

VU Research Portal

Massaspectrometrie voor klein en groot : n-dimensionaal vissen naar doelstoffen

Niessen, W.M.A.

2003

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Niessen, W. M. A. (2003). *Massaspectrometrie voor klein en groot : n-dimensionaal vissen naar doelstoffen*. VU Boekhandel/Uitgeverij.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

00182

CB

prof. dr. W.M.A. Niessen

*Massaspectrometrie voor klein en groot
n-Dimensionaal vissen naar doelstoffen*

vrije Universiteit



prof. dr. W.M.A. Niessen

*Massaspectrometrie voor klein en groot
n-Dimensionaal vissen naar doelstoffen*

*Rede uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van bijzonder
hoogleraar Instrumentele analyse, in het bijzonder bioanalytische
massaspectrometrie, vanwege de Stichting Het Vrije
Universiteitsfonds bij de faculteit der Exacte Wetenschappen van de
Vrije Universiteit Amsterdam op donderdag 18 december 2003.*



Mijnheer de rector, dames en heren,

Massaspectrometrie is sinds de uitvinding door Thomson in 1912 uitgegroeid tot een veelzijdige en krachtige techniek binnen de scheikunde. Sinds de 1970-er jaren heeft massaspectrometrie ook in groeiende mate een rol binnen de analytische chemie opgeëist. In de laatste tien jaar vooral ook in bioanalytische toepassingen voor zowel kleine als grote moleculen. Bioanalytische massaspectrometrie staat centraal in mijn leeropdracht aan de Vrije Universiteit.

Vandaag wil ik me beperken tot toepassingen van massaspectrometrie in het zoeken in complexe mengsels naar componenten met specifieke eigenschappen. Ik wil laten zien hoe massaspectrometrie hierin samen met andere technieken een rol speelt, soms een hoofdrol, soms een bijrol. Met die gekoppelde, hyphe-nated, ook wel multidimensionale, technieken kan ik de complexe mengsel op verschillende manieren doorzoeken. Ik kan de doelstoffen er als het ware uitvissen. Een vroeg voorbeeld van het vissen naar doelstoffen in het kader van sportdoping is op de achtergrond geïllustreerd.

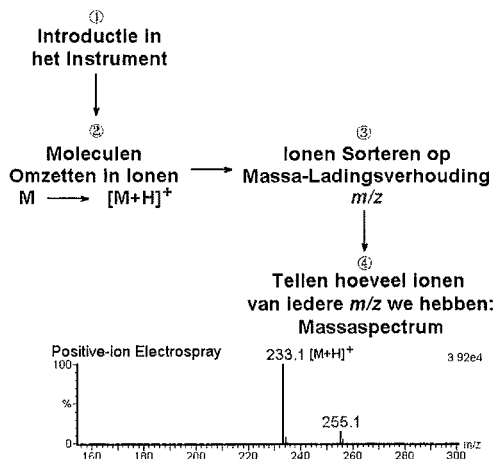
Maar in mijn titel zit nog een andere dimensie, die misschien beter verwoord zou zijn met *Massaspectrometrie voor acht tot tachtig*, zoals soms wel op speelgoed staat. Vanwege het geweld en de drugs die er in voorkomen zou de kijkwijzer mijn verhaal waarschijnlijk eerst goedkeuren vanaf twaalf jaar.

Op de achtergrond ziet u tevens hoe zo'n massaspectrometer eruit ziet: een vaalwitte doos, vaak met een blauwig accent. Wat aansluitingen en verbazingwekkend weinig knoppen. Het instrument wordt volledig bestuurd vanaf de computer.

Voor de harde wetenschappers onder u zou ik dit verhaal *Multihyphenated sample pretreatment, chromatography, continuous-flow reactors, and mass spectrometry for structure recognition and characterization of small and large molecules* noemen. Maar daarmee zou ik een voor mij belangrijk deel van de aanwezigheid teveel afschrikken.

Ik ga met u praten over methoden om in biologische monsters te zoeken naar specifieke chemische verbindingen. Die biologische monsters kunnen bloed of urine zijn, weefsels, cellen, bacteriën, plantenextracten, maar ook melk, groenten, vlees voor consumptie. Er kunnen verschillende redenen zijn om te willen zoeken naar die doelstoffen. En die doelstoffen kunnen kleine moleculen zijn, maar ook hele grote.

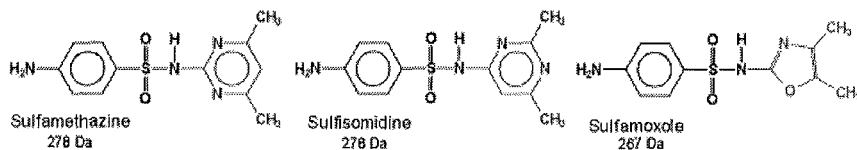
Een belangrijke eigenschap van al die moleculen is hun massa. Een wat abstract begrip misschien. De massa van een molecule wordt berekend uit het aantal atomen koolstof, zuurstof, waterstof, stikstof en zo in de structuur van dat molecule en hun relatieve massa. Een rekenvoorbeeld voor het antibioticum sulfamethazine is hier gegeven. Een klein molecule heeft een massa tot zo'n duizend Dalton, een groot molecule van wel tienduizend Dalton of zelfs meer.



