

# Massenspektrometrische Histologie: markierungsfreie Gewebecharakterisierung durch hochgenaue bildgebende Bioanalytik\*\*

Andreas Römpf, Sabine Guenther, Yvonne Schober, Oliver Schulz, Zoltan Takats, Wolfgang Kummer und Bernhard Spengler\*

Die histologische Untersuchung von biologischen und medizinischen Proben hat ihre Universalität und herausragende Bedeutung in erster Linie durch die Kombination von spezifischen Färbetechniken und mikroskopischer Auswertung erreicht. Die Unterscheidbarkeit verschiedener Gewebearten nach spezifischer Anfärbung oder Markierung ist eine wesentliche Voraussetzung für eine histopathologische Untersuchung, z.B. die zuverlässige Diagnose von Krebs. Histochemische Färbetechniken können nur gezielt an bekannten Verbindungen eingesetzt werden, und nur eine begrenzte Zahl von Zielverbindungen kann in einer Gewebeprobe gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Eine weitere Einschränkung der klassischen Histologie besteht darin, dass umfangreiche Erfahrung erforderlich ist und dass selbst routinierte Pathologen angefärbte histologische Schnitte oftmals unterschiedlich interpretieren.

Die Massenspektrometrie (MS) liefert dagegen zwar komplexe, dafür aber objektive und reproduzierbare Informationen über biologisches Material. Die Abbildung biologischer Proben durch MS hat stark an Interesse gewonnen durch die Entwicklung der matrixassistenten Laserdesorption-Ionisation (MALDI), einer Methode zur Desorption und Ionisation von Biomolekülen wie Peptiden, Proteinen, Glykanen oder Lipiden mit Nachweisgrenzen im Attomol-Bereich. Die erste Machbarkeitsstudie zur bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie wurde im Jahre 1994 vorgestellt,<sup>[1]</sup> gefolgt von einer großen Zahl von Anwendungen im vergangenen Jahrzehnt.<sup>[2–8]</sup> Ein ausführlicher Überblick über instrumentelle Entwicklungen und Methoden der bildge-

benden MS wurde kürzlich veröffentlicht.<sup>[7]</sup> Bildgebende MS ermöglicht die Untersuchung und Darstellung der räumlichen Verteilung von Analyten in einer Probe in halbquantitativer Weise und ohne die Notwendigkeit der Vorauswahl oder Markierung von Zielsubstanzen vor der eigentlichen Analyse. Bildgebende MALDI-MS („MALDI imaging“) wird zumeist mit einer räumlichen Auflösung zwischen 50 und 200  $\mu\text{m}$  betrieben.<sup>[3]</sup> Eine Verbesserung der Auflösung bis in den Mikrometerbereich ist möglich, erfordert jedoch eine sehr niedrige Nachweisgrenze des Massenspektrometers, da die verfügbare Menge an Probenmaterial pro abgebildetem Rasterpunkt bei der Verkleinerung des Laserbrennpunkts quadratisch mit dessen Durchmesser abnimmt.<sup>[1,9–10]</sup>

Eine unmittelbare Identifizierung von Molekülen während der bildgebenden MS-Analyse ist in der Regel nicht möglich, wenn Massenspektrometer mit niedrigem Massenauflösungsvermögen und niedriger Massengenauigkeit verwendet werden. Üblicherweise werden in diesen Fällen zusätzlich parallele Untersuchungen der homogenisierten Gewebeprobe durchgeführt, um die Ergebnisse der analytischen Abbildungen abzusichern. Die Massenselektivität bei der Bilderzeugung, d.h. die Massenbreite der bilderzeugenden Kanäle, wird in der Regel auf eine Masseneinheit festgesetzt.

Der Einsatz der bildgebenden Massenspektrometrie zur Erlangung valider histologischer Informationen erfordert noch eine Reihe von Verbesserungen:

1. Die nutzbare räumliche Auflösung muss hoch genug sein, um zelluläre Eigenschaften beurteilen zu können.
2. Die analytische Empfindlichkeit muss hoch genug sein, um auch in räumlich hochauflösenden Studien den wesentlichen Teil interessanter Substanzen sichtbar machen zu können.
3. Das Massenauflösungsvermögen und die Massengenauigkeit sollten so hoch wie möglich sein, wenn komplexe biologische Proben untersucht werden. Um ein Massensignal eindeutig einem Verteilungsbild zuzuordnen und eine abgebildete Substanz auf der Basis akkurater Massen identifizieren zu können, müssen die Signale stabil und korrekt in der Masse sein. Die Massengenauigkeit muss dafür im unteren ppm-Bereich liegen.
4. Die Verknüpfung eines Verteilungsbilds mit einem Massensignal muss sowohl hochselektiv als auch flexibel sein. Um benachbarte Massensignale in biologischen Proben voneinander trennen zu können, muss das bildgebende Massenfenster in der Regel schmaler als 0.1 Masseneinheiten sein.
5. Zur eindeutigen Identifizierung abgebildeter Analytsubstanzen in komplexen Proben müssen MS<sup>n</sup>-Daten aus der

