

Imaging von Biomarkern

Ein GPS für Proteine und Metabolite

RALF KETTERLINUS, SÖREN DEININGER
BRUKER DALTONIK GMBH, BREMEN

MALDI-Imaging-Massenspektrometrie (MALDI-MSI) bietet neue Möglichkeiten bei der Erforschung von Proteinen und Pharmaka auf Gewebeebene. Die Technologie findet Anwendung in der klinischen Proteomforschung zur Lokalisierung von Biomarkern wie auch in der Erforschung der Verteilung von Wirkstoff-Metaboliten.

MALDI Imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) provides new possibilities for the investigation of proteins and pharmaceuticals on tissue level. The technology is also applied in clinical proteome research and for investigating pharmacological treatments.

Die Technologie

Die Massenspektrometrie ist allgemein anerkannt als präzises Instrument, um Peptide, Proteine, Lipide, kleine Moleküle oder auch DNA-Fragmente zu analysieren. Im Prozess der MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)-Massenspektrometrie wird die Probe mit einer Matrix-Substanz gemischt und anschließend mit einem Laser bestrahlt (Abb. 1). Durch den Laserbeschuss werden Ionen aus der Probe freigesetzt, im elektrischen Feld beschleunigt und deren Flugzeit bis zum Auftreffen auf einen Detektor gemessen – das *time-of-flight*-Prinzip. Anhand der Flugzeit der entstandenen Ionen kann auf deren relatives Gewicht geschlossen werden. Alle entstandenen Ionen eines Messpunktes werden in einem Massenspektrum zusammengefasst (Abb. 1, rechts). Bei der MALDI-MSI wird nun ein Gewebeschnitt mit dem Laser abgerastert (Abb. 1, links) und von jedem Messpunkt ein Massenspektrum erzeugt. Ordnet man den Massenbereichen verschiedene Farben zu und korreliert die Intensität des Signals mit der Farbintensität, so erhält man eine „Massentopografie“ des gescannten Gewebeabschnitts (Abb. 1, rechts).

Die molekulare Komponente zur Histologie

Eine wesentliche Bedingung für den Erfolg der Methode in der histologischen oder histopathologischen Untersuchung ist die zwin-

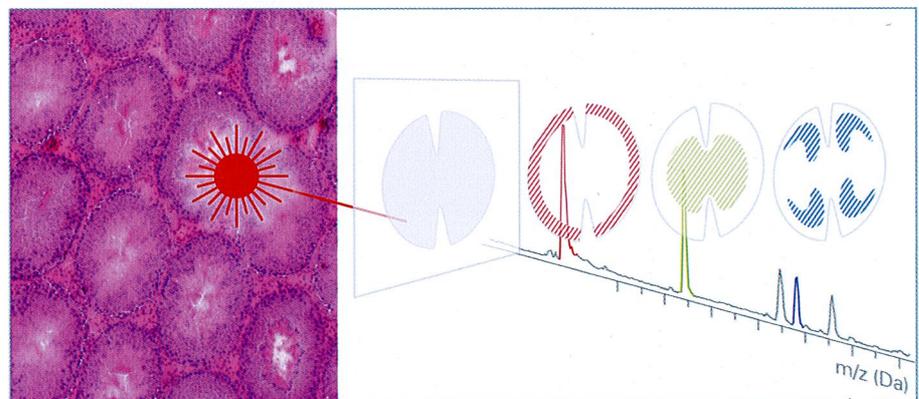
gende Notwendigkeit, die Signale der molekularen Marker der MALDI-MSI mit der Gewebemorphologie exakt zu korrelieren, um der Komplexität etwa des Tumorgewebes Rechnung zu tragen. Ein neuartiger Ansatz integriert beide bildgebende Verfahren und ermöglicht so die exakte Auswertung histologischer Daten in Kombination mit einer weiteren Dimension, dem molekularen Phänotyp [1, 2]. Die Kombination von MALDI-MSI mit der klassischen Histologie führt zu einer neuen Methode, der Molekularen Histologie. *State-of-the-art*-Protokolle sind mittlerweile für verschiedene Gewebetypen verfügbar [3].

Welche Auflösung ist möglich?