De massaspectrometer is in staat de massa van moleculen te bepalen. We kunnen een massaspectrometer beschouwen als een sorteermachine voor moleculen, of eigenlijk moet ik zeggen: voor ionen. Ionen zijn geladen moleculen. Het is een proces in vier stappen: (1) Eerst brengen we het monster in het instrument. (2) Dan zetten we de moleculen in het monster om in ionen door er bijv. een geladen deeltje, één of meer protonen, op te plakken. Die ionisatie is een geweldig interessant proces. Vandaag zullen we vooral electrospray ionisatie toepassen, gebaseerd op het vernevelen van een vloeistof in kleine druppeltjes. Die druppeltjes zullen door verdamping steeds kleiner worden. De ladingen op de oppervlakte van die druppeltjes zorgen dan voor een Coulomb explosie of een veld-geïnduceerde elektrohydrodynamische desintegratie in weer veel kleinere druppeltjes. En uiteindelijk ontstaan zo de gas-fase ionen. Hoe precies, dat begrijpen we eerlijk gezegd niet helemaal. (3) De gevormde ionen sorteren we vervolgens op massa-ladingsverhouding, m/z . (4) Tenslotte tellen we hoeveel ionen van iedere m/z we hebben. Het resultaat hiervan is een staafdiagram, dat we het massaspectrum noemen.

De scheiding van de ionen is niet gebaseerd op grootte, op hoeveel ruimte een molecule inneemt, maar puur op de massa en de lading van het ion. Voor een onbekend molecule is de massa trouwens meteen een eerste belangrijk gegeven voor de identificatie. En met maar een klein beetje extra moeite kunnen we nog meer te weten komen.

Tijd voor een voorbeeld. Sulfonamiden zijn synthetische antibiotica tegen allerlei bacterie-infecties. Daarom worden ze bij voorbeeld gebruikt in de veehouderij om dierziekten te genezen. Die sulfonamiden hebben een vervelende bijwerking. De varkens en koeien groeien er harder van en leveren dus meer vlees op. Het zijn dus ook groeibevorderaars. Om deze bijwerking maximaal uit te buiten, worden die sulfonamiden soms preventief toegediend, dus ook aan gezonde dieren. Dat brengt het risico met zich mee dat resten van sulfonamiden voorkomen in voedingsmiddelen. Als we via ons voedsel regelmatig kleine hoeveelheden antibiotica krijgen toegediend, kan er resistentie tegen deze antibiotica ontstaan. Om dat te voorkomen is het gebruik van sulfonamiden binnen de Europese Unie streng gereguleerd. Melk en vlees worden gecontroleerd op de aanwezigheid ervan.



De sulfonamiden zijn de eerste doelstoffen in de analyse [1]. De structuur van een aantal sulfonamiden is hier weergegeven. Een deel van het molecule, aangegeven in blauw, is voor alle sulfonamiden hetzelfde. Dat is het groep-specifieke deel. Een ander deel, aangegeven in rood, is voor iedere component verschillend, dat wil zeggen component-specifiek. Laten we er voor de duidelijkheid maar drie uitkiezen. De linker twee verbindingen hebben verschillende structuur, maar dezelfde massa. Die noemen we isomeren. De rechter verbinding heeft een andere massa. We gaan de sulfonamiden bepalen in melk. Een mengsel van deze drie sulfonamiden geeft in de massaspectrometer het volgende massaspectrum. We zien maar twee pieken en geen drie. Componenten met verschillende massa kunnen we onderscheiden; de isomeren niet.

We kunnen natuurlijk niet direct melk introduceren in de massaspectrometer, want in die melk zitten naast dat kleine beetje sulfonamide residu nog een heleboel andere componenten, eiwitten, vetten, suikers, mineralen, vitaminen, nu ja, denk maar aan wat je moeder je vroeger daarover vertelde of sla de voedingswij-

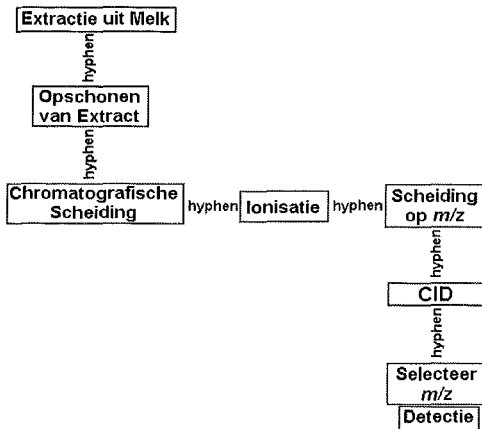
zer er maar op na. En meestal is de sulfonamide-concentratie veel kleiner dan de concentratie van veel andere componenten. We moeten de doelstoffen isoleren uit de melk voordat we ze in de massaspectrometer kunnen introduceren. In de praktijk hebben we twee of drie stappen nodig voor die isolatie: extractie, opschonen van het extract, en een chromatografische scheiding. De chromatografie zorgt ervoor, dat de verschillende sulfonamiden, ook de isomeren, in de tijd van elkaar gescheiden worden en na elkaar in de massaspectrometer terecht komen.