[\*] Dr. A. Römpf, S. Guenther, Y. Schober, O. Schulz, Dr. Z. Takats, Prof. Dr. B. Spengler  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Schubertstraße 60, Haus 16, 35392 Gießen (Deutschland)  
Fax: (+49) 641-993-4809  
E-Mail: bernhard.spengler@anorg.chemie.uni-giessen.de  
Homepage: <http://www.uni-giessen.de/analytik>

Prof. Dr. W. Kummer  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Aulweg 123, 35392 Gießen (Deutschland)

[\*\*] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch die Europäische Union (STREP-Projekt LSHG-CT-2005-518194), durch den European Research Council (ERC starting grant 2008, ZT) und durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, NGFN-Projekt 0313442). Wir danken Tamara Papadakis für die Anfertigung der Kryoschnitte.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905559> zu finden.

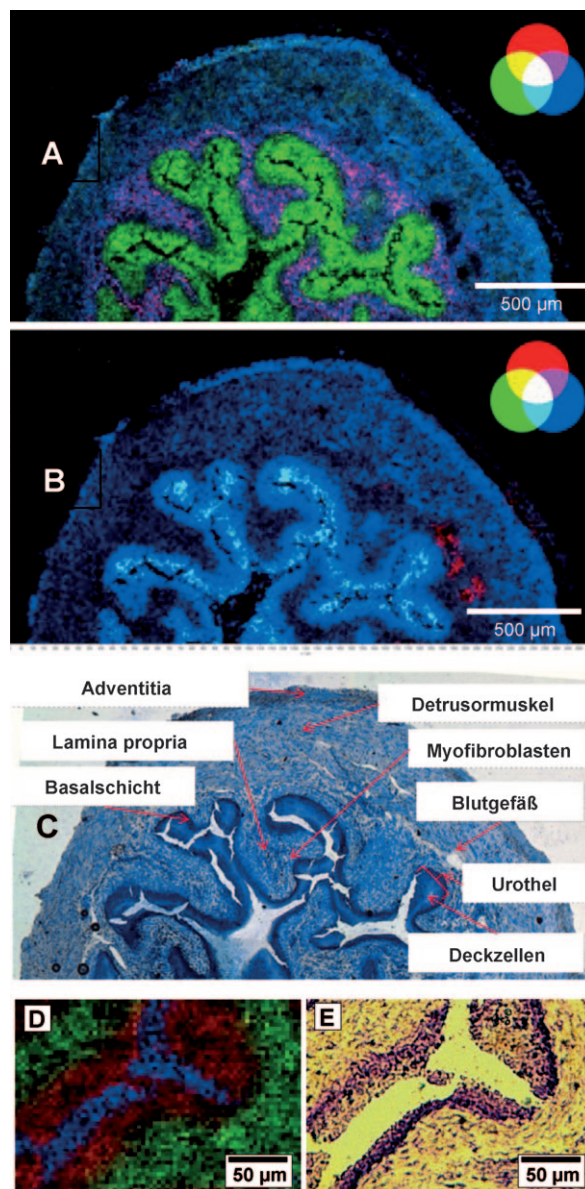
- Fragmentierung von Vorläuferionen unmittelbar aus einzelnen Rasterpunkten der Probe erzeugt werden können.
6. Anstelle von Hochvakuumbedingungen sind oft Untersuchungen unter Umgebungsdruck notwendig, zum Beispiel wenn unter physiologischen Bedingungen gearbeitet werden muss, wenn flüchtige Verbindungen abgebildet werden sollen oder wenn vakuuminstabile Matrices verwendet werden.
  7. Probenhandhabung und -vorbereitung müssen schnell und zuverlässig durchgeführt werden können.
  8. Die Ergebnisse bildgebender MS müssen in vertretbarer Zeit erzielbar sein.

