

Herinneringen aan Rob

In Engeland en de Verenigde Staten zie je steeds vaker bijeenkomsten waarbij het leven van een overledene wordt “gevierd”. Ik heb meerdere malen meegemaakt dat zo’n zes tot twaalf maanden na het overlijden een bijeenkomst wordt gehouden, een soort symposium waarbij collega’s en vrienden in een gehoorzaal napraten over de wetenschappelijke kant van de overledene (meestal een coryfee). Ik vind dat een mooie gewoonte. “To celebrate someone’s life” lijkt meer algemeen opgang te vinden, zelfs als ritueel bij een begrafenis “to put fun in the funeral”. Dit nieuwe gebruik spreekt mij niet aan omdat het overlijden van een familielid, vriend of goede bekende een ellendige zaak is waarbij er niets valt te vieren. Maar in tegenstelling tot deze sombere woorden heb ik ervaren dat het ophalen van de veelal zeer plezierige herinneringen een troost gevende bezigheid kan zijn met af en toe een lach. En zo is het mij vergaan in de week na Rob’s overlijden waarbij ik ’s avonds aan en na tafel herinneringen ophaalde en Fernande dan af en toe een vraag stelde van hoe zat dat dan? Zo zijn we er de hele week voor de begrafenis mee bezig geweest. Dit stukje is het vervolg op deze eerste overpeinzingen die vervolgens weer nieuwe herinneringen hebben opgeroepen.

Hoe het begon

Mijn eerste herinneringen aan Rob stammen uit 1967. Ik had net mijn hoofdvak biochemie afgerond en was op zoek naar een laatste praktijk-bijvak voor mijn doctoraal dat farmacologie zou worden. Ik had eerder dat jaar al een lezing van Otto Wolthuis bijgewoond op het Laboratorium voor Pharmacologie in Leiden, farmacologie werd toen nog met ph geschreven. Indirect heeft dat ertoe geleid dat ik reeds in mijn studietijd in Rijswijk ben beland. Het was voor mij een geheel andere wereld dan het lab in Leiden. In het Medisch Biologisch Laboratorium werd veel afgekort met drie letters, dus het was het MBL. Mensen die daar werkten waren dus MBL-ers. Over de directeur werd uitsluitend gesproken als “JAC” en de onderdirecteur werd aangeduid als “EMC”. Beiden waren professor in Leiden en ze heetten allebei Cohen.

EMC die wij gewoon Ernst noemden was naast plaatsvervangend directeur tevens buitengewoon hoogleraar farmacologie in Leiden. En zo kwam het dat ik op zoek naar een bijvakplaats voor farmacologie bij hem te rade ging. Omdat ik bij mijn hoofdvak biochemie al onderzoek gedaan had bij een promovendus (Datus Voorhorst) die acetylcholine en acetylcholinesterase in synaptosomen in hersenen bestudeerde lag het voor de hand dat Ernst de naam van Rob noemde als iemand die in Rijswijk ook in acetylcholine geïnteresseerd was.

En zo belandde ik medio 1967 op Rob’s werkkamer voor een eerste gesprek, Rob 41 jaar oud en ik 22. Ik vertelde wat ik had gedaan met synaptosomen, zuivering van synaptische blaasjes op sucrosegradiënten in ultracentrifuges en verschillende enzymbepalingen. Rob

toonde zich zeer geïnteresseerd en vond dat allemaal reuze knap. En ik voelde mij een hele piet. Rob stelde zich zeer bescheiden op -dat deed hij wel vaker zo zou ik later zien- en ik kon toen nog niet vermoeden dat ik sprak met de ontdekker van de presynaptische transmitter receptoren. Ook daarover later meer. Hoe dan ook, het besluit was toen snel genomen om mijn bijvakstage bij Rob te doen. Toen ik in het voorjaar 1968 afstudeerde zat mijn stage bij Rob erop plus een tentamen farmacologie bij Ernst die op de kamer naast het lab van Rob zijn kantoor had. Ik trouwde eind april en in mei moest ik in dienst. Gelukkig was geregeld dat ik op het MBL kon blijven als gedetacheerd dienstplichtige en ook was geregeld dat ik in die tijd kon beginnen met mijn promotieonderzoek met Ernst als promotor. Mijn verblijf op het MBL en de samenwerking met Rob zou dus van langere duur zijn.

Rob's werkkamer en het lab

Grenzend aan het lab was het kantoor van Rob met een bureau en een zijtafel waarop een waterkoker stond om thee te zetten. Rob hield van goede thee en meende dat het van groot belang was om zacht water te gebruiken bij het thee zetten. Om het water zacht te maken liet hij het water lang doorkoken, en lang betekent hier echt heel lang¹. Zette de koker dus nog een paar keer aan tot het eerder op een Turks bad leek dan op een fatsoenlijk kantoor. Daarbij waren wij allebei pijprokers zodat de tabaksrook zich mengde met de stoomwolken. O ja, Rob had toen een merkwaardige pijp waarvan je de houten kop kon afschroeven van de steel die uitmondde in een cupje van aluminium met een schroefdraad voor de houten kop. Op de bodem van dit kelkje plaatste Rob dan een zorgvuldig gefabriceerd rondje, een afgeknipt stuk pijpenrager, teneinde condensvocht op te vangen. Ondanks deze voorzorgen begon Rob's pijp spoedig weer te pruttelen waar ik veel plezier in had omdat ik van dergelijke narigheid geen last had. Mijn pijp was namelijk van briar hout gemaakt.

Het lab was anders uitgerust dan een standaard lab met een "bench". Er waren twee zuurkasten met in het midden van de ruimte een tafel waarop een waterbad stond voor de incubatie van de hersenplakjes (zie onder) en een aangrenzende lage tafel voor het prepareren van de bloedzuigers en het snijden van de hersenplakjes. Aan de raamzijde stonden twee lage tafels waarop de apparatuur stond voor de bioassay voor de meting van acetylcholine. Het afwegen van chemicaliën voor de proeven gebeurde in een tussenruimte. Af en toe kwam de hoofdanaliste Lisa Mobach het lab binnen om te vragen wie had vergeten de balans schoon te maken. Rob geen fan zijnde van Lisa had het op dergelijke interrupties niet zo begrepen.

Rob en acetylcholine

Al het onderzoek draaide om acetylcholine, de signaaloverdrachtsstof tussen zenuwen in de hersenen, het ruggenmerg, het autonome zenuwstelsel en de overgang van de motorische

¹ Hard water bevat calcium bicarbonaat. Door koken wordt dit omgezet in calcium carbonaat dat onoplosbaar is in water en zich afzet als kalksteen in de koker. Door koken wordt water dus wat zachter.

zenuw naar de spier. Verderop in dit stuk zal ik meer vertellen over het onderzoek van Rob en in het bijzonder over zijn ontdekking van de presynaptische receptoren van acetylcholine in de cortex van de hersenen. Hier zal ik eerst stil staan bij de methoden om acetylcholine te meten. Dit was namelijk geen gemakkelijke zaak zoals dadelijk zal blijken met verstrekkende gevolgen voor de respectievelijke werkvloeren van de betrokken onderzoekers (MBL en Farmacologie Leiden). Er waren dagen dat Rob en ik over niets anders spraken, over de problemen die zich voor konden doen om de uiterst geringe hoeveelheden acetylcholine betrouwbaar te meten. Het was vaak acetylcholine bij het ontbijt en acetylcholine bij het tandenpoetsen. En eenmaal van het lab thuisgekomen hebben we er veel over getelefoneerd vooral in de tijden van de massaspectrometer.

