

H E T O O G V A N D E B I O L O O G

OPENBARE LES
uitgesproken bij
de aanvaarding van het ambt
van lector in de Plantkunde
aan de Landbouwhogeschool te Wageningen
op 1 juni 1978

door

Dr. J.L. van Went

ZEER GEACHTE TOEHOORDERS

Heden ten dage kan de bioloog voor de bestudering van vorm en structuur van biologische objecten beschikken over een reeks van hulpmiddelen die zijn waarnemingsvermogen ver over de begrenzing van zijn gezichtsvermogen heen dragen.

De beperktheid van het gezichtsvermogen komt onder andere voort uit het feit dat het ongewapend oog, dus zonder hulpmiddelen, slechts gevoelig is voor elektromagnetische straling binnen een nauw begreemd gebied van golflengten, het zichtbare licht; en dat slechts contrast kan worden waargenomen dat berust op verschillen in kleur of intensiteit. De belangrijkste beperking echter is het feit dat het oog, als eenvoudige lens, slechts een scheidend vermogen heeft van 0,1 mm. Dat wil zeggen dat structuren, kleiner dan 0,1 mm, niet kunnen worden waargenomen en dat structuren die dichter dan 0,1 mm bij elkaar liggen, niet als gescheiden structuren worden gezien. Daar staat thans, bij gebruikmaking van de modernste hulpmiddelen, een waarnemingsvermogen tegenover met een scheidend vermogen van ongeveer 0,25 nanometer (nm). Dat is een verbetering met een factor 400.000 maal, waarlijk een niet-onaanzienlijke vooruitgang.

Ik wil in deze les trachten u een beeld te geven van de ontwikkeling van deze hulpmiddelen, zoals we die nu gebruiken bij de microscopie, en de toepassing

van deze hulpmiddelen bij de bestudering van biologische, met name botanische objecten.

Het startpunt van de ontwikkeling van de microscopie in het biologisch onderzoek vormt ongetwijfeld het werk van Robert Hooke die in 1665 zijn eerste microscopische waarnemingen publiceerde en bij zijn beschrijving van de structuur van kurk voor het eerst het woord "cel" introduceerde in zijn huidige biologische betekenis.

In dit verband dient zeker ook de bijdrage vermeld te worden van de Nederlander Antoni van Leeuwenhoek die 9 jaar na Hooke's ontdekking van de cel, voor het eerst levende cellen waarnam in de vorm van ééncellige protozoën.

Echter, het microscoop wordt dan nog gedurende ongeveer anderhalve eeuw meer beschouwd als instrument dat thuis hoort in het rariteitenkabinet, dan als instrument geschikt voor systematisch wetenschappelijk onderzoek. Daarbij moeten we ons echter goed realiseren dat de destijds nog bijzonder povere kwaliteit van de lenzen oorzaak was van ernstige beeldvervalsingen en vertekeningen. Vooral de zeer storende kleurfout of chromatische aberratie vormde een ernstige belemmering, omdat daardoor objectdetails van fel gekleurde randen voorzien werden die bovendien afhankelijk van de scherpstelling wisselden van tint.

In het begin van de negentiende eeuw wordt het micro-

scoop zowel instrument voor onderzoek als ook zelf object van onderzoek. Dit heeft geleid tot een aantal aanzienlijke technische verbeteringen, zoals bijvoorbeeld de achromatisering van lenzen, waardoor het microscoop evolueerde tot een betrouwbaar wetenschappelijk instrument. Naast deze apparatieve ontwikkeling had er ook een belangrijke ontwikkeling plaats op preparatief gebied. De meeste biologische objecten lenen zich in hun natuurlijke, levende toestand door hun afmetingen, samenstelling, ondoorzichtigheid en gebrek aan contrast niet zonder meer voor microscopisch onderzoek. De steeds beter wordende mogelijkheden om van biologisch materiaal dunne en contrastrijke doorsneden te maken, stelde de onderzoekers in staat de optische mogelijkheden van het microscoop volledig te benutten en leidde tot een snelle opbloei van het microscopisch onderzoek.

Deze snelle opbloei resulteerde omstreeks het midden van de negentiende eeuw in een der belangrijkste unificerende concepten in de biologie, de celtheorie. De celtheorie, in die tijd nog een zuiver morfologisch concept, houdt in dat alle plantaardige en dierlijke organismen zijn opgebouwd uit cellen, welke te beschouwen zijn als kleinste en onherleidbare, anatomische en functionele bouweenheden. De cel werd gekarakteriseerd als een klompje protoplasma, waarin zich een kern bevond. In het protoplasma, het eigenlijke cellichaam, bevond zich een verscheidenheid van

structuren, waarvan de vorm en hoeveelheid wisselde, afhankelijk van het celtype en de functionele toestand van de cel.

Door gebruik te maken van specifieke fixatie- en kleuringsmethoden konden de diverse celtypen en de in de cellen aanwezige structuren onderscheiden worden op basis van verschillen in kleurbaarheid. Inzicht in de chemische achtergronden van fixaties en kleuringen ontbrak echter grotendeels, zodat er van lokalisatie van chemisch karakteriseerbare componenten in de cel geen sprake was.

Aanvankelijk vergeleken de onderzoekers, indien mogelijk, nog zorgvuldig de structuren in gefixeerde en gekleurde cellen met die in levende cellen en was men zich bewust van de veranderingen, artefacten die door toepassing van fixatie en kleuring ontstonden, en men trachtte voortdurend de structuur van de levende cel ook zo goed mogelijk te benaderen in gefixeerd en gekleurd weefsel.

Na de eeuwwisseling echter raakte dit gebruik op de achtergrond en nam sterk de belangstelling toe voor technieken die gericht waren op fixatie en kleuring van één of enkele celcomponenten, met verontachtzaming van het effect op de rest van de cel.