Einige dieser Erfordernisse sind bereits einzeln, jedoch nicht gleichzeitig erfüllt worden. Ein hohes Massenaufklärungsvermögen, verknüpft mit einer hohen räumlichen Auflösung von  $7\text{ }\mu\text{m}$ , wurde an einem Ionenfallen-Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (IT-FTICR-MS)<sup>[9]</sup> demonstriert, jedoch war die Nachweisempfindlichkeit nicht ausreichend. Die Abbildung biologischer Proben mit FTMS konnte mit einer räumlichen Auflösung von lediglich  $100\text{ }\mu\text{m}$  gezeigt werden.<sup>[5,6]</sup> Eine von uns entwickelte Ionenquelle wurde eingesetzt, um eine hohe räumliche Auflösung bei allerdings nur niedrigem Massenaufklärungsvermögen zu demonstrieren.<sup>[11]</sup> Ein alternativer Ansatz zur schnellen und hochauflösenden Abbildung, die Massenspektroskopie, besteht in der parallelen, ionenoptischen Abbildung des gesamten Probenbereichs für jeweils ausgewählte Massenfenster. Die Methode scheint großes Potenzial zu besitzen, ist jedoch bislang nur eingeschränkt nutzbar.<sup>[8]</sup> Sekundärionen-MS (SIMS) bietet eine sehr hohe räumliche Auflösung. Mit dieser Technik wurden bereits beeindruckende Ergebnisse erzielt.<sup>[12]</sup> SIMS-Untersuchungen sind allerdings meist begrenzt im Hinblick auf Massengenauigkeit bei hoher räumlicher Auflösung, Massenbereich und MS/MS-Fähigkeit. Desorptions-Elektrosprayionisation (DESI) besitzt großes Potenzial für die Messung unter Umgebungsbedingungen, erreicht jedoch keine zelluläre Auflösung.<sup>[13]</sup>

Im Folgenden präsentieren wir zum ersten Mal eine Kombination von hoher Massenaufklärung und -genauigkeit, hoher räumlicher Auflösung und niedriger analytischer Nachweisgrenze zur Charakterisierung und Unterscheidung von biologischem Gewebe auf zellulärer Ebene. Unser Atmosphärendruck-Raster-Mikrosonden-MALDI-Massenspektrometrie-System (AP-SMALDI-MS) liefert einen neuen Grad der Informationstiefe und -qualität für die histologische Untersuchung auf zellulärer Ebene. Verbindungen wurden auf der Basis akkurater Massen- und Produktionsanalyse unmittelbar aus den bildgebenden analytischen Daten identifiziert. Die Massengenauigkeit war typischerweise besser als  $1\text{ ppm}$  (siehe auch die Hintergrundinformationen).

Gewebetypen wurden aufgrund von Ionensignalen charakteristischer Phospholipide voneinander unterschieden. Phospholipide sind essenzielle Bausteine der Zellmembranen. Sie spielen daneben eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und sind daher von erheblicher Bedeutung im Zusammenhang mit zahlreichen Krankheiten. Die Analyse

ihrer enzymatischen Abbauprodukte, der Lysophosphocholine (LPC) ist in den Hintergrundinformationen beschrieben.  $20\text{ }\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte einer Maus-Harnblase wurden massenspektrometrisch mit  $10\text{ }\mu\text{m}$  Schrittweite gerastert. Anschließend wurden gewebespezifische Verbindungen aus den gewonnenen Daten zur Abbildung ausgewählt (Abbildung 1 A,B). Es wurde eine hervorragende Übereinstimmung mit den Gewebezuordnungen im Toluidinblau-gefärbten



**Abbildung 1.** Maus-Harnblase: A)  $10\text{ }\mu\text{m}$  Schrittweite, Überlagerung von ausgewählten Ionenbildern für  $m/z$  741.5307 (blau, Muskelgewebe, SM(34:1)), 798.5410 (grün, Urothel, PC(34:1)) und 743.5482 (rot, Lamina propria). B) Überlagerung der Ionenbilder für  $m/z$  798.5410 (blau, Urothel, PC(34:1)), 812.5566 (grün, Deckzellen, PE(38:1)) und 616.1767 (rot, Blutgefäße, Häm b,  $M^+$ ). C) Optisches Bild desselben Gewebeschnitts nach Färbung mit Toluidinblau. D)  $5\text{ }\mu\text{m}$  Schrittweite, Überlagerung der Ionenbilder für  $m/z$  114.9039 ( $\text{In}^+$  Substrat, blau), 798.5410 (PC(34:1), rot) und 741.5307 (grün). E) Optisches Bild desselben Gewebeschnitts nach Färbung mit Toluidinblau. Alle Ionen sind vom Typ  $[M+K]^+$  mit Ausnahme des Häm-Ions.