Allereerst was er de bloedzuiger, de “medicinale” bloedzuiger, *Hirudo medicinalis*. Er waren in de beginperiode wel chemische methoden om acetylcholine te meten maar die waren bij lange na niet gevoelig genoeg om de minuscule hoeveelheden acetylcholine te detecteren die door zenuwweefsel door elektrische of chemische stimulatie worden vrijgesteld. Later is dit wel veranderd maar in de zestiger jaren was er maar één methode, namelijk de zogenaamde bioassay. Hierbij werd gebruikgemaakt van de acetylcholine-receptoren die zich bevinden in de buikspier van de kikker of in het geïsoleerde hart van een schelpdier (*Venus mercenaria*). Acetylcholine kon ook worden gemeten met een *in vivo* methode, namelijk de verlaging van de bloeddruk van de kat. Ook de rugspier van de bloedzuiger bleek zeer gevoelig voor acetylcholine en had het voordeel dat die van alle bioassay's het nauwkeurigst was. De *Venus mercenaria* was nóg gevoeliger maar had als nadeel dat onderzoekers die zich op dit terrein begaven spoedig vervielen in een toestand van totale waanzin, aldus Dick Meeter die dit elders had gehoord. Dat was namelijk een uiterst grillig preparaat.

Rob bewaarde de bloedzuigers in grote plastic bakken gevuld met leidingwater in de koude kamer (4°C) om hun metabolisme te remmen, door de kou konden ze langer mee. We konden die beestjes immers bezwaarlijk ons eigen bloed als voeding geven. Rob gaf de bloedzuigers rattenlevers te eten maar dat werkte niet best en daarbij gaf het ook veel rommel in de bak. Om de stakkers toch wat anders te eten te geven heeft Rob nog even in een overmoedige bui overwogen om de bloedzuigers op de nek van zijn analiste te zetten maar zag daar toch van af omdat dat onpraktisch was.² Als de proef gedaan was (zie later onder “*de lol van de proef*”) moest het acetylcholine in de incubaten en extracten van de hersenplakjes worden gemeten, een proces dat een kleine week in beslag nam. Zodoende waren we ongeveer 80% van de tijd bezig niet aan het doen van experimenten zelf maar aan het meten van het acetylcholine. Het was dus een zeer arbeidsintensief proces. Maar het werkte en werkte zelfs zeer goed. Aldus begon zo de werkdag dat Rob of ik gewapend met een bovenmaatse pincet van 30 cm lang richting koude kamer ging om twee bloedzuigers te pakken om vervolgens deze heftig kronkelende engerds op een tegel van kurk naar het lab te brengen. Vervolgens prepareerden we van de beestjes de rugspieren vrij die we dan in

² Maurice Israël, onze collega in Parijs, kocht zijn bloedzuigers gewoon bij de apotheek. Anno 1971 was er in Frankrijk kennelijk nog vraag naar bloedzuigers vanwege de heilzame werking van aderlaten.

langwerpig glazen buisjes gevuld met fysiologische vloeistof monteerden, aan de onderkant met een touwtje aan een oogje vastgeknoopt en aan de bovenkant aan een touwtje dat was verbonden met een subtiel hefboommechanisme. Dit was praktisch wrijvingsloos verbonden met een naaldvormig uiteinde waarmee een beroete trommel kon worden beschreven. Het was in feite een klassieke farmacologische opstelling.³ Het fabriceren van dergelijke beroete trommels was trouwens een hele happening. Met plakband werd ivoorpapier bevestigd op een verticale koperen trommel die vervolgens werd beroet met een bunsenbrander. Dit was geen ongevaarlijk karwij. De gastoevoer van de bunsenbrander werd geleid door benzeen waardoor een enorme roetpluim uit de brander kwam. Rob was buitengewoon behendig in het hanteren van de vlam-roetwerper, niet te kort en zeker niet te lang om het papier niet te verbranden Ik deed het 'm niet na.

Als de bloedzuigerspiertjes waren geprepareerd en gemonteerd begon zo na de koffie de feitelijke meetdag. Het principe van de bioassay is dat de spier als gevolg van het acetylcholine zich samentrekt, hoe meer acetylcholine hoe sterker de samentrekking van de spier en des te groter de "piek" die wordt geschreven op de beroete trommel die intussen langzaam ronddraait. Deze contractie-pieken van een testmonster worden vergeleken met contracties veroorzaakt door standaardhoeveelheden acetylcholine. De uiteindelijke kunst is om de contracties van de onbekende (het testmonster) in te klemmen tussen twee concentraties van de acetylcholine-standaard. Bijvoorbeeld als de contractie van de onbekende groter is dan 3 ng per milliliter maar kleiner dan 4 ng/ml dan is de meetwaarde 3,5 ng/ml. De kunst was om de ruimte van dit inklemmen zo klein mogelijk te maken, maar daar was een risico aan verbonden, namelijk als je misgokte en de "ruimte" te klein maakte dan zat je ernaast en moest je een nieuw concentratie-window proberen en was je zo een uur verder met je dag. Intussen liep een klok die ervoor zorgde dat de buisjes, waarin de spierstrips waren opgehangen, werden gespoeld; dit gevolgd door een contractieperiode, weer spoelen en rust en dan weer de volgende test, enzovoort. Dit waren perioden van 10 minuten dat je niets anders kon doen dan wachten. Deze tijd werd vaak benut met het haastig roken van een sigaret op Rob's kantoor dat slechts enkele meters van de bloedzuiger opstelling was verwijderd. Maar hier schuilde een gevaar, nicotine werkt net als acetylcholine op de bloedzuigerspier en het risico bestond dus dat met het pipetteren (dat in die dagen nog met de mond werd gedaan) nicotine van de tabaksrook de meting zou verstoren. Ook dit behoorde tot het ritueel van die dagen, roken, haastig uitdrukken, naar de wasbak om vluchtig de mond te spoelen en een laatste spurt om weer op tijd terug te zijn bij de opstelling want die draaide onverbiddeijk door. Er stonden twee opstellingen naast elkaar en elk van ons kon, als er geen tegenslagen waren, per dag in ongeveer zes monsters de hoeveelheid acetylcholine bepalen.

Toen ik in 1967 in Rijswijk kwam had Rob de bloedzuigeropstelling al in finesse uitgewerkt en gestroomlijnd en restte mij niets anders te doen dan snel de kunst te leren. Op dat

³ Er waren mensen die indertijd hun neus een beetje ophaalden voor dit farmacologisch gepruts, maar een groot farmacoloog en zeker geen prutser, Sir John Vane, heeft met soortgelijk bioassay's in 1982 de Nobelprijs voor Geneeskunde of Fysiologie gekregen (onder meer voor zijn werk aan prostaglandine en de werking van aspirine).

moment had Rob het meeste werk aan de hersenplakjes al gedaan met de vele honderden en honderden acetylcholine-metingen. Rob moet in de drie jaren sedert hij uit Mill Hill bij Feldberg terug was enorm hard hebben gewerkt op het MBL.

Toen kwam de massaspectrometer waardoor ons leven drastisch veranderde. In het begin van de zeventiger jaren verschenen er publicaties waar men acetylcholine (na door demethylering in de gasvormige toestand te zijn gebracht) met gaschromatografie kon scheiden en detecteren met een vlamionisatie detector. Ik had in mijn lab in Leiden in 1971 een gaschromatograaf aan kunnen schaffen maar de resultaten waren teleurstellend omdat de vlamionisatie-detectie niet gevoelig genoeg was en vooral omdat er na zuivering van acetylcholine uit biologisch materiaal nogal veel rommelige, storende pieken verschenen op het gaschromatogram waar de acetylcholine-piek in verdronk. Intussen was er op de markt een nieuwe massaspectrometer verschenen van het quadrupool type die was uitgerust met een gaschromatograaf die uitmondde in het vacuüm van de quadrupool. Kort door de bocht komt het erop neer dat de massaspectrometer het acetylcholine op massa sorteert waarbij de rommel waar ik eerder mee te kampen had gehad werd genegeerd. Dit systeem beloofde een hoge mate van selectiviteit van de meting gecombineerd met een grote gevoeligheid. Zo'n instrument moesten wij dus hebben voor ons werk. Een dergelijk apparaat was in mijn lab in Leiden ver boven mijn budget maar Rob slaagde erin met flink wat intern gelobby de aanschaf van de Finnigan quadrupool GC/MS voor elkaar te krijgen. De prijs was ongeveer Dfl. 300.000, een flinke som dus, zeker voor die tijd.⁴ Een ander voordeel was dat we met deze nieuwe methode, naast het radioactieve waterstof isotoop tritium, ook gedeutereerde isotopen konden toepassen wat van groot belang was voor onze metabolische studies. Het gaat voor dit stuk natuurlijk te ver om hier in detail op in te gaan. Ons nieuwe systeem bleek uiterst gevoelig te zijn, zodat het ook mogelijk werd de hoeveelheid acetylcholine te kunnen meten in biopten van menselijke spier afkomstig van patiënten met de spierziekte myasthenia gravis. En ook het acetylcholine in de spieren van de kikker en de rat want in de periode na 1975 zijn Rob en ik ons werk geleidelijk gaan verleggen om de acetylcholine-afgifte in de motorische eindplaten van de skeletspier te bestuderen.