Ondertussen was ook van chemische zijde de cel als object van studie gekozen. Informatie over de chemische samenstelling van de cel en de chemische reacties die zich in de cel afspeelden, werden verkregen

uit extracten van fijngemalen weefsels, welke ontiaan waren van onoplosbare celbestanddelen. Naast elkaar vonden aldus beschrijvend morfologisch, op de structuur van cellen en weefsels gericht onderzoek, en chemisch, op de functies van cellen en weefsels gericht onderzoek, plaats. Waar echter de chemicus zich bezig hield met de bestudering van moleculen en de morfoloog niet in staat was deze moleculen in de cel te lokaliseren, gaapte tussen beide benaderingswijzen een, toen onoverbrugbaar lijkende kloof en was van integratie van de wederzijds verkregen gegevens weinig sprake.

De wetenschap dat er aan de mogelijkheid om met het lichtmicroscop kleine deeltjes zichtbaar te maken een fundamentele grens is, hebben we te danken aan Ernst Abbe die onder andere de principes voor de mathematische berekening van de lenseigenschappen uitwerkte en de, ook nu nog geldende theorie over de beeldvorming in het microscoop opstelde. Deze fundamentele grens die voor het lichtmicroscop vooral bepaald wordt door de golflengte van de gebruikte straling, ligt bij een scheidend vermogen van ongeveer 0,2 micrometer (μm). Dat wil zeggen dat deeltjes minimaal een diameter van 0,2 μm moeten hebben om met behulp van een lichtmicroscop waarneembaar te zijn. Daarbij dient de vergroting minimaal 500 maal te bedragen om de, door het microscoop "opgeloste", details van 0,2 μm binnen het waarnemingsbereik van het oog

te brengen, aangezien dat een scheidend vermogen heeft van slechts 0,1 mm.

In de twintiger jaren worden dan twee experimenteel- en theoretisch natuurkundige ontdekkingen gedaan die hebben geleid tot een nieuwe, spectaculaire ontwikkeling van de microscopie. Allereerst postuleerde De Broglie in 1924 dat men aan een bundel snel voortbewegende elementaire deeltjes, dus ook aan elektronen, een golfkarakter moet toekennen, vergelijkbaar met dat van elektro-magnetische straling. Onder invloed van een versnelspanning van 60.000 volt bereiken elektronen in een vrijwel luchtledige ruimte een snelheid van ongeveer 100.000 km per seconde; eënderde van de lichtsnelheid. De daarmee corresponderende golflengte bedraagt circa 0,005 nm, dat is ongeveer 100.000 maal korter dan de gemiddelde golflengte van zichtbaar licht. Als deze zeer korte golflengte volgens de werkingsprincipes en condities van het licht-microscopie volledig zou kunnen worden benut, dan zou dat een scheidend vermogen opleveren van 0,003 nm, ruimschoots voldoende om structuren tot op het atomaire niveau op te lossen. Technische beperkingen maken dat echter thans jammer genoeg onmogelijk.

Daarnaast toonde in 1926 de Duitse natuurkundige Busch aan dat een bundel elektronen door het magnetisch veld van een geschikt ontworpen permanent-magnetische of elektro-magnetische lens kan worden afgebogen op een

manier die, in zijn eindeffect, geheel analoog is aan de breking van lichtstralen door glaslenzen.

Op basis van deze gegevens werd in 1932 door de twee Duitse natuurkundigen Knoll en Ruska in de hoogspanningslaboratoria van de Technische Hogeschool te Berlijn het eerste experimentele elektronenmicroscop geconstrueerd. Een nieuw, revolutionair type microscoop dat niet met zichtbaar licht werkte, maar met een bundel elektronen die in een hoogspanningsveld werden versneld, en waarvan de lenzen bestonden uit magnetische velden, geproduceerd door permanent-magnetische lenzen. De verdere ontwikkeling en verbetering van het elektronenmicroscop tot een voor de onderzoeker bruikbaar en hanteerbaar instrument kwam echter pas goed op gang na de tweede wereldoorlog. In dit verband dient zeker ook de bijdrage van de Nederlanders Prof. Le Poole en Ir. van Dorsten vermeld te worden. Aanvankelijk hield men zich vooral bezig met de ontwikkeling van het type elektronenmicroscop dat we nu kennen als het transmissie-elektronenmicroscop (TEM). Later werd ook de ontwikkeling van het z.g. raster- of scanning-elektronenmicroscop (REM) ter hand genomen, en vrij recentelijk is er nog een derde type elektronenmicroscop ontworpen, het z.g. scanning-transmissie-elektronenmicroscop (STEM).

Laten we ons allereerst eens richten op de toepassingsmogelijkheden en moeilijkheden van het TEM. Met

de huidige, zeer geperfectioneerde apparatuur is een scheidend vermogen haalbaar van 0,2 tot 0,3 nm. Dat is een verbetering ten opzichte van het scheidend vermogen van het lichtmicroscop met een factor 1000 maal en ten opzichte van dat van het ongewapend oog met een factor 400.000 maal.

Het werkingsprincipe van het TEM hebben we reeds besproken. Het beeld wordt gevormd op een fosforiserend scherm dat onder invloed van de elektronenbestraling zichtbaar licht uitzendt of rechtstreeks geregistreerd op een fotografische plaat. Een contrastrijk beeld komt tot stand, doordat sommige delen van het preparaat de elektronen van de bundel onveranderd doorlaten, terwijl andere delen van het preparaat elektronen verstrooien, dat wil zeggen zodanig vertragen of van richting veranderen dat ze niet meer op het beeldscherm terecht kunnen komen.

De meeste biologische objecten hebben een uitgebreide en zorgvuldige bewerking nodig, voordat ze als preparaat geschikt zijn voor bestudering. Allereerst dienen de uiteindelijke preparaten zo dun te zijn dat ze voldoende elektronen onveranderd door laten ten behoeve van de beeldvorming. Tegelijkertijd echter moeten de structuren die men wil waarnemen, voldoende elektronen uit de bundel verstrooien, om aldus voldoende contrastrijk in het gevormde beeld zichtbaar te zijn. Het probleem daarbij is dat biologisch materiaal meestal overwegend is opgebouwd uit slechts een beperkt aantal

soorten atomen met laag atoomnummer die alle een ongeveer gelijk en relatief gering elektronen-verstrooiend vermogen hebben, terwijl bovendien de dichtheid in het materiaal overal ongeveer even groot is.