Om meer informatie over onze doelstoffen te verkrijgen, moeten we de verkregen ionen in structuur-specifieke brokstukken laten fragmenteren. Dat kan door de ionen te laten botsen, en daarmee hun interne energie te verhogen. Het fragmentatiespectrum wordt het duidelijkst, wanneer we het ion van onze doelstof eerst selecteren, voordat we het laten botsen.

We gaan daarom twee massaspectrometers aan elkaar koppelen met daar tussenin een reactiekamer, ook wel botsingscel genoemd. In de eerste massaspectrometer selecteren we ionen met één bepaalde m/z . In de botsingscel laten we die botsen. Daardoor valt het ion in stukken uiteen, afhankelijk van de structuur van het molecuul. Ruwweg de helft van de stukken is nog steeds een ion. Die kunnen in de tweede massaspectrometer gescheiden worden op massa-ladingsverhouding. Het spectrum geeft de fragment-ionen weer die uit het geselecteerde ion ontstaan. Deze techniek noemen we tandem massaspectrometrie, ook wel MS-MS.

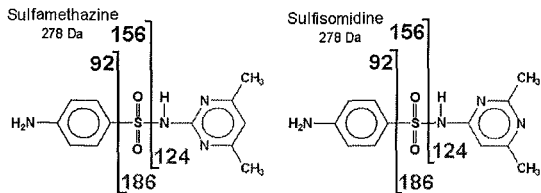
Laten we nu MS-MS in de product-ionen modus gaan toepassen op sulfamethazine met m/z 279. Dat levert meestal zes ion-brokstukken op. Drie daarvan (in blauw) zijn identiek voor alle sulfonamiden, want afkomstig van het identieke deel van het molecuul. Voor de drie andere (in rood) is de m/z afhankelijk van de structuur van het variabele deel van het molecuul.

De drie groep-specifieke ionen bieden mogelijkheden om met MS-MS te speuren naar sulfonamiden in complexe monsters in een precursor-ion experiment. Sulfonamiden variëren in massa tussen 170 en 400 Da. In de eerste massaspectrometer MS1 scheiden we alle ionen op m/z en sturen ze door naar de botsingscel voor fragmentatie. In de tweede massaspectrometer MS2 selecteren we alleen m/z 156. Als er onder de gevormde fragmenten een ion met m/z 156 is, dan zullen we dat detecteren via de tweede massaspectrometer. Zo vissen we alle moleculen eruit, die fragmenteren tot m/z 156.



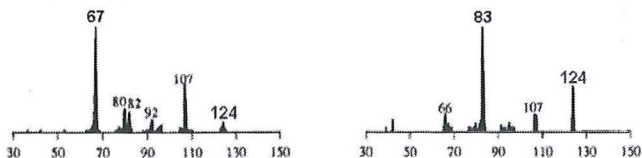
Nu wordt het eindelijk eens tijd om melk te gaan analyseren. We voegen aan melk zes sulfonamiden toe in een concentratie van 1 microgram per liter. We kijken of we ze terug kunnen vinden. Het analyseschema is alweer gecompliceerder geworden. Natuurlijk moeten we nog steeds extraheren, het extract opschonen en chromatografisch scheiden. In plaats van een eenvoudige scheiding op m/z voeren we nu het precursor-ion experiment uit.

In het chromatogram kunnen we alle zes de componenten detecteren [2]. Dit is een goed voorbeeld van het vissen naar doelstoffen op basis van structuur-specifieke fragmenten, die in de tandem massaspectrometer gevormd worden. Het is een selectieve methode, omdat maar weinig moleculen zo'n fragment m/z 156 opleveren. We kunnen bovendien de selectiviteit nog verbeteren door niet alleen naar m/z 156, maar ook naar m/z 92 te kijken. Dan zien we alleen een signaal, een piek, wanneer de component zowel m/z 156 als m/z 92 geeft in de fragmentatie.



Er blijft nog wel een probleem over. Want die piek met m/z 279: welke component is dat? We hebben immers twee sulfonamiden met m/z 279. Hoe moeten we

die onderscheiden? In het fragmentatieschema zien we, dat beide componenten dezelfde fragment-ionen zullen opleveren. Het onderscheid tussen deze twee verbindingen kunnen we alleen maken door het structuur-specifiek fragment-ion m/z 124 verder te fragmenteren. Daarvoor moeten we een MS-MS-MS experiment uitvoeren.



