezig zijn met de beantwoording van die vraag. Ik zal, in een terugblik naar enkele opeenvolgende perioden in mijn wetenschappelijke loopbaan, vertellen wat ik aan het begin of einde van zo'n periode gedaan heb of van plan was te gaan doen. De vraag naar wat ik deed, zal worden beantwoord met wat er steeds gedaan is in samenwerking met anderen. Datgene wat een wetenschapper doet is in belangrijke mate gebaseerd op en wordt gedaan in samenhang met wat anderen doen of hebben gedaan. In je directe fysieke omgeving zijn dat de werkgroepen binnen instituut en universitaire leerstoelgroep: technische, administratieve en wetenschappelijke assistenten, studenten, promovendi en collega-onderzoekers. In ruimere zin zijn dat de nationale en internationale wetenschappelijke verbanden al of niet gekoppeld aan subsidiërende instanties zoals de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO).

De fotosynthesekijker

In 1960 werd ik het derde staflid van de toen twee jaar jonge Biofysica groep in Leiden die onder leiding stond van mijn latere promotor Lou Duysens. De groep was gehuisvest in het gerenommeerde Kamerlingh Onnes Laboratorium, het lage temperaturen centrum van de wereld. In deze periode zijn de grondslagen gelegd voor mijn wetenschappelijke interesse in de levende natuur. Biofysica wordt niet voor niets levende natuurkunde genoemd. Mijn utrechtse opleiding in de experimentele natuurkunde en toegepaste wiskunde hadden me toegerust met kennis en enige notie van de natuurkunde (fysica) op het gebied van licht, elektriciteit, beweging, elementaire deeltjes en van de wiskunde als instrument om fysische wetmatigheden te doorgronden. Duysens had, evenals trou-

wens mijn voorganger in Wageningen professor E.C. Wassink, zijn wetenschappelijke wortels in de Biofysica groep van het Fysisch Laboratorium aan de Bijlhouwerstraat in Utrecht. Eén van de sterke punten van dit laboratorium was in die tijd gelegen op het gebied van de ontwikkeling en toepassing van uiterst gevoelige optische en elektronische apparatuur voor het meten en registreren van kleine hoeveelheden licht, of anders gezegd voor het meten van kleine veranderingen in lichtsterkte. Duysens gebruikte als eerste deze fysisch- elektronische technieken bij zijn onderzoek met organismen die in staat zijn licht om te zetten in voor het organisme bruikbare energie. Deze fotosynthetische organismen hebben evenals de groene plant, maar in simpeler vorm, pigmenten, voornamelijk chlorofyl, en eiwitten die in staat zijn het licht in te vangen (absorptie), vast te houden en om te zetten in een voor (bio-) chemische synthese reacties bruikbare energievorm. Biochemisch onderzoek aan soortgelijke eiwitten of pigmenten in de reageerbuis had aangetoond dat bij chemische omzetting de 'kleur' van zo'n betrokken component verandert. In fysische termen betekent kleurverandering dat bij bepaalde golflengten van het licht de hoeveelheid die wordt ingevangen of (in het geval van fluorescentie) wordt uitgezonden op een voor het eiwit kenmerkende wijze toe- of afneemt in sterkte.

Met de eerder genoemde meettechniek beschikte Duysens over wat ik nu maar noem een unieke optische 'fotosynthesekijker'. Hiermee konden de allereerste reacties waarmee het fotosyntheseproces begint worden bestudeerd aan de hand van kleine kleurveranderingen die optreden als het organisme via een stelsel van lenzen, kleurfilters en optische sluiters door een in sterkte regelbare lichtbron wordt belicht. Zo was in de vijftiger jaren uit het werk met deze fotosynthesekijker onder andere duidelijk geworden dat het

door chlorofyl ingevangen licht van pigment naar pigment wandelt en terecht komt in een wat we nu noemen een reactiecentrum chlorofyl. De metingen suggereerden dat dit reactiecentrum chlorofyl aanwezig is in een verhouding van 1 per 100 tot 200 chlorofyl pigmenten. In tegenstelling tot deze zogenaamde antenne pigmenten zit het reactiecentrum chlorofyl, zo was de hypothese, in een eiwit omgeving waar het elektrochemisch mee in wisselwerking kan komen. Deze eiwitomgeving en daarmee het reactiecentrum zelf, vormt als het ware de toegangspoort waardoor het door de antennes ingevangen licht de energiecentrale van de fotosynthese binnenvalt. Welnu ik mocht in Leiden de fotosynthesekijker gebruiken voor mijn eerste biofysische experimenten. De opzet was om aannemelijk te maken dat bepaalde, reeds eerder waargenomen kleurveranderingen die optreden bij belichting van bacteriën toegeschreven kunnen worden aan het reactiecentrum chlorofyl. Er is toen de volgende truck toegepast die ook bij wetenschappelijk onderzoek voortreffelijk werkt. Veronderstel eens dat u bijvoorbeeld zou willen weten hoeveel er op de receptie van uw favoriete drankje wordt gedronken. Dan hoeft u straks niet al tikkend en turvend met een tellertje rond te lopen om dat te weten te komen. U kunt volstaan met maar twee gegevens op te vragen: hoeveel pakken of flessen staan er op dit moment klaar - de invoer -, en hoeveel is daarvan na afloop van de receptie nog aanwezig - het niet-genuttigde. De consumptie - de nuttige opbrengst - is uiteraard het verschil tussen invoer en wat resteert. Wanneer je de opbrengst van een proces wilt meten kun je, bij een constante invoer, volstaan met het meten van de verliezen die optreden. Het slimigheidje dat we in 1960 toepasten was nu om de fotosynthesekijker niet alleen te richten op de kleurveranderingen van het reactiecentrum, maar ook op die welke maatgevend zijn voor de verliezen die optreden bij de lichttoe-