Tenslotte moet het object bestand zijn tegen verblijf in bijna luchtledigheid en tegen bestraling met elektronen.

Een van de meest gebruikte methoden is het vervaardigen van ultradunne doorsneden, z.g. coupes van materiaal dat vooraf gefixeerd, gecontrasteerd, gedroogd en ingebed is.

Met het fixeren wordt beoogd, de structuur van het levende materiaal met zo weinig mogelijk veranderingen zodanig vast te leggen dat het de daarop volgende behandelingen en de bestudering met het elektronenmicroscoop zonder beschadigingen kan doorstaan. Wat betreft fixatie met chemische middelen zijn daarbij tot nu toe de beste resultaten bereikt met aldehyden, in het bijzonder met glutaardialdehyde. De fixerende werking van de aldehyden berust op hun vermogen bindingen aan te gaan met zijgroepen van proteïneketens en hun vermogen deze zijgroepen onderling te verbinden. Glutaardialdehyde heeft daarnaast het vermogen om via aldolcondensaties polymeren te vormen die zelfs tussen ver van elkaar gelegen zijgroepen van proteïneketens, zeer complexe dwarsverbindingen tot stand kunnen brengen. Dit leidt tot een goede conservering van, met name de

tertiaire en quaternaire structuur van eiwitten, waarvan vele als bouwelement in levende materie een belangrijke functie vervullen.

Het contrasteren houdt in dat aan de zichtbaar te maken celonderdelen elementen met een hoog atoomnummer, bijvoorbeeld zware metalen, gebonden worden die een sterk verstrooiende werking op elektronen hebben. Een van de meest toegepaste contrasteringsmiddelen is osmiumtetroxyde, waarvan bekend is dat het reageert met alle belangrijke chemische componenten van de cel, waardoor het gebruikt kan worden om de meeste celstructuren zichtbaar te maken. Dit is vooral van belang bij beschrijvend, inventariserend onderzoek, waarbij het gaat om informatie over de ultrastructuur als geheel en onderzoek, waarvan het doel is veranderingen in de ultrastructuur, bijvoorbeeld tijdens de ontwikkeling van cellen, vast te stellen. Een belangrijk nadeel van osmiumtetroxyde is dat het gebruik als specifiek contrasteringsmiddel bijna geen informatie oplevert ten aanzien van de lokalisatie van specifieke chemische componenten.

Het vervaardigen van ultradunne doorsneden levert, op zichzelf genomen, thans geen onoverkomelijke problemen meer op. We beschikken daarvoor over geavanceerde hulpmiddelen, zoals ultramicrotomen en glas- of diamantmessen die het mogelijk maken routinematig met grote reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid coupes te snijden.

met een dikte instelbaar tussen 5 en 150 nm. Vooraf echter dient het biologisch object eerst snijbaar gemaakt te worden. Dit gebeurt door het object, na zorgvuldig ontwateren, te impregneren met een vloeibaar inbedmiddel dat men vervolgens hard laat worden, waardoor een massief en hanteerbaar geheel ontstaat. Als inbedmiddel worden veelal plastic soorten, met name epoxyharsen gebruikt, enerzijds vanwege hun uitstekende snijkwaliteiten en stabiliteit in het elektronenmicroscoop, en anderzijds omdat ze weinig of geen eigen structuur vertonen die interfereert met de structuur van het object.

Het is vooral het transmissie-elektronenmicroscopisch onderzoek van coupes geweest dat heeft geleid tot een aanzienlijke uitbreiding, verdieping en detaillering van onze kennis en van ons inzicht in de structuur, organisatie en ontwikkeling van cellen en weefsels. De cel, omgeven door een grenslaag, het plasmamembraan, blijkt een uiterst gecompliceerd systeem te zijn met een overvloed aan intracellulaire structuren, zoals membranen, fibrillen en partikels. De celinhoud is door membranen in talloze compartimenten, celorganellen, opgedeeld en elk type celorganel heeft zijn eigen specifieke vorm, grootte en structuur.

Door combinatie met biochemische technieken, met name de celfractioneringsmethode, kon worden aangetoond dat elk type celorganel een specifieke functie vervult in

het metabolisme, het complex van biochemische reacties van de cel. De membranen die de verschillende celorganellen omgeven, functioneren daarbij als grenslagen, waardoor de diverse stofwisselingsprocessen gescheiden van elkaar verlopen en tevens gereguleerd kunnen worden.

Slechts door een hoge mate van ordening binnen de cel en de celorganellen, en door het aanbrengen en handhaven van doelgerichte ruimtelijke relaties tussen de verschillende compartimenten wordt een optimale functie van de cel gewaarborgd. De vraag naar de wijze waarop een cel functioneert hangt derhalve onverbrekkelijk samen met de vraag naar de structuur van de cel.

De celorganelpopulatie, het geheel van celorganellen, blijkt sterk te variëren in samenstelling, afhankelijk van de functie van de cel. Ook tijdens de ontwikkeling van een cel treden aanzienlijke veranderingen op in aantal, structuur, vorm en rangschikking van de diverse celorganellen, in relatie met veranderende functionele activiteiten.

Ter illustratie wil ik u een aantal ultrastructurele veranderingen tonen die optreden tijdens de kieming van pollenkorrels op de stempel en de vorming en groei van de pollenbuis. Bij deze plantesoort, *Impatiens*, bestaat de rijpe pollenkorrel uit twee cellen, en wel een zogenaamde vegetatieve cel en een generatieve cel. Het is de vegetatieve cel die uitgroeit tot een pollenbuis en de generatieve cel, die zich later deelt in

twee gameten, transporteert naar de vrouwelijke geslachtscel.