Schnitt (Abbildung 1 C) beobachtet. Der äußere Bereich der Harnblase wurde durch die Sphingomyelin-Komponente SM(34:1) charakterisiert ( $m/z$  741.5307, Abbildung 1 A, blau). Dieser Bereich konnte weiter differenziert werden in die Adventitia, die äußerste dünne Schicht, gekennzeichnet durch eine höhere Signalintensität von SM(34:1), und den Detrusormuskel, der vorwiegend aus glattem Muskelgewebe besteht.

Lumenwärts der Muskelschicht ist das Bindegewebe der Lamina propria lokalisiert, erkennbar an intensiven Signalen bei  $m/z$  743.5482 (Abbildung 1 A, rot; überlagert von SM(34:1), blau). In Richtung des Blasenlumens ist eine dünne Schicht von Subepithel-Myofibroblasten zu erkennen, wiederum über hohe Signale von SM(34:1) (Abbildung 1 A, blau). Das glatte Muskelgewebe des Detrusormuskels und die Myofibroblasten zeigten sehr ähnliche Phospholipid-Profile, in Übereinstimmung mit ihren ähnlichen physiologischen Eigenschaften. Die hohe Zelldichte der beiden Schichten ist auch in der gefärbten Abbildung zu erkennen (Abbildung 1 C). Die innerste Schicht der Mukosa besteht aus dem Blasenepithel (Urothel), erkennbar über ein Signal bei  $m/z$  798.5410 für die Phosphatidylcholin-Spezies PC(34:1) (Abbildung 1 A, grün).

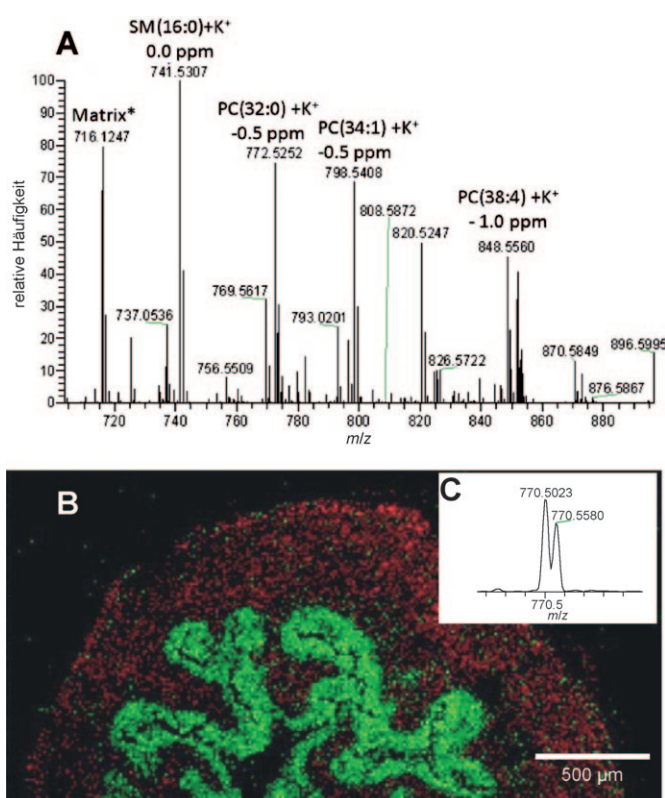
Bei genauerer Auswertung konnte das Urothel mithilfe der abbildenden AP-SMALDI-MS weiter differenziert werden. Zwischen der Basalmembran und dem Lumen besteht das Urothel aus Basalzellen, intermediären Zellen und Deckzellen. Letztere sind die größten Zellen und überdecken mehrere der darunterliegenden Zellen. Die verringerte Dichte von Zellkernen in dieser obersten Schicht des Urothels führt zu den beobachteten helleren Bereichen im gefärbten Bild. Im AP-SMALDI-Bild (Abbildung 1 B) sind diese Bereiche durch höhere Intensitäten bei  $m/z$  812.5566 für Phosphatidylethanolamin PE(38:1) gekennzeichnet. Die grüne Kodierung führt zusammen mit der in blau kodierten, colokalisierten Komponente PC(34:1) zu einer Cyankodierung. Blutgefäße wurden nachgewiesen anhand des Häm-Signals bei  $m/z$  616.1767 von Blutresten (Abbildung 1 B, rot). Auch diese Beobachtungen bestätigen die Auswertungen der histochemischen Toluidinblau-Färbung. Die verschiedenen Gewebetypen sind nach klassischer histochemischer Färbung von einem erfahrenen Pathologen identifizierbar. Mithilfe der bildgebenden MS sind darüber hinaus auch die Gewebereiche eindeutig unterscheidbar, die bei klassischer histologischer Untersuchung nur schwer erkennbar sind (Abbildung 1 A und B).