voer en -verwerking. Bij lichtvangst door antenne pigmenten treden verliezen op. Een deel daarvan wordt 'zichtbaar' als fluorescentie - het door de pigmenten uitgezonden licht. Dus werd de fotosynthesekijker ook op de chlorofyl fluorescentie gericht. Zo zijn bij lichtvangst en -doorgifte door de antenne pigmenten de optredende verliezen meetbaar als een weliswaar zwakke maar goed meetbare rode fluorescentie van het chlorofyl. De resultaten waren overeenkomstig de voorspelling. Naarmate de kleurveranderingen toegedacht aan het reactiecentrum afnemen, nemen die van de antenne fluorescentie toe. Bovendien bleek die toename volgens een eenvoudig wiskundig model in grootte gelijk te zijn aan de afname in de veronderstelde operationele toestand van het reactiecentrum. Het resultaat liet zich samenvatten in een eenvoudige vergelijking, in de literatuur bekend geworden als de Vredenberg-Duysens vergelijking.

Twee belangrijke conclusies konden in 1963 worden getrokken. Allereerst was het bestaan en een functie van reactiecentra in fotosynthetische bacteriën aangetoond. Verder biochemisch en biofysisch onderzoek in de volgende jaren heeft geleid tot de isolatie, zuivering en uiteindelijk tot de vaststelling de ruimtelijke structuur van het bacteriële reactiecentrum. In 1988 kregen de Duitse onderzoekers Michel, Deisenhofer en Huber voor dit laatste onderdeel de Nobelprijs voor de Chemie. In de tweede plaats was een nieuw type optische fotosynthesekijker beschikbaar gekomen, gebaseerd op een relatief simpele en betrouwbare meting van de chlorofyl fluorescentie. De actuele toestand van het reactiecentrum, en daarmee de potentie van de energieinstroom ten behoeve van de fotosynthese kan worden afgelezen aan de actuele fluorescentie. Is het reactiecentrum open, en denk aan het eerder genoemde beeld van de toegangspoort, dan is de fluorescentie laag. Is de poort (het reactiecentrum) dicht dan is de fluorescentie hoog. Een

verandering van de toestand van het reactiecentrum van open naar dicht gaat globaal gepaard met een vijf- tot zestovoudige toename van de chlorofyl fluorescentie.

Een bijzonder aspect van de hier geschetste fotosynthesekijker die op de fluorescentie methode berust is dat metingen gedaan kunnen worden zonder dat in principe ingegrepen hoeft te worden in de toestand en het functioneren van het organisme. Vergelijk het met de methode voor het meten van een elektrocardiogram voor het registreren van de hartfuncties. Je plaatst de apparaatjes die de interne prikkels opvangen (de sensors) op de huid, je voert de opgevangen signalen naar ervoor beschikbare meet- en registratie apparatuur en je bekijkt de resultaten op een TV- of computer scherm. Er komt, althans in deze fase, geen chirurg aan te pas.

Fotosynthese metingen door middel van fluorescentie waarnemingen op basis van de in de zestiger jaren gelegde grondslagen behoren thans tot de standaard meetmethoden in o.a. plantendiagnostiek en plantenscreening. Ik zeg uitdrukkelijk op basis van de grondslagen, want voor wat betreft methode en mogelijkheden is er veel veranderd. Die veranderingen hebben te maken met de enorme ontwikkelingen die hebben plaatsgevonden op het gebied van 1) natuurwetenschappelijke inzichten in de processen, 2) de toepassing van verfijnde biofysische en biochemische technologieën, en 3) de kennisvraag vanuit andere sectoren op het gebied van de plantenwetenschappen in ruime zin. Het 2-daags internationale symposium 'Plant Spectrofluorometry: applications and basic research', dat voorafgaande aan deze bijeenkomst is gehouden, is hiervan een heldere illustratie.