In het stadium van de rijpe pollenkorrel bevat het cytoplasma van de vegetatieve cel talrijke celorganellen die regelmatig verspreid liggen. Er is een groot aantal mitochondriën, organellen die een functie hebben bij de energie-huishouding van de cel; dictyosomen, organellen die onder andere een rol spelen bij de produktie en het transport van celwandmateriaal; plastiden met zetmeelkorrels, gericht op de opslag en verwerking van reservestoffen, en vetdruppels.

Opvallend echter is het grote aantal kleine vacuolen; het verspreid daartussen liggend systeem van glad endoplasmatisch reticulum (ER), te beschouwen als intracellulair transportsysteem; en het zeer geringe aantal ribosomen, kleine partikels die betrokken zijn bij de produktie van eiwitten.

Tijdens de kieming van de pollenkorrel treedt een ontwikkeling op die resulteert in een polaire en zonale verdeling van de celorganellen in de pollenbuis.

In het topgedeelte van de pollenbuis bevinden zich voornamelijk kleine secretieblaasjes. Ze blijken koolhydraten te bevatten en een rol te spelen bij de vorming van de pollenbuiswand en uitbreiding van het plasmamembraan. Achter de top bevindt zich een zone met talrijke mitochondriën en grote complexen van glad ER. Dit laatste organel blijkt een rol te spelen bij de vorming van secretieblaasjes.

Achter deze zone komt een pollenbuisgedeelte met een gemengde organelpopulatie, waarin we naast de reeds genoemde onderdelen ook dictyosomen, plastiden en vacuolen waarnemen. De dictyosomen blijken in verbinding te staan met het glad ER en tezamen met de secretieblaasjes een complex systeem te vormen, gericht op produktie, transport en uitscheiding van celwandmateriaal.

Het resterende gedeelte van de pollenbuis en de pollenkorrel bevatten voornamelijk vacuolen. De diameter van de vacuolen is toegenomen en als gevolg van fusie zijn ook grote vacuolen ontstaan. De volumetoename van het totale vacuolesysteem, als gevolg van zwellings door wateropname, blijkt overeen te komen met de volumetoename van de pollenbuis en de stuwende kracht achter de pollenbuisgroei te zijn. Het, ook in de pollenbuis geringe aantal ribosomen wijst er op dat de produktie van eiwitten gering is en dat in dit geval de pollenbuisgroei niet gepaard gaat met toename van de hoeveelheid plasma.

Het inventariseren van celstructuren door middel van onderzoek van dunne coupes van gefixeerd en gecontrasteerd materiaal is een techniek die ook thans nog veelvuldig wordt toegepast, met name voor bestudering van die weefsels en processen die niet of nauwelijks geschikt zijn voor onderzoek met andere, bijvoorbeeld biochemische methoden.

Uit dergelijke ultrastructurele gegevens kan, door

interpretatie en vergelijking, een beeld verkregen worden van de wijze waarop een cel of weefsel functioneert of de wijze waarop een ontwikkelings- of levensproces verloopt.

Het beoordelen en interpreteren van ultrastructurele waarnemingen is echter geen eenvoudige zaak en kan gemakkelijk leiden tot onjuiste conclusies.

Zo moeten we ons goed realiseren dat het de afbeelding van de contrastmiddelen is die we waarnemen en niet het oorspronkelijke biologische materiaal en dat de structuur die we zien, die van een gefixeerde, gedode cel is en niet die van het levende object. Elke afzonderlijke waarneming is slechts een twee-dimensionale momentopname van een drie-dimensionaal dynamisch geheel.

Voor elk object en voor elke vraagstelling dient de onderzoeker steeds opnieuw proefondervindelijk vast te stellen welke methoden van fixeren en contrasteren de beste en gewenste resultaten geeft. Hoewel er voor het beoordelen van de kwaliteit een beperkt aantal objectieve, éénduidige criteria bestaan, zoals bijvoorbeeld het intact zijn van de celmembranen, zijn het vooral de kritische instelling en de ervaring van de onderzoeker die hierbij van doorslaggevende betekenis zijn.

Het gevaar is niet denkbeeldig dat dit soort elektronenmicroscopisch onderzoek vooral gezien en gebruikt wordt als middel, uitsluitend gericht op het verkrijgen

van fraaie plaatjes en interessante structuurbeschrijvingen.

In dat geval is er echter sprake van een ernstige en gevaarlijke misvatting. Het inventariseren en beschrijven van structuren is op zichzelf, hoe interessant ook, een steriele activiteit die geïsoleerd niet kan leiden tot het oplossen van essentiële wetenschappelijke problemen.

Slechts de bundeling van verschillende benaderingswijzen, de combinatie en integratie van ultrastructurele, chemische, biochemische en fysiologische gegevens, de koppeling van inventariserend en experimenteel onderzoek, kan uiteindelijk leiden tot optimale resultaten.

Rond 1960 is er door de Zwitsers Moore en Mühlethaler een methode ontwikkeld die het mogelijk maakt de ultrastructuur van cellen in levende toestand te bestuderen. Bij deze zogenaamde "vries-ets"-techniek wordt het object fysisch gefixeerd door zeer snelle afkoeling tot ongeveer -180°C . De warmte-afvoer dient daarbij zo groot te zijn dat het cellulaire water overgaat in amorf ijs, en er zich geen intracellulaire ijskristallen kunnen vormen die de structuren kunnen beschadigen. Het belangrijkste aspect daarbij is dat dergelijke diepgevroren cellen, na voorzichtig ontdooien hun normale levensfuncties, zoals celdeling, weer blijken te hervatten. Het fysisch fixeren door middel van snelle bevriezing leidt dus niet, zoals dat steeds onvermij-

delijk het geval is bij chemische fixatie, tot de dood van het biologisch object. Dit houdt in dat eventuele structuurveranderingen tijdens het invriezen in ieder geval reversibel en niet erg ingrijpend zullen zijn. Met andere woorden, de ultrastructuur van de cel, zoals we die kunnen leren kennen door vries-ets-onderzoek, zal de ultrastructuur van de levende cel zeer dicht benaderen.