Inmiddels was Rob verhuisd naar een ander lab in het MBL dat ook genoeg ruimte bood voor de GC-MS van Hewlett-Packard die rond 1980 was aangeschaft nadat de Finnigan door vele mankementen niet goed meer voldeed. De GC-MS van HP was een geavanceerd model en kostte nog een stuk meer dan de Finnigan, maar kennelijk kreeg Rob de aanschaf ervan toen vrij gemakkelijk voor elkaar. Op dit apparaat zijn uiteindelijk eindeloos veel acetylcholine-monsters getest, niet alleen door Rob en Ton van der Laaken, maar ook door mij en mijn analiste uit Leiden.⁵

⁴ Kennelijk had Rob intussen veel meer waardering gekregen voor zijn werk in het MBL dan ten tijde van het nozemen met JAC (zie ook later onder voetnoot 7).

⁵ Nadat Rob met pensioen was gegaan kon ik als collega uit Leiden natuurlijk niet langer werken met de HP die nu een nieuwe bestemming had gekregen in het MBL. In Leiden moest ik een alternatieve methode vinden om het acetylcholine te kunnen meten. Intussen was de high-performance liquid chromatography (HPLC) beschikbaar gekomen als methode door de promovendus Damsma in Groningen en die voldeed redelijk al kon

Rob's onderzoek

Na zoveel gezegd te hebben over het geduchte probleem om geringe hoeveelheden acetylcholine te kunnen meten is het hoog tijd geworden dat het onderzoek zelf aan bod komt.

Ver voor mijn komst in het MBL had Rob gewerkt aan het zenuwgas sarin waarvan het fosfor atoom radioactief was gemerkt (^{32}P). Na blootstelling van de rat aan het radioactieve sarin keek hij naar de verdeling van het radioactieve fosfor in bloed en de organen van de rat. Dit onderzoek is gepubliceerd samen met Ernst Cohen. Rob zei mij later dat hij dat onderzoek niet zo spannend had gevonden alhoewel het genoeg materiaal had opgeleverd om op te kunnen promoveren.

Voor "mijn tijd" in het MBL, in het begin van 1965, ik zelf zat toen nog midden in mijn studie biochemie, was Rob teruggekeerd uit Engeland waarbij hij in het lab van Feldberg in Mill Hill als *NATO Science Fellow* ruim een jaar had gewerkt. Dat moet een vruchtbare periode zijn geweest want er zijn 4 publicaties uit voortgekomen, de meeste samen met Beleslin, gepubliceerd in gerenommeerde tijdschriften, het *Journal of Physiology* en de *Proceedings of the Royal Society*. In dit onderzoek werd de afgifte van acetylcholine in hersenen van genarcotiseerde katten gemeten onder invloed van onder meer morfine, hyoscine en strychnine. Pure farmacologie dus. Het is dus in Mill Hill geweest dat Rob voor het eerst in aanraking is gekomen met de bioassay van acetylcholine op de ge-eseriniseerde rugspier⁶ van de bloedzuiger zoals oorspronkelijk in 1950 beschreven door MacIntosh & Perry. Deze techniek heeft Rob dus uit Engeland meegenomen en verder geperfectioneerd voor zijn baanbrekend werk aan presynaptische receptoren in de cortex van de rat. Het effect van hyoscine en atropine op de acetylcholine-afgifte in hersenventrikels van de levende kat leverde een wetenschappelijk interessant probleem op. Dit "probleem" heeft Rob mee teruggenomen om dit in Rijswijk verder uit te pluizen.

De overgang tussen twee zenuwen wordt synaps genoemd, een dunne onderbreking waarbij de prikkeloverdracht wordt verzorgd door een chemische stof (neurotransmitter) in plaats van door een elektrisch signaal. Voor we verder gaan is het voor het begrip van belang dat ik eerst iets uitleg hoe neurotransmitters worden afgegeven door de uiteinden van zenuwen en hoe hun werking wordt beëindigd. We weten nu dat na aankomst van een actiepotentiaal in het zenuwuiteinde, als gevolg van de depolarisatie de kanalen opengaan die selectief calciumionen uit het externe milieu toelaten tot het interne "sap" van de

ik er geen gedeutereerde acetylcholine-varianten mee meten. Later hebben we in Leiden nog veel profijt gehad met het meten van de acetylcholine-afgifte met behulp van de glazen micro-electrode waar de acetylcholine-receptor in de eindplaat als "detector" dienstdeed.

⁶ Eserine (physostigmine) is een remmer van acetylcholinesterase om te voorkomen dat het acetylcholine wordt afgebroken door dit enzym dat ook in de rugspier van de bloedzuiger voorkomt.

zenuw. Als gevolg van de werking van calcium op de zogenaamde synaptische vesikels, versmelten deze vesikels zich met het membraan van het zenuwuiteinde zodat hun inhoud van neurotransmitter wordt afgegeven. De volgende stap is dat de neurotransmitter de receptoren stimuleert zodat een elektrische prikkel wordt opgewekt in de volgende zenuw in het traject naar de uiteindelijke bestemming van het signaal (bijvoorbeeld de skeletspier of het hart). De beëindiging van de neurotransmitterwerking geschiedt in hoofdzaak op twee manieren, te weten een extern enzym dat de neurotransmitter onwerkzaam maakt of een proces van heropname door zenuwcellen als gevolg van een actief pompproces. Voor acetylcholine als neurotransmitter geldt dat alleen een enzym verantwoordelijk is voor de afbraak, namelijk het acetylcholinesterase, een enzym dat zó snel werkt dat het in minder dan een tiende van een milliseconde het acetylcholine dat is afgegeven afbreekt tot choline en azijnzuur, stoffen die de acetylcholine-receptor niet meer kunnen prikkelen. Indien het acetylcholinesterase wordt geremd, bijvoorbeeld met een zenuwgas, dan zijn de gevolgen dramatisch: het hart gaat stilstaan en de motorische spieren worden verlamd, het wordt donker voor de ogen en er is speekselvloed, symptomen die farmacologisch te verklaren zijn op basis van verstoring van acetylcholine-synapsen in ons zenuwstelsel. Dit was één van de taken van het MBL, namelijk de werking van deze zenuwgassen te bestrijden, of een tegengift te vinden. Rob's onderzoek van het zenuwgas sarin viel hieronder en, uiteindelijk, ook ons werk op de skeletspier omdat zenuwgassen primair hun toxische werking uitoefenen op de eindplaten van de skeletspier. De consequentie van dit is dat acetylcholine-afgifte uitsluitend gemeten kan worden als het acetylcholinesterase wordt geremd en wel voor de volle honderd procent anders wordt acetylcholine toch nog afgebroken voordat het in de badvloeistof kan worden opgevangen. Al onze proeven maakten dus gebruik van een remmer van het acetylcholinesterase en meestal was dit soman omdat dit zo krachtig werkt (en dus ook een bijzonder giftig zenuwgas is).