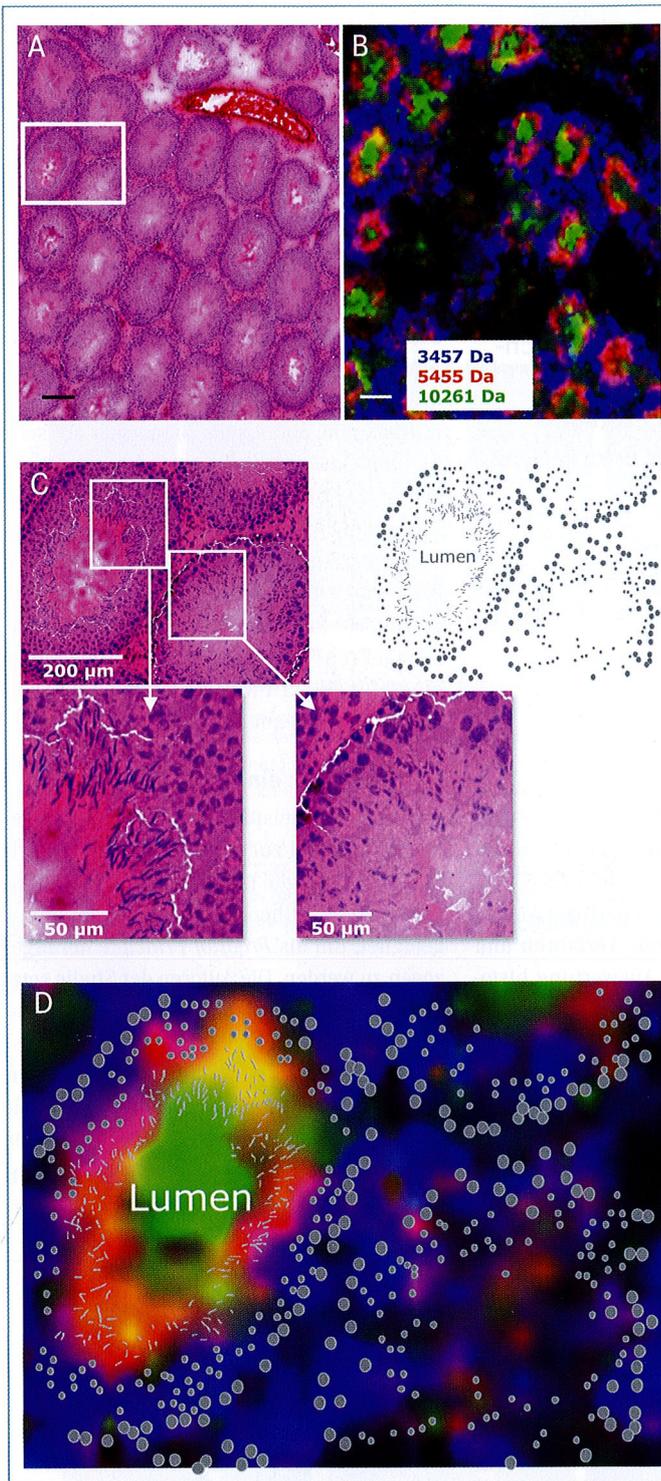
Zurzeit ist mittels MALDI-MSI eine laterale Auflösung von 20 Mikrometern möglich [4]. Dies ist ausreichend, um Mikroskopie und MALDI-MSI so zu korrelieren, dass aussagekräftige Resultate erzielt werden. Es gelingt mittlerweile, potenzielle Biomarker auf sehr kleinen Gewebereichen genau zu lokalisieren [2, 3]. Eine präzise und aussagestarke Bildgebung wird durch verschiedene Anwendungen ermöglicht: Eine automatisierte Probenvorbereitung, welche eine intelligente, optimierte Probenvorbereitung ermöglicht (ImagePrep™ [5]), sowie die Entwicklung eines für MALDI-MSI maßgeschneiderten Lasers (smartbeam II™ [6]).

Rattenhoden: ein Real-Life-Modell

Im folgenden Beispiel wird die Spermatogenese als Modell zur Validierung der MALDI-MSI herangezogen [4, 7]. Die testikuläre Säugeranatomie ist hochkomplex und somit gut geeignet, um als *Proof of Principle* herangezogen zu werden. Die Autoren der Studie setzten eine kommerziell verfügbare Technologie ein und etablierten einen Workflow, der ausgehend von einer MALDI-MSI-Auflösung von 20 Mikrometern eine präzise Korrelation mit hochauflösenden optischen Bildern aus der histologischen Praxis einschließt. **Abbildung 2A** zeigt eine H & E-Färbung (Hämatoxy-



▲ **Abb. 1:** MALDI-Imaging-Massenspektrometrie (MALDI-MSI) visualisiert die Verteilung von Molekülen im Gewebe. Von jedem Punkt des Gewebes (links, H & E-gefärbtes histologisches Präparat) werden durch Laserbeschuss Massenspektren etwa von Peptiden erstellt. Eine Software errechnet aus den Massenpeaks (rechte Grafik) die Verteilung im Gewebe und kartiert somit die verschiedenen Analyten (rot, gelb und blau gefärbte Schemata). Diese werden dann mit histopathologischen Befunden korreliert. Weitere Erklärungen im Text.