Het ligt voor de hand dat de vries-ets-methode aanvankelijk vooral werd toegepast als middel om na te gaan in hoeverre het ultrastructureel beeld van de cel, zoals dat bekend was uit onderzoek van chemisch gefixeerd materiaal, werkelijk overeenkwam met dat van de levende cel. De resultaten van het vries-ets-onderzoek hebben dat beeld grotendeels bevestigd. In een latere fase is de vries-ets-methode geëvolueerd tot een techniek die vooral geschikt blijkt te zijn voor de bestudering van celmembranen. Deze toepassingsmogelijkheid hangt nauw samen met de manier waarop van het ingevroren materiaal preparaten vervaardigd worden. Het diepgevroren materiaal wordt namelijk opengespleten en van het slijtvlak wordt door bedamping met koolstof een afdruk gemaakt. Door van onder een hoek een dun laagje platina op te brengen, kunnen oneffenheden en structuren in het oppervlak van de koolafdruk gemarkeerd en zichtbaar gemaakt worden.

Opmerkelijk is dat bij het openspleten van biologisch materiaal het slijtvlak bij voorkeur het vlak van de

celmembranen volgt, waarbij deze membranen zelf steeds in twee helften worden gespleten, zodat zich in elk slijtvlak één membraanhelft bevindt.

In coupes van chemisch gefixeerd en gecontrasteerd materiaal zien we de membranen als lijnen, bestaande uit twee donkere en één centraal gelegen lichte laag. Dit symmetrisch "tramlijn"-beeld is relatief specifiek en geldt voor alle membranen in de cel, hoewel er enige variatie is in dikte van de verschillende lagen, afhankelijk van het membraantype. Het heeft mede de basis gevormd van de zogenaamde "Unit-membrane"-theorie, waarin gesteld wordt dat membranen zijn opgebouwd uit een centrale bimoleculaire laag van fosfolipiden, welke aan beide zijden bedekt is met een monomoleculaire laag van proteïnen.

In vries-ets-preparaten zien we de centraal opengespleten membranen als vlakken, waarop zich talrijke kleine partikels bevinden. Deze partikels konden worden geïdentificeerd als de membraan-proteïne-componenten. Opmerkelijk is dat het aantal partikels op corresponderende membraanhelften sterk verschilt, waarbij vrijwel altijd het aantal partikels op de membraanhelft die naar het plasma gekeerd is, aanzienlijk groter blijkt te zijn dan op de andere helft. Daarnaast is het aantal partikels, hun positie, afmetingen en onderlinge rangschikking specifiek voor elk membraantype. Een en ander heeft geleid tot het opstellen van aanzienlijk gewijzigde en meer gedetailleerde structuur-

modellen die meer in overeenstemming zijn met het specifieke karakter van de verschillende membraantypen, wat betreft chemische samenstelling en functionele eigenschappen, dan het klassieke "Unit-membrane"-model.

De vries-ets-methode heeft echter ook zijn beperkingen. Het zonder ijskristalvorming invriezen van grotere en waterrijke objecten, en jammer genoeg behoren hiertoe de meest plantaardige weefsels, is nogal problematisch en vaak zelfs onmogelijk, vanwege een te gering warmtegeleidend vermogen van het object zelf. In het biologisch onderzoek wordt de vries-ets-techniek dan ook hoofdzakelijk gebruikt voor de bestudering van kleine objecten, zoals sporen, pollenkorrels, protoplasten en geïsoleerde celorganellen.

Al vrij vroeg in de ontwikkeling van de transmissie-elektronenmicroscopie is gezocht naar methoden, waarmee specifieke chemische componenten en enzymatische reacties op ultrastructureel niveau konden worden gelokaliseerd. Het is een hoofdstuk waar nog voortdurend aan geschreven wordt en dat inmiddels een zeer gevarieerd scala van technieken omvat die globaal te groeperen zijn in drie categorieën:

1. Cyto-histochemische methoden,
2. Autoradiografische methoden,
3. Elektronen-diffractie.

Bij cyto-histochemische methoden wordt getracht de

chemische componenten of reactieproducten die men wil lokaliseren, direct zichtbaar te maken in het elektronmicroscopisch beeld. Men kan daarvoor gebruik maken van specifieke contrasteringsmiddelen, dat wil zeggen middelen die uitsluitend of bij voorkeur bindingen aangaan met de componenten die men wil lokaliseren. Ook kan men het object zodanig bewerken of onder zodanige omstandigheden contrasteren, dat bij gebruik van niet-specifieke contrasteringsmiddelen, de binding aan de te lokaliseren component wordt bevorderd en andere worden onderdrukt. Het is vooral deze laatste methode die wordt toegepast, omdat de meeste contrasteringsmiddelen bindingen kunnen aangaan met reactieve groepen die in meerdere verschillende chemische celcomponenten voorkomen. Aangezien de beschikbare tijd niet toelaat dat we het gehele fascinerende terrein van de cytochemie de revue kunnen laten passeren, zal ik mij beperken tot het kort bespreken van twee voorbeelden.

Het eerste voorbeeld is het selectief contrasteren en lokaliseren van koolhydraten. Bij deze methode worden dunne coupes van gefixeerd materiaal behandeld met perjoodzuur waardoor, als gevolg van oxydatie aan koolhydraten, vrije aldehyde groepen worden gevormd. Vervolgens wordt op de coupe een zilvermethenamine-oplossing aangebracht, waarbij als gevolg van reductie door de vrije aldehyde groepen een zeer fijnkorrelige neerslag van zilver op het preparaat ontstaat. Dit

zilverprecipitaat is zichtbaar in het elektronenmicroscopisch beeld en markeert de plaatsen waar zich vrije aldehyde groepen bevonden en daarmee tevens de positie van de gezochte koolhydraten.