Laten we eerst maar even kijken naar het resultaat. In de eerste massaspectrometer hebben we m/z 279 geselecteerd [3]. In de fragmentatie ontstaat ondermeer het ion met m/z 124. Dat selecteren we in de tweede massaspectrometer. Er ontstaan verschillende fragmenten. Sulfamethazine geeft duidelijk een ander spectrum dan sulfisomidine, kijk maar naar de pieken bij m/z 67 en 83, in blauw aangegeven in de onderste spectra. Via interpretatie van de spectra kunnen we de componenten onderscheiden en identificeren.

Het analyseschema toont duidelijk aan wat ik eerder aangaf: multihyphenation of multidimensionaliteit. Om dit soort gecompliceerde problemen op te lossen moeten we allerlei technieken aan elkaar koppelen. Daar zitten grote uitdagingen in. We kunnen de verschillende stappen natuurlijk in verschillende kamers in het laboratorium uitvoeren, en de monsters tussen de verschillende stappen naar de volgende kamer dragen. Maar dan gaat er gemakkelijk iets fout. Steeds vaker, en zeker binnen het onderzoek van de vakgroep ACAS, proberen we de stappen zodanig te koppelen, dat er één analysesysteem ontstaat, waarin de verschillende stappen volledig geautomatiseerd op elkaar volgen. De computer bestuurt de verschillende onderdelen van het totale systeem en verzamelt de verkregen gegevens.

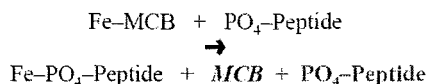
Een goed voorbeeld van meer-gecompliceerde multihyphenation vinden we in het werk van Natasja Visser [4], die enkefalines, dat zijn kleine neuropeptiden, analyseert in bloedplasma. De doelstoffen worden geïsoleerd in drie stappen: exclusie, ionenwisseling, en vaste-fase extractie. Het extract wordt tenslotte chromatografisch gescheiden ten behoeve van UV of massaspectrometrische detectie. Het gehele systeem is geautomatiseerd. Terwijl de monsters worden gemeten, kun je eerdere data uitwerken en rapporteren.

Door de jaren heen heeft de vakgroep ACAS een traditie opgebouwd in het ontwikkelen van multidimensionale systemen. Wellicht denkt u dat het daarbij

gaat om puur academische studies, dat de systemen veel te ingewikkeld zijn om in de praktijk toegepast te worden. Het tegendeel is waar. Een voorbeeld. Bij Lobith, Eijsden en in de Biesbosch liggen meetstations van Rijkswaterstaat, die de waterkwaliteit van het rivierwater continu bewaken. Die stations zijn uitgerust met het zgn. SAMOS systeem, dat door de vakgroep ACAS mede ontwikkeld werd. Gecombineerde vaste-fase extractie en chromatografie wordt inmiddels niet allen daar, maar wereldwijd toegepast.

Nu moeten we maar eens gaan kijken naar andere technieken om te vissen naar doelstoffen in complexe monsters. Ook aan de voorkant van zo'n complex systeem kunnen we nog veel bereiken. Want ook daar kunnen we gebruik maken van specifieke reacties, reacties gericht op specifieke eigenschappen van onze doelstoffen. Al in 1979, nog tijdens mijn scheikundestudie hier aan de Vrije Universiteit, werkte ik aan een ligandenuitwisselingsreactie om selectief zwavelhoudende verbindingen te vissen uit allerlei extracten, van groenten, van serum en urine [5].

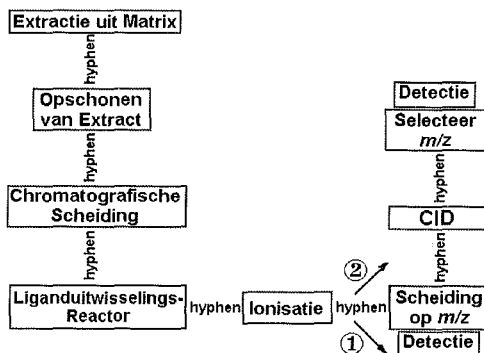
De zwavelverbindingen reageren met het palladium-calceïne complex. In deze reactie komt het fluorescerende calceïne vrij en kan met fluorescentiedetectie selectief gemeten worden. Het palladium-calceïne complex geeft zelf geen fluorescentie. We doen dus nu een indirecte detectie. We kiezen een boodschapper-molecule met goede detectie-eigenschappen. De boodschapper vertelt ons dat er in het monster componenten zitten die de ligandenuitwisselingsreactie aangaan.



