



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Lab-on-a-tissue : optimization of on-tissue chemistry for improved mass spectrometry imaging

Heijs, B.P.A.M.

Citation

Heijs, B. P. A. M. (2018, February 1). *Lab-on-a-tissue : optimization of on-tissue chemistry for improved mass spectrometry imaging*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/60212>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/60212>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/60212> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Heijs, B.P.A.M.

Title: Lab-on-a-tissue : optimization of on-tissue chemistry for improved mass spectrometry imaging

Issue Date: 2018-02-01

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift staat een aantal verbeteringen en toepassingen van in-situ chemie beschreven. In-situ chemie wordt gebruikt als monster voorbereidingsmethode voor de biomoleculaire analyse met behulp van "matrix-assisted laser desorption/ionisation" (MALDI) "mass spectrometry imaging" (MSI). In de beschreven methoden worden enzymatische reacties direct toegepast op weefselcoupes om de moleculaire informatie, verkregen via de MALDI-MSI-analyse, te verrijken. Ook staat een geautomatiseerd histologie-gedreven MSI-platform beschreven dat gebruik maakt van moderne beeld bewerkingsalgoritmen. Dit nieuwe platform maakt het mogelijk MSI met hoge beeld- en massaresolutie toe te passen met behoud van werkbare data acquisitie tijden en data grootte. Tenslotte hebben we het belang van deze methoden aangetoond in een klinische studie naar de tumor progressie van myxoid liposaroom. Hieronder volgen een samenvatting en een discussie van de gepresenteerde resultaten, alsmede een uiteenzetting van de toekomstperspectieven van het in dit proefschrift beschreven werk.

Technologische ontwikkelingen

De verbetering en innovatie van *in-situ* chemie voor MALDI-MSI-analyse van eiwitten en post-translationele eiwitmodificaties

In 2006 werd de *in-situ* enzymatische digestie met trypsine door Shimma *et al.* (Shimma *et al.*, 2006) geïntroduceerd. Na haar introductie is de techniek snel populair geworden onder de gebruikers van MSI. De *in-situ* enzymatische digestie maakt het mogelijk om een groter deel van het proteoom te analyseren met MSI, helpt bij de identificatie van eiwitten/peptiden, en maakt de eiwitanalyse van formaline gefixeerd en daarna in paraffine ingebed (FFPE) weefsel mogelijk. Dit laatste zorgt ervoor dat er veel meer patiëntmateriaal beschikbaar komt voor klinische MSI-studies.

Het gebruik van proteolytische enzymen in oplossing, de herhaalbaarheid van de enzymatische digestie en de effecten van de enzymatische digestie op kwantitatieve, "bottom-up" eiwitanalyse is veelvuldig bestudeerd (Brownridge en Beynon, 2011). Tijdens een bijeenkomst van een werkgroep georganiseerd door het Europese MSI-netwerk COST Actie BM1104, gericht op de vergelijking van MSI resultaten verkregen na *in-situ* eiwit digestie, werd maar weinig overeenstemming gevonden in de behaalde resultaten verkregen met verschillende *in-situ* enzymatische digestie methoden ontwikkeld in verschillende laboratoria. Desondanks is er maar een klein aantal studies uitgevoerd naar de fundamentele en de herhaalbaarheid van de enzymatische digestie op weefselcoupes. Diehl *et al.*, beschrijven bijvoorbeeld het effect van verschillende experimentele parameters op de *in-situ* enzymatische digestie, waaronder de keuze van het proteolytisch enzym, de incubatietijd en de MALDI-matrix. Deze studie was met name gericht op het verbeteren van de beeldresolutie en de kwaliteit en reproduceerbaarheid van de door MSI geproduceerde visualisaties van moleculaire distributies (Diehl *et al.*, 2015). In twee recentere studies door Erich *et al.* en De Sio *et al.* werden reeds gepubliceerde *in-situ* enzymatische digestie methoden vergeleken en