Het tweede voorbeeld is een methode, waarmee een enzymactiviteit kan worden aangetoond en gelokaliseerd. Het gaat hierbij om het enzyme zuurfosfatase dat in staat is om van een aantal chemische verbindingen fosfaatgroepen af te splitsen. Het object wordt vooraf gefixeerd met glutaardialdehyde dat, zoals reeds eerder werd opgemerkt, vooral de structuur van proteïnen, dus ook enzymen, stabiliseert en wel zodanig dat de enzymatische activiteit behouden blijft. Het gefixeerde object wordt vervolgens in een oplossing gebracht, waarin zich een substraat en een oplosbaar loodzout bevinden. Het enzym zuurfosfatase splitst van het substraat fosfaatgroepen af en deze fosfaatgroepen reageren met de loodionen in de oplossing, waardoor loodfosfaat ontstaat dat onoplosbaar is en neerslaat in de vorm van een zeer fijnkorrelig precipitaat. Het loodprecipitaat is zichtbaar in het elektronenmicroscopisch beeld en markeert de plaatsen waar fosfaatgroepen zijn vrijgekomen en daarmee de positie van het gezochte enzym.

Bij autoradiografische methoden maakt men voor het markeren en lokaliseren van chemische verbindingen gebruik van radio-actieve stoffen. Onder geschikte

fysiologische condities kan men bewerkstelligen dat dergelijke radio-actieve verbindingen door de levende cel selectief worden ingebouwd in bepaalde componenten. Van dit, we noemen het dan gemerkt of gelabeld, materiaal worden op de gebruikelijke wijze dunne coupes gemaakt, welke vervolgens bedekt worden met een zeer dunne laag fotografische emulsie. De radio-actieve stoffen in de coupe zenden straling uit die, als ze de fotografische laag raken, aanleiding geven tot de vorming van zilverkristallen. Coupe en fotografische laag worden, na ontwikkeling en fixatie van het fotografisch beeld, met het elektronenmicroscop bekeken. De plaats van de zilverkristallen in de fotografische laag markeert dan de plaatsen waar zich de radio-actieve stoffen bevinden en daarmee tevens de lokatie van de gelabelde verbinding in het object.

Elektronen-diffractie is een methode waarmee kristal-lijne en parakristalijne componenten in cellen en weefsels kunnen worden gelokaliseerd en waarmee de structuur en chemische aard van deze componenten kunnen worden bepaald. Het is een indirecte methode, waarbij niet de component zelf wordt afgebeeld, maar waarbij de afbuiging van de elektronen door de kristalvlakken op het beeldscherm zichtbaar wordt gemaakt in de vorm van een zogenaamd diffractie-patroon. Een dergelijk diffractie-patroon bestaat uit een regelmatige verzameling punten of concentrische ringen. De aard

van het patroon, de punten of ringen, de onderlinge afstanden en de rangschikking zijn de gegevens van waaruit de structuur en de chemische aard van de onderzochte component kan worden vastgesteld.

Een korte bespreking van technieken, zoals nu heeft plaatsgevonden, houdt het gevaar in dat de indruk wordt gewekt dat toepassing van deze technieken een eenvoudige en probleemloze zaak is. Dit is allerm minst het geval. Vaak zijn er zeer gecompliceerde bewerkingen nodig en dienen diverse controle-experimenten te worden uitgevoerd. Dikwijls zijn de waarnemingen niet één-duidig of gemakkelijk te interpreteren. Steeds moet men bedacht zijn op artefacten, veranderingen in de ultrastructuur, chemische samenstelling en organisatie van het object, veroorzaakt door de uitgevoerde behandeling. Ook hier geldt dat we uiteindelijk niet de levende materie waarnemen, maar een chemisch gefixeerd, gedood eindprodukt. Bovendien wordt altijd slechts een kort moment en een beperkt gedeelte van een complex levensproces vastgelegd.

Dames en Heren, een bespreking van de elektronenmicroscopie zelfs in de zeer summiere vorm, waarin het hier moet gebeuren, zou wel zeer onvolledig zijn als daarin geen aandacht werd geschonken aan het raster-elektronenmicroscop (REM), de tweede peiler waarop het biologisch ultrastructureel onderzoek is gebaseerd. Het REM is een instrument dat voornamelijk gebruikt wordt

om oppervlaktestructuren van vaste voorwerpen te bestuderen en het behoort tot de familie van de aftastende instrumenten, zoals radar en sonar. Met het REM wordt thans een scheidend vermogen bereikt van ongeveer 5 nm, dat is weliswaar een factor 25 maal minder dan met het TEM bereikt wordt, doch het betekent altijd nog een verbetering ten opzichte van het lichtmicroscop met een factor 40 maal en ten opzichte van het ongewapende oog met een factor 20.000 maal.

Het principe van de raster-elektronenmicroscopie was al in de dertiger jaren bekend, vooral door het werk van Knoll en Von Ardenne. Technische moeilijkheden en mogelijk ook de enorme belangstelling voor het TEM hebben echter de ontwikkeling van het REM tot een operationeel laboratoriuminstrument tegengehouden tot 1965. Het werkingsprincipe is relatief eenvoudig. In een hoogvacuüm worden snelle elektronen door elektromagnetische lenzen gebundeld tot een straal met een uiterst kleine diameter. Met behulp van een afbuigspoel wordt met deze fijne bundel het te onderzoeken oppervlak afgetast volgens een rechthoekig rasterpatroon. Waar de snelle, zogenaamde primaire elektronen van de aftastende bundel het object raken, wordt een nieuwe generatie langzamere, zogenaamde secundaire elektronen vrijgemaakt, waarbij de hoeveelheid afhankelijk is van de invalshoek van de aftastende bundel en de chemische samenstelling van het object.

Tegelijkertijd wordt met een tweede bundel elektronen,

de zogenaamde schrijvende bundel, een fluorescerend scherm bestraald, waarop dan een, voor het oog zichtbaar beeld ontstaat. Dit bestralen met de schrijvende bundel gebeurt eveneens volgens een rasterpatroon dat overeenkomt met dat van de aftastende bundel, zodat beide bundels zich synchroon bewegen. Het beeld wordt dus, als bij een televisiebeeld, punt voor punt op het scherm opgebouwd.