Zo'n ligandenuitwisselingsreactie kan natuurlijk ook gekoppeld worden met massaspectrometrie. Hans Krabbe [6] onderzocht de mogelijkheden van een methode om selectief fosfopeptiden uit peptidemengsels te vissen. Fosforylering van peptiden en proteïnen speelt een belangrijke rol in velerlei processen in de levende cel. Daarom is er grote behoefte aan methoden die de fosfopeptiden van andere peptiden kunnen onderscheiden. De methode is gebaseerd op een reactie tussen fosfaatgroepen in de peptiden en het ijzer-MCB complex, waarbij het vrijkomende MCB als boodschapper-molecule optreedt.

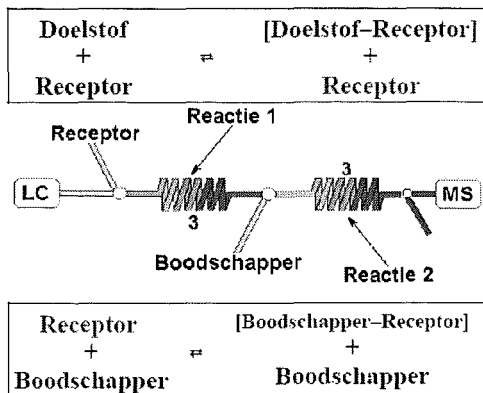
In plaats van massaspectrometrie kun je natuurlijk allerlei andere detectoren gebruiken. En dat doen we ook, bijv. laser-gebaseerde spectroscopische detectiesystemen. Maar het bijzondere van de massaspectrometer is dat daarmee ener-

zijds zeer kleine hoeveelheden of concentraties van de doelstof gemeten kunnen worden, en anderzijds component-specifieke informatie kan worden verkregen. En we moeten steeds lagere concentraties kunnen zien. Wat we gemakkelijk kunnen zien, dat weten we nu wel. We moeten steeds dieper graven, steeds nauwkeuriger en gevoeliger kijken. Daarin speelt massaspectrometrie een belangrijke, centrale rol, als een spin in het web.



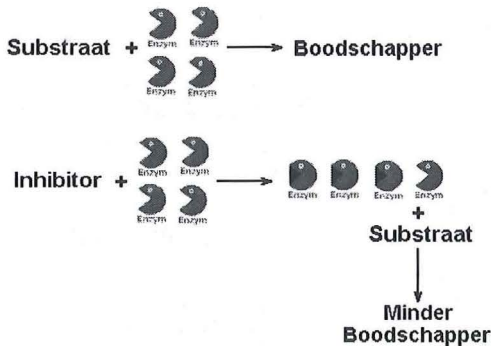
Bovendien, als we een massaspectrometer gebruiken voor de detectie kunnen we tegelijkertijd ons boodschapper-molecule én de vrije doelstof detecteren. Bovenin zie we het chromatogram voor het MCB boodschapper-molecule. De twee pieken corresponderen met fosfopeptiden, die we ook afzonderlijk in vrije toestand kunnen waarnemen. Het ala-met-enkefaline bevat geen fosfaatgroep en geeft daarom geen signaal in het MCB boodschapper chromatogram.

Idealiter zullen we dan iedere seconde heen-en-weer stappen tussen detectie van het boodschapper-molecule in MS en detectie en fragmentatie van de doelstof in MS-MS. Bij de detectie van het boodschapper-molecule zullen we het instrument direct in de data laten zoeken naar ionen van de doelstoffen, die we vervolgens in MS-MS fragmenteren. Uit het MS-MS product-ionen spectrum kunnen we dan de identiteit van een onbekende doelstof ophelderen. De benodigde software om dit soort intelligente data-acquisitie experimenten te kunnen uitvoeren, is beschikbaar.



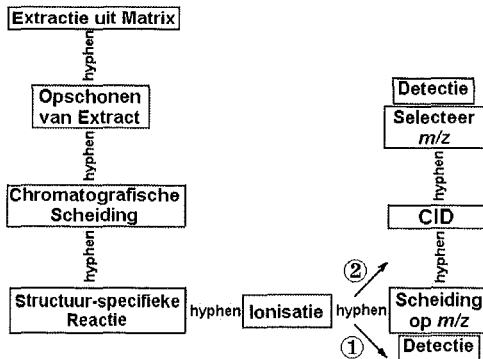
Naast ligandenuitwisselingsreacties tussen doelstoffen en metaalcomplexen zijn er nog legio andere reacties, waarmee we selectief doelstoffen kunnen vissen uit mengsels. We kunnen bij voorbeeld gebruik maken van diverse biochemische reacties. Rico Derks [7-8] houdt zich bezig met de ontwikkeling van methoden gebaseerd op biochemische interacties. Biotine kan worden gebruikt als boodschapper-molecule om de affiniteit van streptavidine voor diverse gebiotinyleerde liganden te bepalen. Door wederom heen-en-weer te stappen tussen MS detectie van het biotine boodschapper-molecule en MS-MS detectie en fragmentatie van de gebiotinyleerde liganden kunnen zowel de affiniteit als de structuur van onbekende doelstoffen worden bepaald.