Presynaptische muscarine-receptoren. Er komen twee type acetylcholine-receptoren voor in de hersenen, de muscarine- en de nicotinereceptor, zo genoemd omdat muscarine, een toxische stof uit de vliegenzwam (*Amanita muscaria*), en nicotine uit het tabaksblad (*Nicotiniana tabacum*) deze receptoren kunnen stimuleren. Atropine is een zeer krachtige blokker van muscarine-receptoren terwijl curare effectief is om nicotine-receptoren te blokkeren. Rob had in Feldberg's lab waargenomen dat de afgifte van acetylcholine in hersenventrikels van de kat enorm toenam als het weefsel werd blootgesteld aan atropine of hyoscine. Beide stoffen zijn blokkers van muscarine-receptoren. Dit effect werd gezien zowel als hyoscine werd toegediend aan de perfusievloeistof van de ventrikels of via een intraveneuze route. In de publicatie in het *Journal of Physiology* in 1965 dacht Rob nog dat atropine of hyoscine competitie aangingen met acetylcholine voor een opnamesysteem voor acetylcholine. Toen Rob terugkwam in het MBL was het evident dat hij dit probleem niet verder kon uitdiepen met nieuwe experimenten met de kat. Aan de ene kant lag het werken met katten als proefdier moeilijk in het MBL terwijl aan de andere kant er het algemene punt was dat een *in vivo* benadering serieuze experimentele beperkingen heeft. Rob koos dus voor een *in vitro* aanpak waarbij het externe milieu gemakkelijk en precies is samen te stellen. Het proefdier dat makkelijk voorhanden was de rat waarbij van de hersencortex dunne plakjes werden afgesneden die vervolgens opgevangen werden in een

bakje met een fysiologische vloeistof. Met dit nieuwe model kreeg Rob snel duidelijke resultaten. Het bleek dat atropine de afgifte van acetylcholine stimuleerde maar dat gebeurde alleen als de hersenplakjes eerst werden gestimuleerd. In rust, dus zonder stimulatie, gaven de plakjes ook acetylcholine af zij het veel minder dan tijdens stimulatie, maar in dit geval had atropine geen verhogend effect. Het was nu de vraag of atropine via een effect op muscarine-receptoren de afgifte van acetylcholine bevorderde of dat acetylcholine en atropine een competitie aangingen voor een opname-systeem voor acetylcholine zoals eerder door hem geopperd in zijn publicatie uit Mill Hill over het effect van hyoscine in de levende kat. Inderdaad bleek dat hersenplakjes actief relatief grote hoeveelheden acetylcholine konden opnemen indien oplossingen met acetylcholine aan de badvloeistof werden toegevoegd. Deze opname van acetylcholine suggereerde het bestaan van een heropnamesysteem voor acetylcholine wat iets eerder was beschreven door anderen voor de neurotransmitters noradrenaline en dopamine. Rob vond verschillende stoffen die de opname van acetylcholine in hersenplakjes konden blokkeren, waaronder eserine. Het bleek toen dat wanneer de weder-opname van acetylcholine werd geremd, atropine nog steeds een stimulerend effect had op de hoeveelheid acetylcholine die in de badvloeistof verscheen, alleen was het stimulerend effect van atropine veel groter, kennelijk omdat acetylcholine dat was afgegeven door de zenuw niet kon worden heropgenomen door het weefsel. Er moest dus een directe relatie zijn tussen blokkade van de muscarine-receptoren en de afgifte van acetylcholine. Een conceptueel probleem was toen dat de muscarine-receptoren zijn gelokaliseerd op het cellichaam van een zenuw dat zijn input krijgt van zenuwvezels die acetylcholine afgeven bij de prikkeloverdracht van zenuw-op-zenuw. Met andere woorden, hoe kan zo'n receptor nu een signaal terugkoppelen naar de zenuw die aan de andere kant van de "sloot" (synaps) zit? Het antwoord was volgens Rob eenvoudig: het zenuwuiteinde bevat kennelijk eveneens muscarine-receptoren die tot doel hebben de afgifte van acetylcholine te sturen. Op deze wijze zou acetylcholine zijn eigen afgifte remmen, wat neerkwam op het concept dat hier sprake was van een negatief terugkoppelingssysteem. Hiermee had Rob een nieuw synaptisch mechanisme ontdekt. Iets later werd een dergelijk mechanisme ook gepostuleerd voor andere neurotransmitters in de hersenen waaronder noradrenaline.

In het MBL had Rob voor 1970 weinig response op zijn werk met de hersenplakjes. JAC begreep het niet en bij de NOZEM bijeenkomsten⁷ haalde JAC er zijn schouders over op als Rob's werk ter sprake kwam. Ik heb het principe van presynaptische-receptoren bij een dergelijke gelegenheid wel eens uitgelegd want ik begreep de hypothese natuurlijk wel en zag het belang er ook van in. Zoals het wel vaker gaat met origineel fundamenteel onderzoek was de tijd er nog niet helemaal rijp voor.⁸ Interessant in dit verband is te

⁷ De biochemici in het MBL (waaronder Frits Berends, Oosterbaan en Wim Stevens) hadden onder leiding van JAC regelmatig informele bijeenkomsten. Deelneming hieraan werd nozemen genoemd. Als jong biochemicus mocht ik ook aanschuiven bij de crème de la crème van het MBL

⁸ Misschien hadden we in 1970 een goed overzichtsartikel moeten schrijven over de presynaptische receptoren. Het schrijven van dergelijke overzichtsartikelen was toen nog niet zo in de mode, in tegenstelling tot de huidige tijd waar de literatuur wordt overstelpt met overzichtsartikelen die vaak tot doel hebben de publicatielijst voor het cv wat op te krikken. Uiteindelijk hebben Rob en ik een prima overzichtsartikel over presynaptische receptoren geschreven maar dat was pas in 1980.

memoreren dat zijn artikel in 1969 in het *British Journal of Pharmacology* over de opname van acetylcholine door hersenplakjes een groot succes kende. Misschien kwam dit om dat heropname van andere neurotransmitters door zenuwweefsel door andere onderzoekers was gerapporteerd. Dat bleek een hot topic omdat het als een wezenlijk onderdeel van de synaptische transmissie werd beschouwd: een dergelijk weder-opname systeem zou bijdragen aan het opruimen van de neurotransmitter uit de synaps nadat het zijn werking in de prikkeloverdracht had gedaan. We weten nu dat dit voor acetylcholine geen rol speelt omdat het acetylcholine door het acetylcholinesterase immers in een fractie van een milliseconde wordt opgeruimd nadat de prikkel is overgedragen.

Al voor Rob's promotie in januari 1971 was het onderzoek een andere kant op gegaan. Ten eerste omdat het probleem van de presynaptische receptoren goed was afgerond en ten tweede omdat een nieuw probleem zich aandeed in de vorm van een wonderlijk ander fenomeen. Het bleek namelijk dat in een hersenplakje de nieuw-gesynthetiseerde acetylcholine door stimulatie bij voorkeur wordt afgegeven in het medium. Dit fenomeen was kort tevoren door Collier en MacIntosh gevonden in het *ganglion cervicalis superior* van de kat. Met radioactieve tracers (in dit geval choline met tritium gemerkt) bleek dat het acetylcholine in het medium wel 3-4 maal zo radioactief was als het acetylcholine dat uit het weefsel kon worden geëxtraheerd. Wat had dit te betekenen en was het acetylcholine in de vesikels (die immers verantwoordelijk zijn voor de acetylcholine-afgifte) eveneens meer gelabeld? Met subcellulaire fractioneringsmethoden hebben we de vesikels in de ultracentrifuge gezuiverd maar het bleek dat het acetylcholine in de vesikels even radioactief was als dat in de rest van het weefsel en driemaal zo laag was gelabeld als het acetylcholine dat door de plakjes in dezelfde proef was afgegeven.⁹ Uiteindelijk kwamen Rob en ik erachter dat het een metabool probleem was. Het bleek namelijk dat de preferentiële afgifte uitsluitend plaatsvond wanneer het medium glucose bevatte. Indien glucose werd vervangen door pyruvaat als energiebron vond wel acetylcholine-afgifte plaats maar het afgegeven acetylcholine had dezelfde radioactiviteit als dat in het weefsel.¹⁰