Het groene hart

Het is een verrassende ontdekking om achteraf

vast te stellen dat de ontwikkeling in je wetenschappelijk denken en handelen in sterke mate is bepaald door ingevingen, impulsen en waarnemingen op niet voorziene momenten. Zo is het moment dat op het mededelingen bord in het Fysisch Laboratorium aan de Bijlhouwerstraat in Utrecht een vacaturemelding was opgeprikt voor een afgestudeerd fysicus bij de mij onbekende Biofysicagroep in Leiden bepalend geweest voor mijn interesse in de biofysische vraagstellingen naar de werking van het licht in biologische systemen.

De overgang in de eind zestiger jaren van een volledige fysische omgeving, zoals beleefd in Utrecht en in Leiden, naar het wageningse milieu betekende voor mij tevens een verandering van wetenschappelijk aandachtsgebied. Op het Centrum voor Plantenfysiologisch Onderzoek (CPO) werd de gelegenheid geboden om onderzoek te doen naar de wijze waarop allerlei vormen van transport in planten plaatsvindt en van buitenaf beïnvloed wordt of kan worden. De toenmalige directeur Dr. I. de Haan reageerde enthousiast op mijn voorstel om te onderzoeken of, en zo ja hoe, transportprocessen in planten door licht worden beïnvloed. Ik kreeg eveneens de vrijheid om in de eerste fase van het onderzoeksplan experimenten uit te voeren met uit plantbladeren geïsoleerde chloroplasten – de bladgroenkorrels. Dit zijn de cellichamen waarin energie vastlegging via de fotosynthese plaatsvindt. Het zijn de licht-energie centrales van de plant; ze vormen het groene hart. In het kader van vraagstellingen naar de wijze waarop transport in plantenweefsels plaatsvindt is het uiteraard van belang om te weten 1) hoe de centrale werkt en 2) hoe het distributienetwerk is georganiseerd waarmee de centrale de cel en de omliggende weefsels van energie voorziet. Wat dat betreft is de werkwijze van een plantbiofysicus niet verschillend van iemand die bijvoorbeeld de nutsvoorzieningen binnen een

woon- en leefomgeving, en alles wat daarmee verband houdt, in kaart wil brengen en beoordelen. Ook voor de plant geldt dat het welzijn van iedere onderdeel ervan bestaat bij de gratie van een goede balans tussen energievraag en energieaanbod. Om die te verzekeren is een goede centrale ('source') en een betrouwbare verbinding met de gebruikersplaats ('sink') een basisvereiste. Je kunt je huis met de meest geavanceerde apparatuur op het gebied van gas, water, elektriciteit en informatietechnologie hebben uitgerust, aansluiting op een goed werkend toevuernetwerk is noodzakelijk voor de bedoelde werking en effecten. Het is goed om de triviale opmerking te maken dat de aansluiting op die netwerken een beweging van materie in gang zet van de source naar de sink. Aan de vraagzijde (de sink) wordt een bepaalde stroom van water, gas of elektriciteit gedurende een zekere periode gevraagd. Of die hoeveelheid geleverd kan worden hangt af van de spanning of druk die de centrale levert en van de hoeveelheid die de leidingen in het netwerk door kunnen laten. We komen hier bij een grondwet van de natuurkunde die, binnen zekere grenzen, de kwantitatieve beschrijving geeft voor de hoeveelheid materie die zich verplaatst in een geleidende omgeving tussen twee plekken waarvoor een verschil in druk of spanning bestaat. Sterk vereenvoudigd: de stroom van source naar sink (van gas-, vloeistof of elektriciteit) is evenredig met het potentiaalverschil en met de geleiding tussen beide. Neemt b.v. de spanning of de geleiding met 10% toe dan heeft dat een 10% toename in de stroom tot gevolg. Het betekent eveneens dat, wanneer je een 10% toename in de stroom meet, je nog moet vaststellen of die is veroorzaakt door een toename in de spanning of in de geleiding, of mogelijk zelfs door een verandering in beide.

Zoals gezegd functioneren chloroplasten als de door licht aangedreven energiecentrales in plant, blad en

bladcel. De bladcel is omgeven door een celmembraan. Dit membraan regelt de uitwisseling met de celomgeving van de celbestanddelen, of componenten daarvan, die nodig zijn voor, dan wel het product zijn van functie, welzijn en vitaliteit van de cel. Deze belangrijke membraanfunctie wordt verricht door in de membraan gelegen gespecialiseerde eiwitten die als doorlaatkanaal functioneren. De genoemde vitaliteit van een cel komt tot uitdrukking in een elektrische spanning over de cel membraan.