Door de hoeveelheid secundaire elektronen te meten en te gebruiken als signaal voor het regelen van de intensiteit van de schrijvende bundel, wordt in het beeld op het fluorescerend scherm contrast verkregen dat de oppervlaktestructuur van het onderzochte object weergeeft. Het scheidend vermogen van het systeem wordt bepaald door de diameter van de aftastende bundel, terwijl de vergroting bepaald wordt door de verhouding tussen de grootte van het afgetaste gebiedje en de afmetingen van het beeldscherm.

Net als bij transmissie-elektronenmicroscopie dienen ook bij raster-elektronenmicroscopie de objecten bestand te zijn tegen verblijf in bijna luchtledigheid en tegen bestraling met elektronen, terwijl tevens een voldoende elektronengeleidend vermogen noodzakelijk is. Aanvankelijk werd het REM dan ook vooral gebruikt voor bestudering van breukvlakken in metalen en voor onderzoek van biologische objecten die van zichzelf reeds voldoende stevigheid bezaten, zoals

pollenkorrels, hout en insekten.

Door de ontwikkeling van speciale prepareertechnieken, zoals kritisch puntdrogen en opdampen van goud, is het echter mogelijk geworden ook wekere delen van plantaardig en dierlijk materiaal te bestuderen.

Inmiddels is het raster-elektronenmicroscop geëvolueerd tot een instrument waarmee niet alleen bestudering van oppervlaktestructuren mogelijk is, maar dat tevens gebruikt kan worden voor chemische analyse en lokalisatie van chemische bestanddelen.

Men maakt daarbij gebruik van het natuurkundig verschijnsel dat chemische elementen, bij bestraling met snelle elektronen, röntgenstraling uitzenden met een voor elk element karakteristiek golflengte en energie-spectrum. Door analyse van de uitgezonden röntgenstraling, hetzij wat betreft energie-spectra (men spreekt dan van EDAX of energie-dispersieve analyse), hetzij naar golflengte (WDAX of golflengte-dispersieve analyse), kunnen kwalitatieve en kwantitatieve gegevens verkregen worden ten aanzien van de chemische samenstelling van het preparaat en kan de aanwezigheid en plaats van chemische elementen worden vastgesteld.

Geachte toehoorders. In deze openbare les heb ik getracht u een beeld te scheppen van de ontwikkeling van de microscopie, zowel wat betreft de apparatieve alsook de preparatieve aspecten, om u een indruk te geven van het geweldige waarnemingsvermogen waarover de bioloog

met zijn oog heden ten dage kan beschikken. Het ziet er naar uit dat het eindpunt van deze ontwikkeling nog lang niet bereikt is. Nog voortdurend worden de bestaande typen elektronenmicroscopen en hulpapparatuur technisch verbeterd, worden nieuwe preparatieve methoden ontworpen, en wordt gewerkt aan de ontwikkeling van nieuwe apparatuur.

Een voorbeeld van dit laatste is de zeer recente ontwikkeling van een nieuw type elektronenmicroscop, het zogenaamde scanning-transmissie-elektronenmicroscop (STEM) en de ontwikkeling van de cryo-ultramicrotomie. Het werkingsprincipe van het STEM komt in hoofdlijnen overeen met dat van het raster-elektronenmicroscop. Ook hier wordt het preparaat volgens een rasterpatroon afgetast met een zeer fijne bundel snelle elektronen en wordt het beeld puntsgewijs opgebouwd. Het beeldvormende signaal wordt nu echter verkregen door meting van de hoeveelheid elektronen die door het preparaat op elke bestraalde plaats verstrooid worden. Dit systeem maakt het mogelijk ook van dikkere doorsneden van niet-gecontrasteerd biologisch materiaal goede contrastrijke beelden te verkrijgen.

Het vervaardigen van preparaten kan daardoor aanzienlijk vereenvoudigd worden en een aantal, vaak ingrijpende en mogelijk structuur-veranderende bewerkingen, kunnen achterwege blijven. Door combinatie met röntgen-analytische methoden bestaat tevens de mogelijkheid op directe wijze ultrastructurele gegevens en infor-

matie over chemische samenstelling met elkaar te vergelijken en aan elkaar te relateren.

Bij de Cryo-ultramicrotomie wordt, evenals bij de vries-ets-techniek, het biologisch object gefixeerd door snelle bevroering en van het diepgevroren materiaal worden met behulp van gekoelde ultra-microtomen en glasmessen dunne coupes gesneden. Het grote voordeel is ook hier, evenals bij de vries-ets methode, dat de in de diepvries-coupe waarneembare ultrastructuur minder zal afwijken van die van het levende object, dan het ultrastructurele beeld dat we waarnemen in coupes van chemisch gefixeerd, gedood materiaal.

Jammer genoeg is de cryo-ultramicrotomie door allerlei kinderziekten en technische problemen nog niet werkelijk operationeel.

Van zo mogelijk nog groter belang echter is de verdere ontwikkeling van preparatieve, met name histo- en cytochemische technieken, omdat juist deze technieken zo bepalend en verruimend zijn voor de toepassingsmogelijkheden en bruikbaarheid van de elektronenmicroscopie bij het biologisch onderzoek.

Het beschikbaar zijn van middelen en methoden is echter nog geen garantie voor verantwoord en vruchtbaar onderzoek.

Steeds meer dringt zich, dwars door de gevestigde disciplines heen, de object- en probleemgebonden wetenschapsbeoefening op de voorgrond. Meer en meer vindt de

oplossing van een probleem plaats door samenwerking van verschillende specialisten. Aan deze ontwikkeling ligt het besef ten grondslag dat slechts de bundeling van verschillende benaderingswijzen kan leiden tot optimale resultaten; geen ervan is immers in staat om geïsoleerd van de anderen een volledig antwoord te geven. Dat wil niet zeggen dat de onderscheidingen tussen de verschillende vakgebieden moet worden opgeheven. Integendeel, iedere onderzoeker zal slechts in zijn eigen vakgebied de resultaten volledig kunnen interpreteren. Slechts de specialist zal de grens tussen mogelijkheden en beperkingen van zijn techniek op een verantwoorde wijze kunnen aangeven. Zij zullen zich er echter bewust van moeten zijn dat ook, en vooral in de wetenschap intensieve onderlinge contacten bevruchtend kunnen werken en er naar moeten streven in organisatorisch opzicht de voorwaarden te scheppen om tot deze contacten te komen.