Junko Hirata [9] en Arjen de Boer [10] bestuderen op verschillende manieren weer andere biochemische reacties om te kunnen vissen naar doelstoffen. Het gaat daarbij om de enzymatische omzetting van een substraat in de boodschapper-moleculen. De doelstoffen zijn componenten, die de werking van het enzym kunnen blokkeren. Als de doelstof de werking van het enzym blokkeert, zal er minder boodschapper-molecule worden gevormd. Zij maken hierbij naast massaspectrometrie ook gebruik van andere detectietechnieken, zoals fluorescentie resonantie energie-transfer (FRET).



In dit voorbeeld zoeken we in een fungi-extract naar inhibitoren voor het enzym Cathepsine B. Als op enig tijdstip een inhibitor van de chromatografische kolom komt, resulteert dat in een negatieve piek voor het boodschapper-molecule, zoals bij 3.2 minuten. Weer stappen we iedere seconde heen-en-weer tussen specifieke detectie van het boodschapper-molecule en de detectie van mogelijke doelstoffen. In het massaspectrum zien we mogelijke enzym-inhibitoren. Het fungi-extract is een complex mengsel. Veel verbindingen coëlueren in het chromatogram. Pas als we zorgvuldig naar de chromatografische piekvorm gaan kijken, kunnen we vaststellen welke component verantwoordelijk is voor het biologische effect. Om succesvol te zijn in dit soort projecten zoeken we steeds samenwerking met andere groepen binnen en buiten de universiteit.

Uit deze voorbeelden komt zoveel als een algemene analytische strategie naar voren. Na de isolatie en monstervoorbewerking worden de doelstoffen onderworpen aan een structuur-specifieke reactie, die de detectiemogelijkheden met behulp van massaspectrometrie versterkt. Deze ontwikkeling heeft toepassingsmogelijkheden op velerlei gebied. Naast de detectie van doelstoffen in het milieu, in voedingsmiddelen, in bloed- en urinemonsters voor klinische toepassingen, in dopingsonderzoek in de sportwereld, kijken ook farmaceutische industrieën belangstellend toe. Structuur-specifieke screening is een belangrijke stap in geneesmiddelontwikkeling. Dit zal de komende jaren een belangrijke rol spelen in het onderzoek van de vakgroep ACAS via haar participatie in multifaculaire samenwerkingsverbanden binnen de Vrije Universiteit.



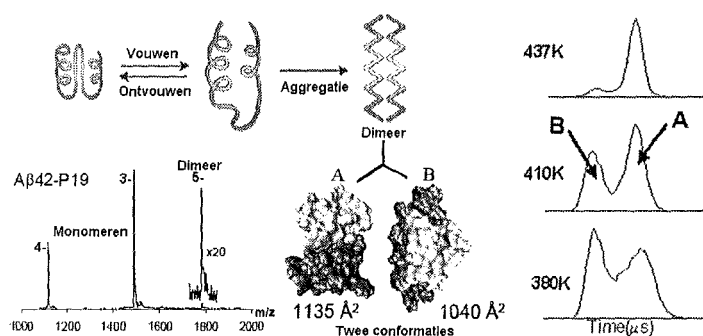
Omdat we in groeiende mate ook grote moleculen, enzymen, antilichamen, receptoren en ander proteïnen, in ons onderzoek betrekken, zal het duidelijk zijn dat onze doelstoffen niet alleen kleine, maar ook grote moleculen zouden kunnen zijn. Johannes Hoos houdt zich bezig met de ontwikkeling van selectieve methoden om farmaceutisch interessante proteïnen te bepalen in lichaamsvloeistoffen, met name plasma en urine. Daarbij zal hij gebruik maken van specifieke interacties van die proteïnen met weer andere proteïnen, namelijk antilichamen, om in eerste instantie zijn doelstoffen selectief op te vissen uit het complexe eiwitmengsel dat plasma toch eigenlijk is. Zoals uit het massaspectrum blijkt, zal de massaspectrometrische detectie en karakterisering van dergelijke proteïnen nog een grote uitdaging zijn.

De specifieke detectie en karakterisering van grote moleculen zoals proteïnen behoort tot het opwindende en momenteel zeer populaire onderzoeksgebied van de proteomics. De inmiddels beproefde methode voor de karakterisering van proteïnen bestaat uit de isolatie van de doelstof uit de biologische matrix, de enzymatische behandeling van het proteïne met een protease, bij voorbeeld trypsine, dat het proteïne in kleinere brokstukken, peptiden knipt. Die peptiden kunnen we verder karakteriseren, dat wil zeggen, de volgorde van de aminozuren bepalen, met behulp van tandem massaspectrometrie. De bioinformatica speelt hierin een essentiële rol.