◀ **Abb. 2:** Gewebeschnitt vom Rattenhoden. **A**, H & E-Färbung; **B**, korrespondierendes MALDI-MSI-Bild. Einige Tubuli weisen eine ringförmige Struktur auf (rot). Maßstabsbalken: 200 μ m. **C**, Vergrößerung des weißen Rechtecks in **A** (Schema rechts oben) und weitere Vergrößerungen: Nun werden verschiedene morphologische Strukturen sichtbar. Im linken Tubulus sind die gestreckten Nuklei reifer Spermatisiden erkennbar, welche im rechten Tubulus, ohne reife Spermatisiden, fehlen. **D**, Überlagerung der schematischen Darstellung mit dem MALDI-MSI-Bild. Die rote Ringstruktur kann exakt den Nuklei der reifen Spermatisiden zugeordnet werden, sie ist nur im linken Tubulus zu finden. Farbcodierung siehe **B** (aus [7]).

lin/Eosin) des Rattenhodens, welche nach der MALDI-MSI erstellt wurde. In den überlagerten MALDI-MSI-Bildern (**Abb. 2B**) zeigte sich eine konzentrische Struktur in nur einigen der Tubuli (rot: 5.455 Dalton). Die Struktur fehlt offensichtlich in anderen Tubuli. Als die Autoren die Tubuli mit stärkerer Vergrößerung untersuchten (**Abb. 2C**), zeigte sich, dass in einigen Tubuli Spermatisiden in einer späten Phase der Reifung vorhanden waren –

gekennzeichnet durch einen verlängerten Nukleus. Das MALDI-MSI-Bild in **Abbildung 2D** zeigt die eindeutige Zuordnung der Masse 5.455 Dalton zu den reifen Spermatisiden, während benachbarte Tubuli diese Masse nicht aufweisen.

Fazit

Mit der MALDI-MSI ist es möglich, direkt in Gewebeschnitten, auf molekularer Ebene,

Krankheitsstadien zu unterscheiden oder Tumoren zu klassifizieren. Zugleich wird die Technologie eingesetzt, um die Verteilung pharmazeutischer Wirkstoffe in Geweben zu verfolgen [8, 9]. Mit dieser Methode können sehr komplexe Strukturen im molekularen Bereich präzise analysiert werden. Im intakten Gewebe können dabei die Verteilungen der Analyten visualisiert und in den Kontext der histologischen und klinischen Situation gebracht werden. Dabei kann auf die Verwendung von molekularen Sonden zur Detektion von Markern verzichtet werden, was die Entdeckung von diagnostischen und prognostischen Markern möglich macht [3]. ■

Literatur

- [1] Deininger SO, Krieg R, Rausser S et al. (2008) Advances in Molecular Histology with the MALDI Molecular Imager. Bruker Daltonics Application Note MT-89
- [2] Rausser S, Deininger SO, Suckau D et al. (2010) Approaching MALDI molecular imaging for clinical proteomic research: current state and fields of application. *Expert Rev Proteomics* 7:927–941
- [3] Schwamborn K, Caprioli RM (2010) Molecular imaging by mass spectrometry – looking beyond classical histology. *Nat Rev Cancer* 10:639–646
- [4] Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R et al. (2011) Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20 μ m resolution. *Mol Cell Proteomics* 10:M110.005991
- [5] Schuereberg M, Luebbert C, Deininger SO et al. (2007) A New Device for Automated MALDI Imaging High Performance Sample Preparation. Bruker Daltonics Technical Note TN-18
- [6] Holle A, Haase A, Kayser M et al. (2006) Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *J Mass Spectrom* 41:705–716
- [7] Becker M, Schuereberg M, Suckau D et al. (2009) MALDI Imaging of Proteins at 20 μ m Resolution On the ultrafleXtreme. Bruker Daltonics Application Note MT-97
- [8] Groseclose MR, Andersson M, Hardesty WM et al. (2007) Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42:254–262
- [9] Chaurand P, Cornett DS, Caprioli RM (2006) Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 17:431–436



Ralf Ketterlinus (links) und Sören Deininger

Korrespondenzadresse:

Dr. Sören Deininger
Bruker Daltonik GmbH
Fahrenheitstraße 4
D- 28359 Bremen
Tel.: 0421-22050
Fax: 0421-2205-103
sod@bdal.de

www.bruker.com/malDIMolecularImager