Een niet onbelangrijk aspect van elektronenmicroscopisch onderzoek zijn de zeer hoge kosten die eraan verbonden zijn. De inrichting van een elektronenmicroscopisch laboratorium en aanschaf van apparatuur vergt vele tonnen en terughoudendheid van bestuurlijke zijde is dan ook zeer begrijpelijk. Dat desondanks het elektronenmicroscopisch onderzoek ook aan de Landbouwhogeschool in Wageningen, zij het op bescheiden schaal in vergelijking met andere instellingen van wetenschap-

pelijk onderzoek en onderwijs kan plaats vinden, betekent een erkenning van het belang van deze techniek voor het biologisch- en landbouwkundig onderzoek, dat zo vaak een biologisch(e) karakter en basis heeft. Het instellen van een adviescommissie voor de elektronenmicroscopie door het College van Bestuur mag gezien worden als een uiting van haar bereidheid om op basis van een goede organisatie en verantwoord gebruik voldoende faciliteiten ter beschikking te stellen.

Aan het eind van mijn voordracht dank ik Hare Majesteit de Koningin voor mijn benoeming tot lector aan de Landbouwhogeschool.

Het College van Bestuur van de Landbouwhogeschool wil ik gaarne dank zeggen voor het in mij gestelde vertrouwen. Tevens wil ik mijn erkentelijkheid uitspreken voor het feit dat zij, ten behoeve van het botanisch ultrastructureel onderzoek, de middelen beschikbaar heeft gesteld voor de installatie van een transmissie-elektronenmicroscop in het Botanisch Laboratorium. De afdeling Financiële en Economische Zaken en de afdeling Bouwzaken dank ik voor de interesse, de steun en de prettige samenwerking die de vakgroep bij de realisatie van haar plannen mocht ontvangen.

Hooggeleerde Willemse, waarde Michiel,
Dames en Heren medewerkers van de vakgroep Plantkunde,
aan ons is de verzorging van onderwijs en onderzoek in

de Plantkunde toevertrouwd. Een van oudsher ruim vakgebied dat inmiddels is begrensd en de plantencytologie, -anatomie en -morfologie omvat. We beschikken thans over de middelen om het onderwijs en het onderzoek in dit wetenschapsgebied op moderne wijze en op verantwoord niveau uit te voeren.

Voor een optimale uitoefening van onze taak is het goed om te realiseren wat onze positie en functie binnen de Landbouwhogeschool is. Daarbij blijkt dat voor de meeste landbouwkundige studierichtingen en vele vakgebieden de plantencytologie, -anatomie en -morfologie een belangrijke en onmisbare basiswetenschap is. De vakgroep is zich van deze positie zeer wel bewust en houdt er dan ook ernstig rekening mee bij de inrichting van haar onderwijs en de keuze van haar onderzoeksprojecten. Het is zaak dat ze zich deze relatie voortdurend blijft realiseren en open staat voor het contact met anderen om aldus steeds optimaal te blijven functioneren.

Dierbare ouders,

Het stemt mij gelukkig en dankbaar dat u beiden in goede gezondheid deze ambtsaanvaarding kunt bijwonen. Al vroeg heeft u in mij de belangstelling voor de levende natuur gewekt en niets was u teveel, om mij in de gelegenheid te stellen biologie te studeren. Dat u, vader, zich als plantenkweker, enerzijds zeer belangstellend en anderzijds zeer kritisch opstelde ten aanzien van de praktische toepasbaarheid van

biologische kennis en inzicht, betekende voor mij een leerschool, die mij thans als bioloog aan een op praktische toepassing ingestelde Landbouwhogeschool regelmatig van pas komt.

Hooggeleerde Linskens,

U hebt, als geen ander een stempel gedrukt op mijn ontwikkeling als bioloog. Onze eerste ontmoeting vond plaats tijdens het eerstejaars practicum plantenanatomie, toen u met elke student persoonlijk kennis maakte. Dat dit mogelijk was, is ongetwijfeld mede te danken aan het feit dat het aantal studenten in die tijd nog gering was. Het is echter tevens typerend voor uw warme, menselijke belangstelling en persoonlijke betrokkenheid voor het lot van de aan uw zorg toevertrouwde studenten. Uw brede belangstelling, ook voor zaken buiten het vakgebied, uw elan en inzet, uw visie en inzicht vormen voor mij nog steeds een lichtend voorbeeld. Voor uw persoonlijke en creatieve begeleiding wil ik u gaarne danken.

Zeergeleerde Sassen, beste André,

Mijn eerste schreden op het pad van de submicroscopische morfologie en de elektronenmicroscopie heb ik onder jouw leiding gezet. Voor de prettige samenwerking en het nog steeds vruchtbare contact ben ik je zeer dankbaar.

Dames en Heren studenten,
Overdracht van kennis gericht op het verwerven van in-
zicht is een belangrijk onderdeel van uw opleiding.
De opleiding tot wetenschapsbeoefenaar houdt tevens in,
dat u leert zelfstandig nieuwe kennis te vergaren als
basis voor de verdieping en verbreding van uw inzicht.
Het is in dat verband essentieel dat u tijdens uw
studie zoveel mogelijk ervaring opdoet met een zo breed
mogelijk scala van technieken, en de mogelijkheden en
onmogelijkheden ervan leert kennen. Ik hoop dat u ook
de weg weet te vinden naar de vakgroep Plantkunde en
kennis maakt met de submicroscopische morfologie en
de daaraan ten grondslag liggende elektronenmicroscopische
technieken. Gaarne zal ik u daarbij terzijde
staan.

Dank voor uw aandacht.