In einem weiteren Experiment wurde die räumliche Auflösung noch erhöht, um interessante Gewebereiche genauer untersuchen zu können. Abbildung 1 D zeigt ein AP-SMALDI-Bild eines Bereichs der Harnblase mit zwei verschiedenen, aneinander angrenzenden Gewebetypen, aufgenommen mit einer Schrittweite und einem Ablationsdurchmesser von 5  $\mu\text{m}$ . Die gemessenen Ionenverteilungen stimmen wiederum sehr gut mit den histologischen Informationen des gefärbten Gewebeschnitts überein (Abbildung 1 E). Das AP-SMALDI-Bild liefert eine pixelgenaue Trennung zwischen der Muskelschicht ( $m/z$  741.5307, grün) und dem Urothel ( $m/z$  798.5410, rot) ohne räumliche Signalunschärfe oder Signalüberlappung (gelbe Pixel). Dies zeigt, dass die

effektive analytische Auflösung tatsächlich im Bereich von 5  $\mu\text{m}$  liegt.

Eine hohe Massengenauigkeit ist ein außerordentlicher Vorteil für die unmittelbare Identifizierung von Gewebestandteilen. Das verwendete Massenspektrometer liefert eine Massengenauigkeit von 2 ppm nach externer Kalibrierung. Jedes Spektrum wurde zusätzlich einzeln kalibriert (mithilfe von „lock masses“), um so auf der Basis bekannter Signale eine Feinkalibrierung der Analytsignale zu erreichen.<sup>[14]</sup> Die damit erzielte Massengenauigkeit lag bei weniger als 1 ppm für alle identifizierten Verbindungen.

Ein Spektrum aus der bildgebenden Analyse der Harnblase ist in Abbildung 2 A zu sehen. Akkurate Massenwerte können genutzt werden, um Massensignale unmittelbar be-



**Abbildung 2.** A) Gemittelttes Orbitrap-Übersichtsspektrum nach Feinkalibrierung. B) Überlagerung der Ionenbilder für  $m/z$  770.5097 (rot) und 770.5580 (grün). C) Gemittelttes Orbitrap-Spektrum, das die beiden separierten Signale zeigt.

stimmten Substanzklassen zuzuordnen, z. B. Lipiden, Peptiden oder Matrixverbindungen.<sup>[15]</sup> In diesem Fall war die direkte Unterscheidung von Matrixsignalen und Analytsignalen auf der Basis einer Massendefektauswertung möglich. In Abbildung 2 A haben alle Phospholipidsignale  $m/z$ -Werte mit Nachkommawerten von etwa 0.5. Matrixsignale hingegen wurden bei 716.1246 und 852.1407 gemessen. Eine massenbasierte Klassifizierung ist besonders nützlich, wenn unbekannte Verbindungen in einem Massenbereich zu identifizieren sind, in dem Matrixsignale mit hohen Intensitäten auftreten. In komplexen Proben wie Gewebeschnitten kann eine hohe Massengenauigkeit insbesondere vorteilhaft ein-



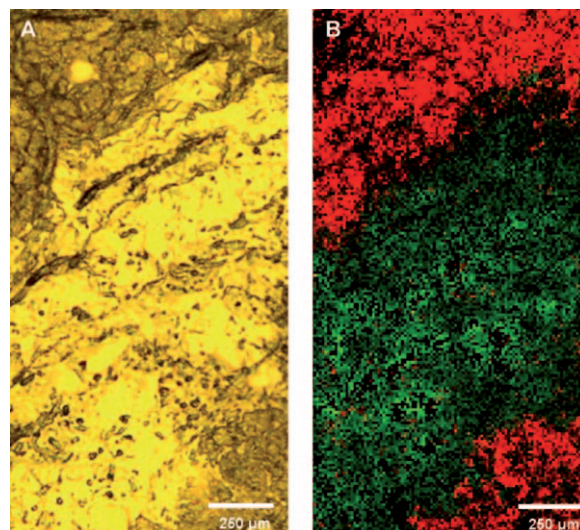
gesetzt werden, um individuelle Analyte unmittelbar aus einem einzigen Probenrasterpunkt zu identifizieren.