Licht door de vensters

In de periode dat ik me op het wageningse CPO inwerkte in de literatuur over transportprocessen in planten verscheen er in 1969 een publicatie van de biofysica groep van Williams en Hogg in het Botanisch Laboratorium van de universiteit van Edinburg. De titel ervan wekte nieuwsgierigheid op; het bestaan van een relatie tussen licht intensiteit en de elektrische spanning in een plantcel, in dit geval de langwerpige cel van de kranswier *Nitella translucens*. Lezing van dit artikel is van doorslag gevende betekenis geweest voor de richting waarin mijn planten-biofysisch onderzoek in Wageningen is gegaan. Belangwekkend is het op te merken dat de auteurs nergens in het betreffende artikel aangeven wat de oorzaak van het door hen waargenomen lichteffect zou kunnen zijn. Hooguit zou je tussen de regels door kunnen lezen dat ze een effect van het licht op membraaneiwitten voor mogelijk hielden. Maar het bestaan van eiwitten in celmembranen die zichtbaar licht absorberen was en is onwaarschijnlijk.

Mijn eerste reactie bij lezing van het artikel was dat de engelse metingen met een aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid aantoonde dat omzetting van licht-energie in de chloroplast een verandering in de elektrische potentiaal van de cel tot gevolg heeft. En dat was op dat

moment, niet alleen voor mij, groot nieuws. Ik wil u ook nog deelgenoot maken van de schitterende beschrijving die de auteurs geven van de wijze waarop bij hun experimenten het licht in sterkte werd gevarieerd: de laboratorium TL verlichting plus 'het door de ramen binnenvallende daglicht, waarvan de sterkte werd gevarieerd door de stand van de raamjaloezieën'. Voor een biofysicus tot dan werkzaam in de fotosynthese een bijna Flintstone-achtig tafereel. De wijze waarop de elektrische spanning van de plantcel met een in de medische fysiologie gangbare elektrofysiologische techniek werd gemeten was helemaal nieuw voor mij. Deze techniek, waarin een cel wordt aangeprikt met een, met vloeistof gevuld, ultra dun glasnaaldje - de dunste injectie-naald heeft in vergelijking ermee de doorsnede van een regenafvoerpijp - werd in Nederland op dat moment bij onderzoek binnen de experimentele plantenwetenschappen nog niet toegepast.

De spanning stijgt

Er was dus alle reden om Williams te schrijven en te vragen de meettechniek bij hem te mogen komen leren. Ik kon direct komen, en reisde af naar Edinburg met in mijn bagage een zaklantaarn en het onkruidbestrijdingsmiddel diuron. Het eerste hulpmiddel zou het gebruik van de raamjaloezieën overbodig maken en kunnen dienen voor de belichting van de cel. Het tweede zou bij toediening de fotosynthese remmen en - als mijn veronderstelling juist was - dan ook de verandering in de celpotentiaal in het licht. Het zijn vier topdagen geworden daar in Edinburg, en ik kwam fluitend en zingend terug in Wageningen. Een elektrofysiologische meetopstelling met een regelbaar en optische verantwoord belichtingssysteem werd opgezet. Nog in hetzelfde jaar verscheen de publicatie waarin werd aangetoond dat de elektrische spanning van de cel door

fotosynthetische energie wordt gereguleerd. Het is de start geworden van de toepassing van de elektrofysiologie bij het bioenergetisch en plantkundig onderzoek in Nederland. Om niet licht te vergeten!

Wat wetenschapsbeoefening zo boeiend maakt is dat iedere nieuwe vinding nieuwe vraagstellingen oproept. Soms zijn die voor de hand liggend en heb je ze zelf bedacht. Soms komen ze van collega's in het internationale wetenschapsforum die, op grond van het door jouw gepubliceerde resultaat, eigen hypothesen zien bevestigd of nieuwe invallen krijgen. Was op zich zelf de waarneming dat het aanzetten van de energiecentrale in de cel – belichting van de chloroplast- in de op afstand gelegen celmembraan een elektrische verandering veroorzaakt spectaculair, ze was bovendien opwindend in het kader van de eind zestiger en begin zeventiger jaren gevoerde discussie over het mechanisme van energie omzetting in biomembranen. De engelse biochemicus Peter Mitchell had het zogeheten chemi-osmotische model van dit mechanisme voorgesteld. Hij kreeg voor dit baanbrekend werk in 1978 de Nobelprijs voor de Chemie. In zeer vereenvoudigde vorm zegt het Mitchell model dat de vorming van ATP, de biologische energiedrager in de cel, plaatsvindt op een membraaneiwit, het ATPase, onder invloed van een stroom van protonen door het kanaalgedeelte van dit eiwit. De protonenstroom zal uiteraard alleen kunnen lopen wanneer de protonen spanning aan de ene zijde van de membraan groter is dan aan de andere zijde. Omdat het proton een elektrische lading heeft, heeft de elektrische spanning over het membraan ook invloed op de protonen stroom en dus op de ATP vorming. Bovendien, zo werd gepostuleerd, is het proces volledig omkeerbaar. Een overmaat van ATP aan de ene zijde zal leiden tot een protonen stroom door het ATPase en deze stroom zal de membraan potentiaal beïnvloeden. Het