In 1974-75 was ik na mijn eigen promotie naar het Department of Biophysics gegaan om in het lab van Bernard Katz te werken met Ricardo Miledi. In dat lab kwam ik ook in contact met Angela Vincent en John Newsom-Davis, de laatste een neuroloog die sedert enkele jaren zich had toegelegd op de behandeling van patiënten met myasthenia gravis, een spierziekte waarbij verlamingsverschijnselen optreden. We weten nu dat er in deze ziekte

⁹ De "gewone" bloedzuiger voldeed niet meer in deze experimenten. Voor dit doel hadden we de mini-bloedzuiger, een ultradun stripje in een minuscuul kamertje in een perspex blokje. Op deze wijze konden we kleinere hoeveelheden testen al moet gezegd worden dat de gewone bloedzuiger veel nauwkeuriger werkte en bovendien minder kuren had bij de assay. Deze methode hadden we overgenomen van Maurice Israël die toen nog in het Hôpital de la Salpêtrière werkte voordat hij naar het lab in Gif-sur-Yvette verhuisde.

¹⁰ In deze publicatie maakten we voor de eerste keer gebruik van onze nieuwe Finnigan GC-MS waarmee we met succes gedeutereerde varianten van acetylcholine konden meten. Kort daarvoor hadden we de methode op de massaspectrometer gepubliceerd. Er was namelijk een probleem van uitwisseling van deuterium tussen choline, dat in grote hoeveelheden in het preparaat aanwezig was en de geringe hoeveelheden acetylcholine. Deze uitwisseling zorgde voor een artefact in de labelling en het artikel in het *Journal of Neurochemistry* gaf aan hoe dit probleem door ons is opgelost.

auto-antistoffen zijn gericht tegen de nicotine-acetylcholine-receptor van de eindplaten van de skeletspier maar toen was dat nog niet duidelijk. Een mogelijk defect zou kunnen zijn dat er te weinig acetylcholine zich bevindt in de motorische zenuwuiteinden van myasthenia patiënten en dat er dus te weinig acetylcholine kan worden afgegeven. In twee achtereenvolgende publicaties toonden wij aan dat acetylcholine in de tussenribspier¹¹ van patiënten niet is verlaagd maar daarentegen hoger is dan in menselijke controle weefsel (veelal afkomstig van patiënten die geopereerd werden voor het weghalen van een longtumor). Een zeer onverwachte bevinding was dat de afgifte van acetylcholine als gevolg van stimulatie was verhoogd al werd deze verhoogde afgifte tijdens stimulatie niet lang volgehouden. Toen testten we of de verhoogde afgifte iets te maken zou kunnen hebben met het aantal beschikbare nicotine-receptoren een gedachte die werd ingegeven door Rob's bevindingen met atropine in de hersen cortex. Een *long shot*, want de nicotine-synapsen in de skeletspier hebben een heel ander principe van werking dan de muscarine-acetylcholine receptoren in de cortex van het brein. Dit kon snel getest worden in de diafragmaspier van de rat die we behandelden met alpha-bungarotoxine, een slangengift dat verlamdend werkt omdat het zich irreversibel verbindt met de acetylcholine-receptoren in de spier. Het bleek dat bij stimulatie inderdaad veel meer acetylcholine werd afgegeven, een spectaculaire vondst die we na het uitvoeren van enkele belangrijke controle experimenten hebben gepubliceerd in *Nature*. Zelden hebben wij een artikel zo makkelijk gepubliceerd gekregen, zonder wezenlijk tegengesputter van reviewers (Miledi, Molenaar & Polak, *Nature* 1978).¹²

Intussen hadden we in de periode '78-'79 onze massapectrometrische bepaling verder verfijnd en waren we in de wereld de recordhouders die de geringste hoeveelheden acetylcholine nog konden meten met onze methode van *slow pyrolysis* (Polak & Molenaar, *Journal of Neurochemistry* 1979).

In de periode 1980-1985 dus tot aan zijn pensioen, concentreerde Rob zich in Rijswijk om een aantal problemen uit te zoeken op het rattendiafragma (onder meer het surplus acetylcholine en *giant miniature endplate-potentials* samen met de Zweedse onderzoeker Thesleff) terwijl ik zelf me vooral toelegde op de biochemie van de eindplaat in de kikker waar ik ook mee had gewerkt met Ricardo Miledi in Londen.

Birks & MacIntosh hadden in 1961 gevonden dat in het sympathische ganglion het gehalte van acetylcholine aanzienlijk omhoogging nadat het acetylcholinesterase was geremd. Zij

¹¹ De biopsieprocedure bestond uit het wegnemen van een stukje tussenribspier van pees-tot-pees tijdens een operatie die tot doel had de thymus weg te nemen bij patiënten met myasthenia gravis (thymectomie, patiënten blijken hier baat bij te hebben). Voor controlemateriaal werden stukjes tussenribspier gebiopteerd bij patiënten met longkanker voorafgaande aan de verwijdering van het tumorweefsel.

¹² Later is aan de hand van electrofysiologische experimenten in Leiden dit fenomeen zowel voor het rattendiafragma als de menselijke tussenribspier bevestigd. Via simulatiemodellen kan aannemelijk gemaakt worden dat voor myasthenia gravis de compensatoire verhoogde afgifte van levensbelang is. Met andere woorden, zonder dit mechanisme zouden de patiënten die wel 80% receptorblokkade hebben, totaal verlamd zijn (we hadden namelijk gevonden dat 80% van de receptoren zijn verdwenen door een auto-immuun-aanval tegen de nicotine-receptoren).

noemden deze extra hoeveelheid “surplus” acetylcholine. Rob vond dat ook in het rattendiafragma een dergelijke opstapeling van acetylcholine zich voordeed na remming van het acetylcholinesterase met soman. Na twee jaar werken verscheen een uitvoerige analyse van het fenomeen surplus acetylcholine in het *Journal of Physiology* dat daarmee Rob's laatste belangrijke publicatie vormde. Geconcludeerd werd dat het surplus acetylcholine niet in de uiteinden van de zenuw worden gestapeld maar in pre terminale delen van het motor axon.

Rob heeft in zijn wetenschappelijke carrière van meer dan 25 jaar 50 publicaties geschreven, de abstracts en hoofdstukken in boeken niet meegerekend. Dat is gemiddeld 2 publicaties per jaar wat toen als een goede prestatie gold. Tegenwoordig liggen vanwege de grote publicatiedruk deze getallen hoger al worden hogere scores in de regel bereikt door gedeeltelijke repetitie van resultaten in achtereenvolgende artikelen, het veelvuldig schrijven van overzichtsartikelen, en *last but not least* het aangaan van veel samenwerkingsverbanden met andere laboratoria waardoor men vaker auteur is (natuurlijk gaat het aantal publicaties, gerekend per individuele onderzoeker hierdoor *niet* omhoog!).

Rob als mentor

Vanaf het begin heeft Rob mij laten zien hoe het moest, in de eerste plaats met betrekking tot het wetenschappelijk bedrijf. Ook in menselijk opzicht waarover ik dadelijk nog wat zal zeggen. Ik heb het al gehad over het meten van acetylcholine op de bloedzuiger en de farmacologische precisie die daarvoor nodig is om een meting tot een goed einde te brengen. Maar ook als het ging over de constructie van een proefopzet, het definiëren van de vraagstelling en tenslotte vooral over hoe we het weefsel op gepaste wijze aan de tand konden voelen als ware het een recalcitrante verdachte die verhoord moest worden. Daar was Rob heel goed in.