Die Substanzidentifizierung und -charakterisierung kann durch den Einsatz von MS/MS-Fragmentionenanalyse weiter verbessert werden (siehe die Hintergrundinformationen). Fragmentionen liefern Informationen über die jeweilige Kopfgruppe von Phospholipiden. Eine PC-Struktur wurde identifiziert über das Produktion  $m/z$  713.4518 nach dem Neutralverlust von  $N(CH_3)_3$  aus der Cholin-Kopfgruppe. Strukturisomere der Acylketten lassen sich allerdings auch durch Kombination von akkuraten Massen und MS/MS-Analyse nicht immer eindeutig unterscheiden.

Mithilfe von spezieller Bildgebungssoftware konnten die hohe Massengenauigkeit und Massenauflösung bei der Erstellung massenspektrometrischer Bilder erhalten bleiben. Alle Bilder wurden mit einer sehr geringen, stark diskriminierenden Massenfensterbreite  $\Delta m/z$  von 0.01 erzeugt. Dies war notwendig, um Substanzen zu unterscheiden, die signifikant für den strukturellen Kontrast sind, aber sehr ähnliche Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse aufweisen. In Abbildung 2B ist die räumliche Verteilung von zwei Komponenten dargestellt, die sich in der Masse lediglich um 0.05 unterscheiden. Das Signal bei  $m/z$  770.5097 (grün) gehört zum Kaliumaddukt von PC(32:1), das vorwiegend im Epithel der Harnblase vorliegt. Das benachbarte Signal bei  $m/z$  770.5698 (für das Isotopomer des Kaliumaddukts von SM(36:1)) zeigt eine komplementäre räumliche Verteilung mit hohen Intensitäten im Muskel- und Bindegewebe. Massenselektivitäten von MALDI-Verteilungsbildern waren bislang typischerweise auf eine Fensterbreite  $\Delta m/z$  von 1 (MALDI-TOF) bzw. 0.1 (MALDI-FTICR<sup>[5]</sup>) beschränkt. Zur bildlichen Unterscheidung von Komponenten mit sehr kleinen Massenunterschieden, wie sie bei biologischen Studien regelmäßig auftreten, sind solche Selektivitäten unzureichend.

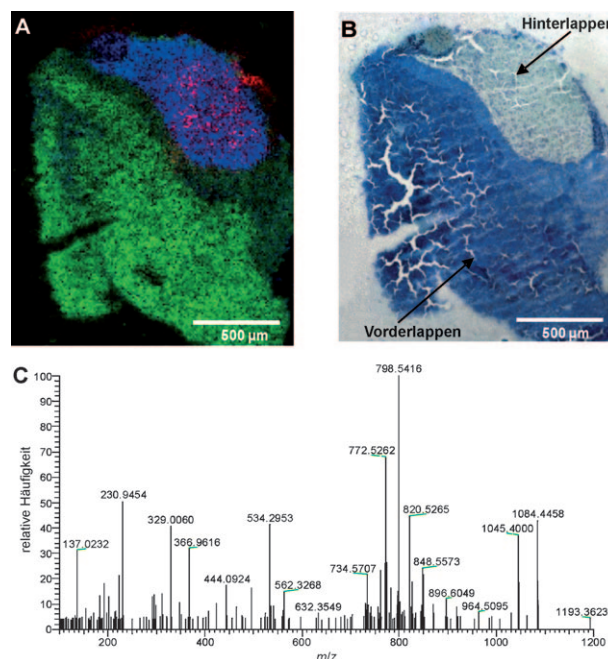
Als biomedizinische Anwendung unserer neuen Technik ist die Analyse von Humangewebe-Schnitten eines infiltrierenden duktalen Karzinoms dargestellt, der häufigsten und gefährlichsten Form des Brustkrebses.<sup>[16]</sup> Da die maligne Proliferation üblicherweise das benachbarte Fettgewebe infiltriert, ist die histologische, intraoperative Untersuchung gefrorener Gewebeproben wegen der unvorteilhaften Eigenschaften von Fettgewebe nicht zielführend. Während klassische histologische Verfahren zu mehrdeutigen Ergebnissen kommen, ergaben AP-SMALDI-Bilder des Tumors eine klare Unterscheidung von gesundem und Tumorgewebe. Es wurde gefunden, dass Proben des duktalen Karzinoms charakteristische Lipid-Bestandteile, z.B. verschiedene Ganglioside, enthalten.<sup>[17]</sup> Spezifische Lipidprofile ergeben die Möglichkeit der eindeutigen Identifizierung von Krebszellen mithilfe abbildender MALDI-MS. Abbildung 3 zeigt einen Gewebedünnschnitt eines infiltrierenden duktalen Karzinoms mit einer klaren Unterscheidung von malignem (rot) und gesundem Gewebe (grün), aufgenommen bei 10  $\mu m$  räumlicher Auflösung.