eerder genoemde experiment uit Edinburg en Wageningen zou dan het volgende idee op kunnen leveren. In de chloroplast wordt bij belichting een elektrische membraan spanning opgewekt die stimulerend werkt op de protonenstroom door het chloroplast ATPase. Als gevolg daarvan neemt de vorming van ATP toe. Dit ATP stroomt vanuit z'n bron (source) naar plaatsen (sinks) waar minder aanwezig is (via diffusie). Zo kan het ATPase in de celmembraan worden geactiveerd wat leidt tot een verandering in de elektrische spanning over dit membraan. Een elektriciteit netwerk binnen de cel met ATP als energiedrager. Kortom de mogelijkheid tot het direct meten en waarnemen van elektrische veranderingen bij belichting van intacte bladcellen ontmoette ruime internationale belangstelling binnen met name binnen de wetenschapsgebieden Bioenergetica, Transport en Biomembranen.

Waar komt de spanning vandaan

Het werd nog spannender en enerverender toen de russische biofysicagroep binnen het Botanie departement van de Universiteit van Moskou in 1972 in Nature met een publicatie kwam waarin door licht veroorzaakte veranderingen in de elektrische spanning over chloroplastmembranen werden getoond. Het was onderdeel van het promotie onderzoek van Alexander Bulychev onder leiding van de senior academici Kurella, Litvin en Andrianov. De groep toonde daarmee op schitterende wijze aan dat in de chloroplast de energie van ingevangen licht wordt omgezet in een elektrische spanning over het chloroplast binnemembraan. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van dwars aangesneden bladeren van de sierplant *Peperomia metallica*. In de bladcellen op het snijvlak bevinden zich een aantal relatief grote chloroplasten. Werkelijk fascinerend was het om in het Nature artikel een afbeelding te zien

waarin een chloroplast is aangeprikt door een eerder genoemde dunne glas elektrode en de chloroplast te zien reageren als een foto-elektrische cel, waarin op belichting een elektrische spanning wordt opgewekt. Een bijzonder gelukkige omstandigheid is het geweest dat juist in 1972 het internationale biofysica congres, dat eens in de 4 jaar wordt georganiseerd, in Moskou zou worden gehouden. De mogelijkheid werd me geboden om dit congres bij te wonen. Maar belangrijker was natuurlijk, dat er gelegenheid zou zijn om de biofysicagroep aldaar te bezoeken. Opnieuw zo'n moment dat van markante betekenis is geweest voor de verdere ontwikkeling van je wetenschappelijk denken en doen. Ik beleef nog de hartelijke ontvangst in een kring van rond de dertig medewerkers in een voor de gelegenheid deels ontruimde laboratorium- annex practicumruimte in het Botanisch laboratorium. Voor hen was het waarschijnlijk ook een buitengewone ervaring om, wellicht voor het eerst, in direct contact te treden met een onderzoeker uit het vrije westen. Bij deze ontmoeting en kennismaking is de basis gelegd voor een intensieve en vruchtbare samenwerking tussen wat ik dan maar noem de Moskou groep, met name met Bulychev en recentelijk ook met Sasha Cherkashin, en onze groep in Wageningen. Die was toen nog werkzaam op het CPO, later CABO, en verhuisde in 1979 naar de universiteit. Die samenwerking bestaat dus dit jaar precies 30 jaar. De vrucht ervan mag blijken uit de 15 gemeenschappelijke publicaties die sinds 1976 zijn verschenen in wetenschappelijke tijdschriften of nog in druk zijn.

Keren we nu weer terug naar ons plantenblad met daarin bladcellen, waarbinnen zich chloroplasten bevinden die het licht invangen om de energie te genereren voor het eigen levensonderhoud, de groei en aldus voor voedsel- en biomassaproductie. Er is, zij het vluchtig, aangestipt dat

aan het prille begin van de fotosynthetische productieketen vanaf lichtinvang tot plantaardig eindproduct een elektrische spanning over het fotosynthese membraan in de chloroplast wordt opgewekt. Deze elektriciteit productie is, zo bleek in het voorgaande, met verfijnde elektrofysiologische technieken meetbaar. Wanneer iets meetbaar is geworden kun je, je nieuwsgierigheid volgend, meer te weten komen over nog onbekende 'eigenaardigheden' van het proces of de processen waarin je bent geïnteresseerd. Nu was het toch al verbluffend dat, weliswaar met de genoemde ultradunne glasnaaldjes, de elektrische spanningen in de chloroplast kunnen worden gemeten. Om twee redenen wil ik hier even bij stilstaan. Ten eerste om de aandacht te vestigen op de verrassende wijze waarop een klein cellichaam als een chloroplast een hoeveelheid energie op kan vangen die aanmerkelijk groter is dan de grootte van het oppervlak zou doen vermoeden. De vergroting van het effectieve oppervlakte voor lichtinvang is bereikt doordat het gehele machinepark van de fotosynthetische lichtreacties zich bevindt op het strak in elkaar gevouwen fotosynthese membraan binnen in de chloroplast. Denk bijvoorbeeld bij dit membraan aan een grote- bij voorkeur groene- vuilnis zak. In elkaar gefrommeld kun je die in een klein doorzichtig plastic boterhamzakje stoppen. Dan is dit plastic zakje te beschouwen als een imitatie van een chloroplast met een lichtinvangend oppervlak van het groen gekleurde fotosynthese membraan dat vele malen groter is dan het zakje zou doen vermoeden. Ten tweede is het fascinerend dat er, nadat het licht op de chloroplast is gevallen, binnen het kortst denkbare moment – en daarbij moet je denken aan een fractie van een miljardste van een seconde!- een elektrische spanning is opgewekt die je kunt meten met dunne glas naaldjes. Je kunt vervolgens ook meten of en zo ja hoe de chloroplast potentiaal verandert gedurende de tijd dat er