Jeroen Carol en Natasja Visser houden zich, temidden van hele volksstammen die aan proteomics werken, bezig met de automatisering van dit soort processen via multihyphenated technieken. Alle stappen van het proces worden in één systeem verricht. Dat is een veelbelovende aanpak voor sommige problemen binnen het proteomics veld. Ook binnen ons onderzoek zal de rol van proteo-

mics toenemen. Ook daarin ontwikkelen zich interessante samenwerkingsverbanden binnen en buiten de Vrije Universiteit.

Tot slot wil ik nog met u praten over de ziekte van Alzheimer. Dat is een neurodegeneratieve ziekte, waaraan wereldwijd zo'n vier miljoen mensen lijden. Enzymen buiten de hersencellen kunnen het uiteinde van een bepaald transmembraaneiwit afknippen. Daarbij wordt een beta-amyloïde-peptide afgesplitst, 40 of 42 aminozuren lang. Het peptide met 42 aminozuren is de boosdoener. Dat kan zich in de extracellulaire vloeistof op verschillende manieren oprollen. In één van die vormen vindt er aggregatie plaats tot multimere vormen, die minder oplosbaar zijn en als fibrillen neerslaan in de hersenen.



Die aggregaten verminderen de doorbloeding van de hersenen. Dit is zichtbaar te maken met behulp van positron emissie tomografie. In post-mortem hersenweefsel zijn de gevormde fibrillen gemakkelijk te herkennen als de bruinige vlekken in de rechterfiguur. Soortgelijke proteïne aggregaten staan ook aan de basis van de ziekten van Parkinson en van Creutzfeldt-Jacobs.

Voor de massaspectrometrie vormen deze aggregaten een bijzondere uitdaging. Er zijn bij voorbeeld tenminste twee dimere conformaties bekend, die natuurlijk dezelfde massa hebben, en dus niet massaspectrometrisch onderscheiden kunnen worden. Maar deze twee conformaties hebben verschillende vormen, en ook verschillende grootte. Ze nemen verschillende ruimte in.

Van die eigenschap maken we gebruik in een ion-mobiliteitsspectrometer. We moeten dus een ionen-mobiliteitssysteem plaatsen tussen de ionisatiestap en de m/z -scheiding. Laten we ons op dit moment maar geen zorgen maken over al de haken en ogen dat dit heeft. Daarvoor moeten we eens grondig met de natuurkundigen praten. Laten we maar eens naar de resultaten kijken.

Door het verschil in ruimtelijke grootte van bijna honderd vierkante Ångström, dat is één miljardste vierkante meter, hebben de twee conformaties verschillende ionenmobiliteit en worden ze in de tijd van elkaar gescheiden. Het verschil is enkele microseconden. Zo kunnen we daadwerkelijk aantonen dat beide vormen aanwezig zijn [11-12]. De gecombineerde ion-mobiliteit-massaspectrometrie biedt aanvullende informatie naast die van de conventionele methoden voor de bepaling van proteïne-conformatie, zoals Röntgen diffractie en kernspinresonantiespectrometrie.

Mijnheer de rector, dames en heren,

Aan het einde van mijn rede wil ik de Stichting Het Vrije Universiteitsfonds, het College van Bestuur en het College van Decanen bedanken voor het in mij gestelde vertrouwen. Een wetenschappelijke carrière is mede het gevolg van de stimulans van leermeesters, leerlingen en vele collega's. In het bijzonder wil ik vier van hen bedanken voor hun rol hierin: wijlen prof. Roland Frei voor zijn inspiratie, prof. Nico Nibbering voor zijn niet-aflatende energie, prof. Hans Poppe, mijn promotor aan de Universiteit van Amsterdam, voor zijn fundamentele inslag. En prof. Udo Brinkman, die in 1981 het scriptie-onderwerp aandroeg, waarmee ik voor het eerst met de massaspectrometrie in aanraking kwam, en ook daarna verschillende essentiële bijdragen heeft geleverd aan mijn carrière, niet in de laatste plaats in relatie tot vandaag.

In het wetenschappelijk bedrijf heb ik mogen samenwerken met vele collega's in binnen- en buitenland. Zij zijn een inspiratie voor mij. Samen vormen ze een bijzondere vriendenkring. Velen van hen zijn hier vandaag aanwezig, zelfs vanuit het buitenland. Ik dank hen voor hun komst vandaag en voor de plezierige samenwerking door de jaren heen. I thank my colleagues from abroad for their inspiration, collaboration and friendship. Ik dank ook mijn collega's in mijn deeltijdwerkkring binnen de vakgroep ACAS hier aan de Vrije Universiteit, Hubertus Irth, Cees Gooijer, de overige leden van de vaste staf, Gisèle Cassee en ander ondersteunend personeel, en natuurlijk Camiel de Jong en alle AIO's met wie ik intensief mag samenwerken.