Eine weitere wichtige Anwendung der hochauflösenden bildgebenden MS ist der Nachweis von Neuropeptiden, die als Markierungsstoffe eine große Zahl von Krankheiten und physiologischen Prozessen anzeigen können.<sup>[18]</sup> Maus-Hypophyse wurde massenspektrometrisch mit einer räumlichen



**Abbildung 3.** Humanes duktales Mammakarzinom. A) Optisches Bild des Gewebeschnitts. Dunklere Bereiche zeigen Tumorgewebe an. B) 10  $\mu m$  Schrittweite, Überlagerung der Ionenbilder für  $m/z$  529.3998 (gesund, grün), 896.6006 (Tumor, rot, PC(34:1),  $[M+K+DHB-H_2O]^+$ ).

Auflösung von 10  $\mu m$  abgebildet (Abbildung 4A). Der Hinter- und Vorderlappen sind anhand der Phospholipid-Signale bei  $m/z$  826.5723 (PC(36:1), grün) und 848.5566 (PC(38:4), blau) klar zu unterscheiden. Auch hier ergibt sich eine perfekte Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Färbungsexperimenten (Abbildung 4B). Das Neuropeptid Vasopressin bei  $m/z$  1084.4451 (rot in Abbildung 4A) ist, entsprechend der bekannten biologischen Funktion, im zentra-



**Abbildung 4.** Neuropeptid in Maus-Hypophyse: A) 10  $\mu m$  Schrittweite, Überlagerung der Ionenbilder für Vasopressin ( $m/z$  1084.4451, rot,  $[M+H]^+$ ), PC(36:1) ( $m/z$  826.5723, grün,  $[M+K]^+$ ) und PC(38:4) ( $m/z$  848.5566, blau,  $[M+K]^+$ ). B) Optisches Bild nach Färbung mit Toluidinblau. C) Übersichtsspektrum eines einzelnen 10  $\mu m$ -Rasterpunkts.

len Teil des Hypophysen-Hinterlappens lokalisiert. Das Übersichtsmassenspektrum für einen einzelnen, 10 µm großen Rasterpunkt ist in Abbildung 4 C dargestellt.

Aus methodologischer Sicht sind zurzeit noch einige Probleme zu überwinden. Die bildgebende MALDI-MS erfordert das Aufbringen einer geeigneten Matrixschicht auf die Gewebeprobe und beinhaltet damit das Risiko von Artefaktbildung und eine kristallisationsabhängige Begrenzung der erreichbaren räumlichen Auflösung. Zudem ist der Massenbereich in der derzeitigen Instrumentierung noch auf  $m/z < 4000$  beschränkt, was einen direkten Proteinnachweis ausschließt. Akkurate Masse und MS/MS-Fähigkeit sind sehr hilfreich für die Identifizierung von abgebildeten Verbindungen, liefern jedoch nicht immer eine vollständige Strukturaufklärung (z. B. im Fall der Isomerenanalyse von Lipid-Fettsäuren). Unsere Ergebnisse zeigen dennoch, dass bildgebende AP-SMALDI-MS bei 5 µm räumlicher Auflösung biologisch relevante und hochspezifische Informationen liefert. Die Methode stellt eine deutliche Verbesserung für biologische Anwendungen dar, weil erstmals hohe räumliche Auflösung, Massengenauigkeit und Nachweisempfindlichkeit kombiniert werden konnten. In histologischen Untersuchungen bietet die Methode ein neues Maß an Qualität und Zuverlässigkeit. Durch Hinzufügen einer neuen Dimension molekular-diagnostischer Information kann sie klassische histologische Protokolle ergänzen und die Histopathologie unterstützen.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass mithilfe der bildgebenden MS wichtige Informationen aus ungezielten Untersuchungen gewonnen werden können, d. h. es müssen nicht bereits vor der Untersuchung spezifische Substanzen bekannt sein und ausgewählt werden, sondern diese können während der Bildanalyse als Markierungsstoffe entdeckt und identifiziert werden. Alarmierende pathologische Strukturen können somit selbst dann gefunden werden, wenn eine biochemische Markierung, z. B. für einen bestimmten Karzintyp, noch nicht zur Verfügung steht. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber histochemischen Färbetechniken dar. Ein weiterer Vorteil der AP-SMALDI-Histologie liegt darin, dass eine objektive Auswertung der Ergebnisse erreicht werden kann, sobald ein standardisiertes Messprotokoll erarbeitet ist, da strukturdefinierende Signalmuster automatisch identifiziert und quantifiziert werden können.