bijvoorbeeld een constante hoeveelheid licht op het blad valt. Je doet soortgelijke experimenten als met de celmembranen in het eerder getoonde Edinburg experiment. Alleen doe je het nu, en dat is echt fascinerend, met een microscopisch klein groen bolletje dat in het zichtveld van de microscoop aangeprikt aan een dun wiebelig glas draadje hangt. Voordat u nu mogelijk ook enthousiast bent geworden citeer ik uit een overzichtsartikel dat in de eind zeventiger jaren verscheen. Hierin werd onze methode om de foto-elektrische verschijnselen in een chloroplast te meten met behulp van glas capillair elektroden vergeleken met 'shooting a mouse with a gun' – het schieten op een muis met een geweer. Ik noem deze kritiek op de elektrofysiologische metingen in chloroplasten om aan te geven dat ook in de wetenschap experimentele waarnemingen niet altijd onomstreden zijn. In dit specifieke geval kon de kritiek overigens betrekkelijk gemakkelijk weerlegd worden. Waarnemingen, van welke aard dan ook hebben alleen geldigheid binnen de grenzen die zijn gesteld door de omstandigheden waaronder en de methoden waarmee ze zijn verricht. De werkelijkheid is gecompliceerder dan wat we ervan waarnemen en in beeld kunnen vastleggen door middel van tijdsregistraties, grafieken, tabellen, formules, enzovoort. De wetenschap past daarom bescheidenheid. Zeker, de wetenschap stelt ons in staat meer zicht op de werkelijkheid te krijgen. Maar iedere waarneming geldt alleen voor de omstandigheden waaronder de werkelijkheid zich aan de onderzoeker voordoet of voordeed en, niet minder belangrijk, voor de omstandigheden waaronder ze werden gedaan. We raken hier een punt dat een veel uitvoeriger behandeling vraagt dan ik in dit kader zal kunnen geven. Ik volsta met de constatering dat wetenschappelijke conclusies, gebaseerd op en onderbouwd met op zich zelf genomen 'harde' feiten en solide interpretaties, soms ten

onrechte gebruikt worden als een dogma. Ten onrechte omdat aan de randvoorwaarden die de geldigheid van een conclusie begrenzen niet is voldaan, en waaraan soms ook niet voldaan kan worden. Er zijn, ook in de exacte wetenschappen, voorbeelden te geven van wetenschappelijke controverses, die hun grond vinden in een onvoldoende onderkenning van de begrenzing van een wetenschappelijke conclusie.

Prikken en zuigen

In het midden van de tachtiger jaren was de elektrofysiologische techniek zo ver ontwikkeld en verfijnd dat het gedrag van afzonderlijke eiwitten in kleine stukjes membraan – zgn. membraan patches – aan de hand van het patroon van uiterst zwakke elektrische stroompjes die door de patch stromen, kan worden bepaald. Voor de formulering van de biofysische grondslagen en de ontwikkeling van deze elektrofysiologische techniek kregen de Duitse membraanfysiologen Erwin Neher en Bert Sackmann in 1991 de Nobelprijs voor de Geneeskunde. In ons wagenings onderzoek aan chloroplasten is de techniek waarbij de chloroplast tegen een glas capillair met grotere opening wordt aangezogen – een patch electrode – bij twee soorten onderzoek met succes toegepast. Allereerst kon een transportfunctie van de chloroplast buitenmembraan worden bestudeerd voor de doorlating van eiwitten die in de celkern, dus buiten de chloroplast, worden aangemaakt, maar binnen in de chloroplast nodig zijn voor de verwerking van door licht geproduceerde energie. In het promotieonderzoek van Paul van den Wijngaard is het bestaan van een eiwitkanaal aangetoond, dat bij dit eiwit transport in de chloroplasten van erwten is betrokken. Dit kanaal werkt overigens zonder dat daar licht voor nodig is. In de andere onderzoekslijn wordt, door verhoging van de zuigkracht, een klein gedeelte van

het fotosynthesemembraan in de patch elektrode naar binnen gezogen. Daarmee wordt een situatie bereikt waarin de elektrode in direct contact komt met de binnenruimte van de chloroplast die door het fotosynthesemembraan wordt omsloten. Als het beeld van de vuilniszak terug wordt geroepen is deze patch clamp methodiek voor de chloroplast te vergelijken met die waarin de vuilniszak tegen de opening van een regenpijp is aangezogen. Het geweer op de muis is vervangen door een zuigrietje op het muizenvel