Een voorval staat me bijzonder goed bij waarbij Rob liet zien hoe een wetenschapsman onverschrokken tewerk dient te gaan. Het jaar was 1974, ik had mijn werk voor mijn proefschrift net afgerond en we waren druk bezig met vervolggexperimenten met name om te zien of we door dubbel-labelling van het acetylcholine konden achterhalen of de mitochondria al dan niet betrokken waren bij het fenomeen van de preferentiële afgifte van acetylcholine zoals boven genoemd. Voor dit doel moesten we met radioactief koolstof (^{14}C) gelabeld pyruvaat de acetyl-groep van acetylcholine labellen. Nu was bekend dat hersenplakjes uitstekend kunnen functioneren met pyruvaat in plaats van glucose als energiebron dus in labellings-experimenten met radioactief pyruvaat liet ik de glucose weg uit het medium. In de uitkomst van de eerste experimenten leek alles “normaal”: acetylcholine in de cortex plakjes had hetzelfde niveau als eerder gevonden, en zo was het ook met de afgifte van acetylcholine. Maar (ik krijg er nog koude rillingen van) er was géén preferentiële afgifte van acetylcholine: de specifieke radioactiviteit (gemeten als radioactief koolstof uit pyruvaat en radioactief waterstof uit choline) was in de afgegeven acetylcholine hetzelfde als dat in de acetylcholine dat geëxtraheerd werd uit het weefsel. Ik was dus in zak en as want het fenomeen waarop mijn hele proefschrift was gebaseerd leek

als een kaartenhuis in elkaar te storten en ik zou niet de eerste promovendus zijn geweest die met dergelijk onheil te maken kreeg. Maar Rob gaf geen krimp en zei in ons overleg naar aanleiding van de eerste resultaten om eens te kijken wat het verschil was tussen de proefomstandigheden van mijn eerdere proeven en de laatste met de omineuze uitkomst. Het verschil kwam snel tevoorschijn: het was de aanwezigheid van glucose. Dus Rob zei toen dat we de proef moesten overdoen met radioactief pyruvaat samen met (ongelabeld) glucose. En verdomd-dat-het-niet -waar-was: dat was het antwoord! Het fenomeen van de preferentiële afgifte van acetylcholine bleek een metabool sub-compartment als oorzaak te hebben en hiermee hadden wij een probleem dat vele andere onderzoekers reeds had beziggehouden in het ganglion en het diafragma, onverwacht grotendeels opgelost. Het hoofd koel houden, ook dat was Rob als man van de wetenschap.

Rob hield van precisie, waarbij ik ook denk aan het ellendige corrigeren van de drukproeven. In die dagen was tekst nog niet digitaal opgeslagen en bij het zetproces konden de gekste dingen fout gaan die heden ten dage vanzelf goed gaan. Het publiceren ging toen veel langzamer dan vandaag. Na inzending van een artikel kwamen na zo'n 1 tot 2 maanden de reacties van de reviewers binnen (meestal 2 soms 3, ook toen), terwijl alle correspondentie heen en weer ging met tante pos, in plaats van met de snelle email van tegenwoordig. Als dan uiteindelijk het artikel geaccepteerd was volgde een periode van radiostilte tot het grote moment was aangebroken: "met de post van vandaag is de drukproef binnengekomen". En daarmee begon een ceremonieel of liever een *ordeal* want het was woest vervelend werk. Het begon ermee dat ik alles moest voorlezen met inbegrip van leesteken en de referenties, punten, komma's bladzijnummers etc. Als ik dan na circa anderhalf uur klaar was met mijn voorleesbeurt werden de rollen omgedraaid en begon Rob met zijn solo. Als na zo'n drie uur alles volgens schema was verlopen moesten wij dan in de drukproeven de gevonden zetfouten en vergissingen aangegeven volgens de drukproef code. Dat waren er best veel, zeker vergeleken met tegenwoordig. Kortom, ook dit was een voorbeeld van wetenschappelijke nauwkeurigheid.

Het schrijven van artikelen was een enorme job.¹³ Het kon soms zijn dat je even lang aan 't schrijven was als aan het doen van de proeven zelf. Rob was bij het schrijven uiterst precies. Altijd. Bij dit schrijfproces hield hij de minutieuze methode van Feldberg aan die tot in het begin van de jaren '70 al onze teksten kritisch bekeek. Max Wijnans was in die jaren als medisch statisticus ons "geweten" op de achtergrond, een "belangrijk" resultaat werd pas echt belangrijk als het statistisch significant was. Schrijven was ook een kwestie van steeds weer verbeteringen aanbrengen, passages herschrijven en alinea's anders rangschikken. "Cut & Paste" moest in die dagen nog letterlijk worden genomen dus schaar en Pritt stift behoorde tot het gereedschap van de schrijver.

¹³ In die dagen publiceerden wij met onze namen als auteurs in alfabetische volgorde, dit was in enkele Engelse tijdschriften toen zelfs verplicht. Later vooral onder invloed van Amerikaanse tijdschriften is dit losgelaten. Jammer, want soms scheelt het een boel gepalaver en herrie, vooral als meerdere laboratoria betrokken zijn bij de publicatie.

Rob als monteur

Menigeen zou in Rob nu niet direct een doe-het-zelf-er herkennen. Je hoeft niet tot de intimi van Rob te behoren om te weten dat hij niet echt een type is om thuis een tussenmuur te plaatsen, een staande klok te repareren en al helemaal niet om onder de motorkap te duiken van zijn auto. Edoch, schijn bedriegt. Ik heb Rob's vaardigheid van de vlammenwerper en de beroete trommels reeds genoemd. Op deze plaats is het zeker toepasselijk om een ander voorval eveneens te memoreren.

Zoals gezegd hadden wij enorm profijt van de massaspectrometer. Maar ook geavanceerde apparaten kunnen kuren hebben en de Hewlett-Packard massaspectrometer was af en toe een zorgenkind. Dan was er geen goed signaal bijvoorbeeld en – net als vroeger met een slechte dag met de bloedzuiger – was het dan echt einde oefening. In het begin kwamen de monteurs van Hewlett Packard als er troubles waren, maar die waren duur en brachten zelden soelaas. Er moest in zo'n geval analytisch worden nagedacht als ware de massaspectrometer een zieke patiënt. Soms lag het aan de capillaire kolom van het gaschromatograaf-gedeelte, het gebeurde ook wel dat het probleem dieper lag, namelijk in het binnenste van de quadrupool. Het hart van zo'n machine bestaat uit een ionisatiekamer waar het gas uit de chromatograaf wordt beschoten met electronen en uit vier metalen staven (vandaar de naam quadrupool) die met wisselende spanning de gevormde geladen moleculaire deeltjes in resonantie konden focuseren. De exacte positionering van deze staven was uiterst kritisch en daarmee de achillespees van dit kostbare apparaat. Vooral NIET aankomen dus. Ik was dan ook totaal ontzet toen ik op een ochtend in Rijswijk het lab binnenstapte en Rob samen met Jan Engelen¹⁴ aan trof. Ze stonden aan een tafel waarop voor hen de restanten lagen van wat eens de massaspectrometer was, met op filtreerpapier een onnoemelijk aantal boutjes, veertjes en draadjes keurig gerangschikt in rijtjes en ja, mijn hemel, ook de quadrupool staven lagen daar in weerloze naaktheid geëtaleerd.¹⁵ Later bleek dat deze operatie waarbij de patiënt niet meer te redden leek wel vaker plaats vond. En kennelijk met succes, niet alleen wist Rob de massaspectrometer weer in elkaar te krijgen zonder wat schroefjes en spiraaltjes over te houden het apparaat deed het nog ook.

Rob was niet alleen een goed bedenker van experimenten maar ook was hij daarbij een goede experimentator. Dat was ook wel nodig want we werkten immers met de gevaarlijkste neurotoxische stoffen die we kennen, waaronder botulinumtoxine A en soman.