## Experimentelles

Alle Experimente wurden mit einer selbst entwickelten bildgebenden AP-SMALDI-Ionenquelle durchgeführt.<sup>[9]</sup> Der Laserstrahl wurde mithilfe eines zentral durchbohrten Objektivs auf einen Durchmesser von 5 µm fokussiert. Software und Hardware für den Rasterprozess wurden im Hause entwickelt.<sup>[9]</sup> Die Ionenquelle wurde an eine lineare Ionenfalle mit Fourier-Transform-Orbitalfallen-Massenspektrometer gekoppelt (LTQ Orbitrap Discovery, Thermo Scientific GmbH, Bremen, Deutschland; Massenaufklärungsvermögen: 30000 bei  $m/z$

400 im Positivionen-Modus). Dieser Aufbau ist kompatibel mit Atmosphärendruck und MS<sup>n</sup>-fähig und verfügt über eine Sub-ppm-Massengenauigkeit. Ein UV-Laser mit einer Wiederholrate von 60 Hz (LTB MNL-106, LTB, Berlin, Deutschland) wurde zur Desorption/Ionisation eingesetzt. Zykluszeiten des Ionenfallen/Orbitalfallen-Systems betragen 1.3 Sekunden (einschließlich Bewegung des Objekttrahers). Der Massenbereich des Massenspektrometers wurde auf  $m/z$  100–1000 (für die Messung von Phospholipiden) bzw. 100–1200 gesetzt (für die Messung von Neuropeptiden). Gewebeprobe wurden mithilfe eines pneumatischen Sprühsystems mit DHB-Matrix (DHB = 2,5-Dihydroxybenzoesäure) beschichtet. Zuordnungen von Lipidspezies wurden bestätigt durch MS/MS-Analyse (Isolationsfenster  $\Delta m/z$  3) unmittelbar vom untersuchten Gewebe. Alle Bilder wurden erzeugt mit einer Massenfensterbreite  $\Delta m/z$  von 0.01. Weitere Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 5. Oktober 2009,  
veränderte Fassung am 26. Januar 2010  
Online veröffentlicht am 15. April 2010

**Stichwörter:** Akkurate Masse · Bildgebungsverfahren · Histologie · Massenspektrometrie · Räumliche Auflösung

- [1] B. Spengler, M. Hubert, R. Kaufmann in *Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Chicago, Illinois, **1994**, S. 1041.
- [2] M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan, R. M. Caprioli, *Nat. Med.* **2001**, 7, 493.
- [3] F. Benabdellah, D. Touboul, A. Brunelle, O. Laprevote, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 5557.
- [4] M. Stoeckli, D. Staab, A. Schweitzer, *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, 260, 195.
- [5] I. M. Taban, A. F. M. Altelaar, Y. E. M. Van der Burgt, L. A. McDonnell, R. M. A. Heeren, J. Fuchser, G. Baykut, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, 18, 145.
- [6] R. R. Landgraf, M. C. P. Conaway, T. J. Garrett, P. W. Stacpoole, R. A. Yost, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8488.
- [7] L. A. McDonnell, R. M. A. Heeren, *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, 26, 606.
- [8] L. A. Klerk, A. F. M. Altelaar, M. Froesch, L. A. McDonnell, R. M. A. Heeren, *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 285, 19.
- [9] M. Koestler, D. Kirsch, A. Hester, A. Leisner, S. Guenther, B. Spengler, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22, 3275.
- [10] B. Spengler, M. Hubert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, 13, 735.
- [11] P. Chaurand, K. E. Schriver, R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 476.
- [12] S. G. Ostrowski, C. T. Van Bell, N. Winograd, A. G. Ewing, *Science* **2004**, 305, 71.
- [13] J. M. Wiseman, D. R. Ifa, Q. Song, R. G. Cooks, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7346; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7188.
- [14] B. Spengler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 703.
- [15] B. Spengler, A. Hester, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, 19, 1808.
- [16] *Interpretation of Breast Biopsies*, 4. Aufl., Raven Press, New York, **2002**.
- [17] G. Marquina, H. Waki, L. E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, S. Ando, *Cancer Res.* **1996**, 56, 5165.
- [18] L. J. Li, J. V. Sweedler, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 451.