Het groene hart pompt foto-elektronen

Met de zuig-electrode techniek konden alle voorgaande resultaten met de inprrik elektroden worden bevestigd. Maar bovendien leverde het een methode op waarmee direct het aantal plaatsen op de membraan waar het licht een electricch effect veroorzaakt kan worden bepaald. Stel u voor dat het fotosynthese membraan in de chloroplast 100 eiwitplaatsen bevat waar een elektrische omzetting door licht plaats kan vinden (het aantal reactiecentra is in werkelijkheid vele malen hoger). Dit betekent dat er bij een voldoende sterke kortdurende lichtpuls 100 elektronen over de membraan verplaatst kunnen worden wat overeenkomt met een elektrische stroom van een te berekenen grootte. Deze stroom wordt nu met de zuig-electrode methode rechtstreeks gemeten. Is, door welke oorzaak dan ook, een deel van de 100 reactiecentra al of niet tijdelijk uitgevallen, dan zal bij eenzelfde lichtpuls dus een kleinere stroom worden gemeten. De grootte van de elektrische stroom opgewekt door een korte lichtpuls in een aangezogen chloroplast is daarom een directe maat voor het aantal plaatsen waar een foto-elektrische omzetting kan plaats vinden. Iedere hapering in de functie van het inner sanctum van het fotosynthese proces- het reactiecentrum,

de liftdeur van de doorgangspoort voor de uiteindelijke biomassaproductie, is op te sporen en meetbaar in de vorm van een door licht opgewekte fotostroom in een chloroplast die is aangezogen aan een glasnaaldje. We zijn inmiddels bij het aanstippen van tijdsmomenten van het wagenings plantenbiofysisch onderzoek aangekomen in het midden van de negentiger jaren.

Kijken, meten, tellen en vertellen

Het wordt tijd om terug te keren naar het begin van dit betoog. Daar hadden we een fotosynthesekijker waarmee vanaf het allereerste begin nadat licht op een blad is gevallen, de gebeurtenissen in en rondom het reactiecentrum kunnen worden bekeken. De 'kijker', zo zagen we, is gebaseerd op een methode waarin de fluorescentie van het bladgroen (chlorofyl) gemeten wordt. Wellicht herinnert u zich ook nog de conclusie dat de fluorescentie toeneemt bij een verslechterd functioneren van de reactiecentra. Nu hebben we, dankzij een goede elektrofysiologische methode ook nog een voltmeter en een stroommeter ter beschikking. We zagen bij de stroommeting dat de fotostroom afneemt bij een haperend functioneren van de reactiecentra. De voorspelling ligt dan voor de hand. Als we de kijker en de stroommeter tegelijk gebruiken en we vinden in een experiment dat er meer licht uit de kijker komt dan moet dat gepaard gaan met minder stroom door de stroommeter. En dan komt de onaangename verrassing. Bij een eerste blik op de resultaten blijkt de voorspelde overeenkomst er lang niet altijd te zijn. Geen happy end dus aan mijn uiteenzetting? Nee, want dit is niet het einde van het complete verhaal. Ik zal dat ook niet geven.

Wel wil ik, als afsluiting van mijn betoog, stilstaan bij een tijdsmoment waarop je in het wetenschappelijk onderzoek geconfronteerd wordt met elkaar tegenspre-

kende resultaten. Dat zoiets vervelend is, is maar een deel van de waarheid. Een positieve zijde is dat je gedwongen bent nog kritischer te kijken naar je denk- en rekenwerk, en naar de wijze waarop en de omstandigheden waaronder je de experimenten hebt gedaan. Wanneer je gedwongen bent om fouten op te sporen wordt dat natuurlijk ervaren als een storende vertraging in je werk. Echter het opsporen van een onjuistheid in een redenering of in de manier van experimenteren behoed je voor verdere fouten en vergissingen. Bovendien kan het je een beter zicht geven op tot dan nog onbegrepen zaken of op nieuwe feiten, die anders, althans voor jou, duister zouden zijn gebleven. Je kunt dan tevens constateren dat wetenschappelijke conclusies, die binnen correct ogende veronderstellingen omtrent de randvoorwaarden juist zijn, soms in ruimer verband voor geldig worden verklaard. Impliciet is daarbij dan aangenomen dat de oorspronkelijke randvoorwaarden geen grenzen stellen aan de geldigheid van het eerder verkregen resultaat. Ik kan, omdat de tijd het niet toelaat, niet verder ingaan op deze verraderlijke en vaak onopgemerkte grensoverschrijdingen bij het wetenschappelijk onderzoek.