In goede tijden en in kwade tijden weet ik dat ik altijd kan steunen op mijn broers, mijn familie en vrienden. Zij zijn van onschatbare waarde voor mij. Mijn ouders kunnen dit niet meebeleven, maar ik weet dat ze toekijken. Het wetenschappelijk bedrijf slokt veel van mijn tijd en energie op, maar in het leven is het voor mij uiteindelijk slechts een bijbaantje. Irene en Esther, jullie zijn mijn echte werk. Van jullie gaat een bijzondere inspiratie uit. Al bijna 29 jaar weet ik ook Rig aan mijn zijde, mijn maatje, mijn levensgezel. Samen, samen gaan we voort.

Voor jullie drieën schieten dankwoorden te kort. Mede namens de Vrije Universiteit dank ik jullie, dat jullie me zo vaak uitlenen.

Mijn proefschrift in 1986 opende met deze woorden uit psalm 19. Vandaag zal ik ermee eindigen [13].

De hemel ontvouwt de glorie van God,
het uitspansel roemt het werk van zijn handen.
De dag geeft het door aan de volgende dag,
de nachten vertellen elkaar wat zij weten.
Het is geen spreken, er zijn geen woorden
en hun stemmen zijn niet te horen;
toch, overal wordt hun ritme vernomen,
hun echo reikt tot de rand van de aarde.

Tot slot dank ik u allen voor uw aanwezigheid en aandacht. Ik heb gezegd.

Referenties

1. W.M.A. Niessen, *Analysis of antibiotics by liquid chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 812 (1998) 53.
2. D.A. Volmer, *Multiresidue determination of sulfonamide antibiotics in milk by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 10 (1996) 1615.
3. K.P. Bateman, S.J. Locke, D.A. Volmer, *Characterization of isomeric sulfonamides using capillary zone electrophoresis coupled with nano-electrospray quasi-MS–MS–MS*, J. Mass Spectrom., 32 (1997) 297.
4. N.F.C. Visser, H. Lingeman, H. Irth, *On-line coupling of three-dimensional liquid chromatography based sample preparation with reversed-phase liquid chromatography for the determination of enkephalin derivatives as model compounds in biofluids*, Chromatographia, in press.
5. C.E. Werkhoven-Goewie, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman and R.W. Frei, *Liquid chromatographic detector for organosulphur compounds based on a ligand-exchange reaction*, J. Chromatogr., 203 (1981) 165.
6. J.G. Krabbe, H. Lingeman, W.M.A. Niessen and H. Irth, *Ligand-exchange detection of phosphorylated peptides using liquid chromatography electrospray mass spectrometry*, Anal. Chem., 76 (2004) in press.
7. A.C. Hogenboom, A.R. de Boer, R.J.E. Derks and H. Irth, *Continuous-flow, on-line monitoring of biospecific interactions using electrospray mass spectrometry*, Anal. Chem., 73 (2001) 3816.
8. R.J.E. Derks, A.C. Hogenboom, G. van der Zwan and H. Irth, *On-line continuous-flow, multi-protein biochemical assays for the characterization of bioaffinity compounds using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, Anal. Chem., 75 (2003) 3376.
9. Junko Hirata, F. Ariese, C. Gooijer and H. Irth, *Continuous-flow protease assay based on fluorescence resonance energy transfer*, Anal. Chim. Acta, 478 (2003) 1.
10. A.R. de Boer, T. Letzel, D.A. van Elswijk, H. Lingeman, W.M.A. Niessen and H. Irth, *On-line coupling of high-performance liquid chromatography to a continuous-flow enzyme assay based on electrospray ionization mass spectrometry*, submitted for publication.
11. Th. Wyttenbach, E. Shammel Baker, S.L. Bernstein, A. Frezoco, J. Gidden, D. Liu and M.T. Bowers, *The ion mobility mass spectrometry method and its application to duplex formation of oligonucleotides and aggregation of proteins*, Proceedings 16th International Mass Spectrometry Conference, 1–5 September 2003, Edinburgh, UK, in press.

12. S.L. Bernstein, Th. Wytenbach, M.T. Bowers, G. Bitan and D.B. Teplow, *Conformation and clustering of Alzheimer's peptides Abeta40 and Abeta42*, Proceedings 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 8–12, 2003, Montréal, Quebec, Canada.
13. Uit psalm 19, vertaling door Huub Oosterhuis en Michel van der Plas, Ambo, 1967.

derzoeken doorgeven veronderstellen bevestigen luister
geven veronderstellen bevestigen luisteren verwonderen waarnemen verwijzen vergelijken verbind
en doorgeven veronderstellen bevestigen luistere
eken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren verwonderen waarnemen verwijzen vergelijken verbinden
beken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren v
zoeken doorgeven veronderstellen bevestige
eken doorgeven veronderstellen bevestigen luisteren verwonderen waarnemen verwijzen vergelij
erzoeken doorgeven veronderstellen bevestigen luisterer
onderen waarnemen verwijzen vergelijken verbinden toetsen onderzoeken doorgeven veronderstel



VU Boekhandel/Uitgeverij Amsterdam
ISBN 90 - 5383 - 908 - 9