Rob aan de telefoon

“Met Rób Polàk!” Hiermee nam Rob de telefoon op met de voor hem kenmerkende intonatie. En we hebben heel wat afgebeld. Ikzelf ben niet zo van het telefoneren en Rob

¹⁴ Hoofd van de werkplaats die graag met Dick Meeter aan auto's sleutelde, niet bepaald een expert op NASA niveau.

¹⁵ Ik raakte bijna in shock omdat immers 100% van mijn werk in Leiden afhankelijk was wat hier nu op tafel uiteen lag.

was geloof ik ook niet zo'n telefoonmens.¹⁶ Maar zodra we na het werk thuisgekomen waren kon het gebeuren dat we zelfs vóór het eten al telefoneerden, meestal tot ergernis van Marianne en Fernande.¹⁷ Natuurlijk ging het heel vaak over de massaspectrometer. Die had dan de laatste dagen weer kuren gehad en als dokters van een zieke wisselden we van gedachten hoe we diagnose konden aanscherpen om tot een doelmatige behandelingsstrategie te komen, om die dan de volgende dag uit te proberen. Wat dan meestal niet het gewenste resultaat opleverde waarop we 's avonds verder collegiaal overleg hadden. Het gebeurde nogal eens dat de massaspectrometer geheel was genezen zonder dat wij konden aangeven welke ingreep het nu net was geweest die beterschap had veroorzaakt. Termen als *post* en *propter* vielen dan want de massaspectrometer leek ook spontaan te kunnen genezen.¹⁸ Uiteraard gingen de telefoongesprekken ook over proefuitkomsten en ideeën voor de volgende proef. Als dat achter de rug was verlaagden we het niveau van het gesprek en bespraken we gezellig andere personen of wisselden roddels uit al voor zover we dat niet al overdag hadden gedaan.

Rob en de lol van de proef

Wat ik mij vooral herinner van de periode met Rob was het enthousiasme in het doen van proeven. Officieel heet dit "experimenteren", het doen van experimenten, maar ik vind dat wat theatraal, bombastisch klinken. Wij noemden zoiets gewoon een "proef". Het aardige van een proef is dat het gaat om een soort vraag-en-antwoord spel, en net als in een politiserie op slim gestelde vragen een antwoord krijgen omdat één van de mogelijkheden wordt uitgesloten. Op de achtergrond was Occam's razor¹⁹ al hebben we het in dat verband nooit daarover gehad. Zo was het doen van proeven een feest maar ook het verwerken van de resultaten en het verzinnen van een logisch vervolg hoorden bij dit spel. Ik heb bij een andere gelegenheid eens eerder gezegd dat na Rob's pensioen mijn werk in Leiden wetenschappelijk zeker successen kende maar dat de gezelligheid er wel een beetje af was en dat was niet alleen vanwege het persoonlijke vlak maar ook op de wijze waarop wij experimenteerden. We vonden het een feest om proeven te doen en verwonderden ons er een beetje over dat we er ook nog voor werden betaald.

Ton van der Laaken is het evenmin ontgaan dat er een prettige stemming was op het lab, zeker niet als hij denkt aan de memorabele gebeurtenis waarop Rob van puur enthousiasme bij het vernemen van een goed proefresultaat een gat in de lucht sprong (was normaal, dat deed hij wel vaker) en toevallig op een keer met beide benen in de prullenbak belandde,

¹⁶ Wel belde Rob tijdens congressen ieder dag trouw met Marianne en dat had soms heel wat voeten in de aarde omdat het draaien van 0031 toen nog niet voldeed om contact te krijgen met Nederland. Zo kwam de uitbater van het hotel tijdens het eten regelmatig naar onze tafel om Rob op de hoogte te brengen van de vorderingen die hij had geboekt met de telefoniste om het contact met Amsterdam te leggen. De volgende dagen herhaalde zich dit ritueel (NATO Symposium Varenna 1969). Italiaanse toestanden.

¹⁷ Ik had zelfs een eigen lijn met apart telefoonnummer in mijn studeerkamer thuis, zodat ik voor anderen de lijn niet bezet hield.

¹⁸ Voor Rob als arts lagen de termen *post* en *propter* hem voor in de mond.

¹⁹ Occam's razor, het principe dat de eenvoudigste verklaring van een fenomeen waarschijnlijk de juiste is, tenzij het tegendeel kan worden aangetoond.

een wapenfeit dat ik dankbaar kon memoreren tijdens een speechje bij gelegenheid van Rob's 25-jarig jubileum op het MBL.

Rob en de analisten

Voor ik verder ga moet ik zeker niet vergeten erop te wijzen dat analisten een belangrijke rol spelen in ons métier. Zoiets als goed opgeleide operatieassistenten voor een chirurg. Voor fysici speelt dit geen rol, zij hebben fijnmechanische instrumentmakers. Voor ziekenhuislaboratoria is het voor analisten meer relatief eenvoudig routinewerk, maar bij ons met het prepareren van de spieren, het bedienen van de GC-massaspectrometer komt er heel wat bij kijken en wij zijn altijd zeer afhankelijk geweest van hun inzet en vaardigheden.

Voor zover ik weet is Mieke Meeuws de eerste analiste geweest van Rob, tenzij in de eerste dagen bij het MBL (dus voor 1963) er ook nog iemand anders is geweest. Daarna kwam Anne Thiessen die altijd rust uitstraalde. Anne was er toen ik op het MBL aankwam, Mieke was toen al weg. Toen kwamen Marianne Mulders en Marianne van de Spek. Aan hen heb ik maar een vage herinnering. Ze waren niet zo lang bij Rob en in die periode was ik bovendien een jaar in Londen.

Rond 1976 kwam Ton van der Laaken die met Rob een uitstekend koppel vormde. Wij waren een team, ook met mijn analiste uit Leiden die ook regelmatig op het MBL kwam om acetylcholine op de massaspectrometer te meten. Het woord "team" gebruikten we niet. Gelachen werd er vaak.

Werkbezoeken in het buitenland

Vanzelfsprekend waren onze buitenlandse reizen hele happeningen. Ten eerste waren er de symposia met acetylcholine als centraal onderwerp. Het voordeel van dergelijke symposia was dat er veel minder deelnemers waren dan bij de grote fysiologische, farmacologische of neurochemische congressen waar minimaal duizend onderzoekers heengingen. De meeste collega's die soortgelijk werk deden hebben we bij de *Symposia on Cholinergic Mechanisms* ontmoet. Het waren achtereenvolgens Skokloster in Zweden, Boldern in Zwitserland, La Jolla in Californië, Florence, Oglebay Park bij Pittsburg en Lidingö bij Stockholm. Achter deze droge opsomming van plaatsnamen ligt een wereld aan herinneringen.

Ook hadden we de gewoonte collega's in hun eigen nest op te zoeken. Meestal combineerden we dat met een symposium, we waren dan toch al op stap, en gaven Rob of ik een lezing over ons laatste werk.

Zo herinner ik me werkbezoeken aan Yale (Blass), Milaan (Bruno Ceccarelli, Claudia Haimann en Francesca Torri-Tarelli), Geneve (Yves Dunant), Parijs (Maurice Israël), Straatsburg (Rafaele Massarelli), Montreal (Hank MacIntosh en Brian Collier), Los Angeles (Don Jenden), Göttingen (Victor Whittaker en Bert Sakmann) en Florence (Giancarlo Pepeu). Collega's

waar Rob vaak contact mee had waren vooral John Szerb (van hem kwam de suggestie om tetrodotoxine te gebruiken in het atropine onderzoek), Alan Goldberg, Yves Dunant, Hank MacIntosh, Edith Heilbronn en Stan Tuček.

Op bezoek bij collega's kon Rob wel eens pronken als een pauw vooral als hij iets bijzonders wist te verhalen. Daarbij kon hij, als hij hierin persistent was, wel eens het bloed onder je nagels vandaan halen. Maar in wezen was Rob werkelijk bescheiden en zoals ik hem had leren kennen zoals in het begin van dit stukje al gezegd, de bescheidenheid kwam over als gemeend en was geen geposeerde "oosterse" nederigheid.