U zult zich voor kunnen stellen dat ik mijn verhaal wil afsluiten met een happy end. Welnu de eerder genoemde tegenstrijdigheid tussen resultaten verkregen met de fotosynthesekijker en de stroom- of voltmeter om de actuele fotosynthese in bladeren in beeld te krijgen, bestaat niet. Integendeel ze vullen elkaar aan en voegen nieuwe elementen toe aan het fascinerend gebeuren in de licht energiecentrales van de cel. Recentelijk is uit gemeenschappelijk onderzoek in Wageningen en Moskou gebleken dat bij een constante fotosynthese stroom door de reactiecentra de antennefluorescentie verandert als gevolg van wijzigingen in de vouw structuur van het fotosynthesemembraan veroorzaakt door de opgewekte fotostroom. Daarmee ligt er

weer een nieuwe conclusie ter discussie binnen het wetenschapsgebied van de plantenwetenschappen dat zich bezig houdt met het levensnoodzakelijk en fascinerende proces dat fotosynthese heet.

Ik heb het voorrecht gehad om alle tot nu toe gehouden 14 internationale fotosynthese congressen, die om de drie jaar worden gehouden, bij te kunnen wonen. Het eerste in 1962 in Parijs en de laatste vorig jaar in Brisbane. De verdieping en verbreding van en de belangstelling voor het fascinerende onderzoeksgebied laat zich illustreren aan de hand van de plankruimte die de in boekvorm verschenen bijdragen aan de 13 van de 14 opeenvolgende congressen innemen.

Ik heb het in deze voordracht niet over de fotomorfogenese gehad: het wetenschapsgebied dat zich met name bezig houdt met vraagstellingen naar het effect en de sturende werking van het licht op ontwikkelingsprocessen in de plant. De tijd ontbrak ervoor. Ik bewaar de allerbeste herinneringen aan de samenwerking met medewerkers van deze creatieve groep, met name de promovendi die ik, zij het op wat grotere afstand, samen met Dick Kendrick mede heb mogen begeleiden. Het is ontzettend spannend en enerverend geweest om samen met studenten, promovendi, assistenten en collega's in het boeiende wetenschapsgebied van de plantenfotofysiologie en plantenbiofysica te werken. Het is voor mij inderdaad 'om niet licht te vergeten'. Voor de wageningse universiteit voeg ik daar de waarschuwing aan toe 'om niet LICHT te vergeten' waar het bij de uitvoering van de academische missie immers ook om de biologische energieproductie moet blijven gaan.

Tenslotte wil ik zeggen dat het zo fijn is geweest om vanuit een gelukkig en harmonieus gezinsverband te hebben kunnen werken. Tot 1988 samen met Regina, daarna vanaf 1991 met jou lieve Renny, en in voortduring

met de kinderen en met het jonge vijftal Wietske, Mirthe, Nienke, Pim en Femke. Wat is het daarenboven extra fijn dat mijn moeder en Regina's vader deze dag meebelevén. Ik dank jullie wel voor zoveel onbenoemde bijdragen aan ons welzijn.

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren,
ik dank u voor uw aandacht.

Enkele literatuur gegevens

- Amesz J, and Hoff AJ (editors) (1996) *Biophysical Techniques in Photosynthesis*. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht/Boston/London
- Bulychev AA and Vredenberg WJ (1999) Light triggered electrical events in the thylakoid membrane of plant chloroplasts. *Physiol. Plant.* 105: 577-584
- Hogg J, Williams EJ and Johnston RJ (1969) Light intensity and the membrane parameters of *Nitella translucens*. *Biochim. Biophys. Acta* 173: 564-566
- van den Wijngaard PWJ and Vredenberg WJ (1997) A 50-picosiemens anion channel in the chloroplast envelope is involved in chloroplast protein import. *J Biol. Chem.* 272: 29430-29433
- van Kooten O and Snel JFH (editors) (2002) *Plant Spectrofluorometry: Applications and Basic Research*. Rozenberg Publishers, Amsterdam.
- van Voorthuysen T, Dassen JHA, Snel JFH and Vredenberg WJ (1997) Patch-clamp study on flash-induced secondary electrogenic transport in the thylakoid membrane: Interpretation in terms of a Q cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1277: 226-236.
- Vredenberg WJ and Duysens LNM (1963) Transfer and trapping of excitation energy from bacteriochlorophyll to a reaction center during bacterial photosynthesis. *Nature* 197: 355-357
- Vredenberg WJ, Bulychev AA (2002) Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo *Bioelectrochemistry*, in press

Internetsite met diverse doorverwijzingen naar illustraties en uitleg over Fotosynthese:

<http://www.alga.cz/links.htm>