Bij de internationale contacten was Rob ook een man van de wereld, sprak gemakkelijk Frans en Engels over de telefoon met collega's en regelde zo van alles te midden de dampen van de waterkoker.

Eerlijkheid en betrouwbaarheid in contact met collega's was vanzelfsprekend. Zo vanzelfsprekend dat ik me niet kan herinneren dat we het daar ooit specifiek over hebben gehad. Dat Rob iemand een streek zou kunnen leveren was absoluut ondenkbaar. Zoals bekend is dit in de wereld van de wetenschap vaak wel anders.

Foto's

Een stereotiep beeld op congressen is dat wetenschappers elkaar van voor en achter in alle standen fotograferen, tijdens koffiepauzes, op het terras of zo maar in een stukje natuur. Ik was niet zo van dat dat fotograferen en Rob was dat ook niet. Ik heb dus weinig foto's. Dat vind ik nu echt spijtig en zou ik wensen dat ik aan die foto-aanstellerij had meegedaan. Ik heb slechts vier foto's gevonden waarop de gefotografeerde personen enigszins herkenbaar zijn. Foto's 3 en 4 zijn met een Polaroidtoestel genomen. Had ik toen maar een smartphone gehad ...

Tenslotte

Het einde van de samenwerking kwam voor mij vrij onverwacht in 1985 toen Rob na zijn hartinfarct in dat jaar besloot zich volledig op het schilderen richten. De jaren daarna hebben we een aantal gemeenschappelijke publicaties nog afgerond. Later kwam ik een paar keer per jaar naar Amsterdam, naar de Albrecht Dürerstraat en soms op zijn atelier op de Prinsengracht waar Rob dan een aangename lunch had klaarstaan en me liet zien waar hij mee bezig was geweest. Al die tijd was hij de hoofdlijnen van mijn onderzoek blijven volgen. Bijpraten was altijd snel gebeurd.

Voor een algemene achtergrond van ons acetylcholineonderzoek verwijs ik naar het postscriptum. Acetylcholine komt van een gegoede familie... Alle neurotransmitters zijn gelijk in belangrijkheid maar uiteindelijk is acetylcholine *more equal* dan andere transmitters: bij alle historische farmacologische ontdekkingen was acetylcholine altijd *numero uno*.

Esneux, februari 2021



Foto 1. Symposium Oglebay, West Virginia, november 1983. Tussen ons in staan de organisator van het Symposium Israël Hanin, Loyola University, Chicago, en Annika Dahlström, University of Göteborg, Zweden. Met Annika is toen afgesproken dat we gezamenlijk iets zouden onderzoeken maar daar is niets van terecht gekomen.



Foto 2. Bij de Niagara Falls. Door het tegenlicht is het contrast niet best. Op het origineel is met enige moeite de bovenrand van de waterval te zien, net boven onze capuchons. Na afloop van het symposium in Oglebay waren we met Hank Macintosh meegereden richting Montreal via de Niagara Falls waar we de grens met Canada overstaken.



Foto 3. Reis naar Genève en Milaan, 1984. Tussenstop in Brunate boven Como. Tussen ons in staat Siu-Siu Oen, gepromoveerd in 1987.



Foto 4. Werkbezoek 1984 aan het Department of Pharmacology, Universiteit van Milaan. Tussen ons in staan Claudia Haimann, Ricardo Fesce en Bruno Ceccarelli.

Postscriptum

De positie van acetylcholine gezien tegen het perspectief van de fysiologie en de geneeskunde in de twintigste eeuw – neurotransmitters, receptoren en chemische synaptische transmissie van signalen

Acetylcholine en acetylcholine-receptoren

John Langley (1852-1925) was de eerste die het receptor concept rond **1905** introduceerde in de farmacologie. Al vroeg viel de verdenking onder meer op acetylcholine als een stof die farmacologisch actief was. Hoe een receptor eruitzag was nog volstrekt onduidelijk. **Sir Henry Dale (1875-1968) Nobelprijs 1936**, is in Langley's laboratorium begonnen en heeft later vanaf **1910** aanwijzingen gevonden dat acetylcholine een rol speelt in het autonome zenuwstelsel en de skeletspier. Concrete aanwijzingen voor acetylcholine in de werking van de vaguszenuw op het hart werden verkregen in de twintiger jaren door **Otto Loewi (1873-1961) Nobelprijs 1936**. In de periode van 1930-1936 werden zeer sterke aanwijzingen gevonden dat acetylcholine betrokken was als een tussenstof bij de prikkeloverdracht in het autonome zenuwstelsel. De belangrijkste resultaten uit die periode zijn gepubliceerd in vier publicaties in het *Journal of Physiology* van **Sir Henry Dale en Wilhelm Feldberg (1900-1993)**.

Alhoewel weinigen twijfelden of acetylcholine zelf de neurotransmitter was bleef in principe de mogelijkheid bestaan dat een andere stof met acetylcholine-achtige activiteit de feitelijke neurotransmitter was al werd dit in de loop der jaren minder waarschijnlijk. **Don Jenden, Israël Hanin en Bo Holmsted** waren in **1968** de eersten die konden aantonen met massaspectrometrie dat in hersenen acetylcholine inderdaad aanwezig is. Later zijn wij het zelf geweest die hebben aangetoond met massaspectrometrie dat in de skeletspieren van de mens, rat en kikker, een stof aanwezig is die geïdentificeerd kan worden als acetylcholine, dat die voorkomt in de zenuwuiteinden en daar door elektrische stimulatie ook door wordt afgegeven in de vorm van pakketjes (publicaties van **Miledi, Molenaar, Polak, Vincent en Newsom-Davis** in de periode van **1976-1985**).

De structuur en de aminozuurvolgorde van de nicotine- en de muscarine-receptor is opgehelderd door **Shosaku Numa** en zijn groep in **1982-1986**. Het concept van de receptor werd hiermee een tastbare realiteit en de structuur van vele andere receptoren zou spoedig daarna worden opgehelderd.

Afgifte van acetylcholine en de rol van synaptische vesikels

Sir Bernard Katz (1911-2003) Nobelprijs 1971 heeft rond **1950** gevonden met **Paul Fatt** dat acetylcholine uit de motorische zenuw wordt afgegeven in de vorm van pakketjes en met **Ricardo Miledi** dat dit proces afhankelijk is van calcium. Deze pakketjes zouden afkomstig zijn uit de synaptische vesikels die men met het elektronenmicroscop kon waarnemen in het zenuwuiteinde. **Katz** was hoofd van het *Department of Biophysics* van het University College in Londen waar hij eerder **Archibald Hill (1886-1977), Nobelprijs 1922**, was opgevolgd. Later is gebleken dat tal van andere neurotransmitters en hormonen op soortgelijke manier door zenuwen kunnen worden afgegeven. Later heeft **Thomas Südhoff (1955-) Nobelprijs 2013**, de verschillende eiwitten geïdentificeerd die betrokken zijn bij de zogenaamde exocytose van vesikels waarbij de inhoud in de synaptische spleet wordt uitgestort.

De werking van acetylcholine op de receptor op moleculair niveau

Bert Sakmann (1942-) en Erwin Neher (1944-) Nobelprijs 1991, hebben een nieuwe methode, de patch clamp, ontwikkeld waarbij met een glazen electrode een stukje membraan kan worden aangezogen waarin een honderdtal receptoren zitten. Op deze wijze en met stabiele versterking van het signaal konden zij voor het eerst de moleculaire ionenstroom meten als gevolg van de individuele opening van een enkel acetylcholine-receptorkanaal. Spoedig bleek dat deze techniek tal van andere toepassingen had, voor andere neurotransmitter-geactiveerde en spanningsafhankelijke ionkanalen.