de herhaalbaarheid van deze methoden getest (Erich et al., 2016; Sio et al., 2015). Erich *et al.* omschreven ook een geautomatiseerd en gebruikersonafhankelijk algoritme om een objectievere beoordeling van de herhaalbaarheid van een MALDI-MSI-experiment te geven (Erich et al., 2016). In **Hoofdstuk 2** hebben wij de dynamiek van de *in-situ* enzymatische digestie in zowel plaats als tijd onderzocht. Deze studie was gebaseerd op de MSI-analyse van drie groepen monsters na enzymatische digestie met variërende trypsine incubatietijden (1.5 uur, 3 uur, en 18 uur). Deze analyses leidden tot de bevinding dat langere incubatietijden resulteerden in een betere herhaalbaarheid van de *in-situ* enzymatische digestie. Ook werd geconcludeerd dat het gevarieerde chemische "landschap" van verschillende morfologische gebieden in het muis brein, de witte en grijze stof bijvoorbeeld, effect had op de digestie efficiëntie. Deze artefacten van de monster voorbereiding verdwenen wanneer langere incubatietijden werden gebruikt. Hiermee werd de hypothese bevestigd dat langere incubatietijden de herhaalbaarheid van de *in-situ* enzymatische digestie bevorderen. Deze verbeterde herhaalbaarheid komt voort uit een completere eiwitdigestie in alle morfologische gebieden.

Tijdens de studie naar de dynamiek van de *in-situ* enzymatische digestie werd gekeken naar de globale verschillen in de massaspectra na het toepassen van de drie incubatietijden. Deze verschillen werden bepaald door het vergelijken van het totaal aantal pieken in de gemiddelde spectra. Ook werd de digestiedynamiek bestudeerd door het volgen van de digestie van het eiwit Myelin Basic Protein (MBP, MBP_MOUSE) gedurende de volledige lengte van de incubatietijd door het hele weefsel. Om ionisatie effecten te reduceren en de verschillende datasets (n = 27, negen replicaties per incubatietijd) meer vergelijkbaar te maken werden drie proteolytische fragmenten van MBP geselecteerd en gesynthetiseerd als isotoop-gelabelde referentie standaard (ILRS) peptiden. Deze ILRS-peptiden werden vervolgens homogeen op de weefsels aangebracht als interne standaard. Onder de gekozen MBP-fragmenten waren twee zogenaamde 'limiet peptiden' (eindproducten van de proteolytische digestie), en één 'intermediair peptide' (partieel geknipt digestie product). De fragmenten waren zodanig gekozen dat de volledige digestie van het intermediair peptide resulteerde in een van de geselecteerde limiet peptiden. Op deze manier kon de digestie efficiëntie bepaald worden door middel van de verschillen in relatieve intensiteit tussen de limiet en intermediair peptiden. De berekende digestie efficiëntie is mogelijk anders voor andere eiwitten, en ook het gebruik van andere weefseltypen kan de digestie dynamiek beïnvloeden. De hier gepresenteerde resultaten volgden uit de analyse van diepgevroren weefsel. Het gebruik van FFPE-weefsel kan de dynamiek van de *in-situ* digestie mogelijk veranderen. Deze studie geeft een nuttig inzicht in de dynamiek van de *in-situ* enzymatische digestie, maar om een volledig beeld te krijgen van alle factoren die de dynamiek van eiwitdigestie op een weefselcoupe beïnvloeden zal een grootschalige studie met meer verschillende weefseltypen en meer eiwitten moeten worden uitgevoerd. Desalniettemin kan de methodiek die in **Hoofdstuk 2** beschreven

wordt, namelijk het verkrijgen van kwantitatieve data over de enzymatische digestiesnelheid (voor één knip locatie) in verschillende morfologische gebieden in het weefsel, voor de gehele studie naar andere weefsels en eiwitten toegepast worden.

De grote hoeveelheid onderzoek die de afgelopen twee decennia in het *proteomics*-veld is gedaan heeft geresulteerd in een onuitputtelijke bron van informatie die kan worden gebruikt voor het aanpassen, verbeteren en ontwikkelen van MALDI-MSI-methoden. Zoals eerder beschreven heeft de aanpassing van de *bottom-up proteomics* aanpak geleid tot de introductie van de *in-situ* enzymatische digestie als monsteropwerking voor MALDI-MSI-analyse. Net zoals in eiwitstudies op basis van digestie in vloeistof wordt de *in-situ* digestie voornamelijk met trypsine uitgevoerd. De reden hiervoor is de restrictiespecificiteit van het enzym: trypsine knipt eiwitten aan de C-terminale zijde van de basische aminozuren arginine en lysine. Hierdoor produceert trypsine proteolytische fragmenten met een intrinsiek positief geladen C-terminus. Dit zorgt voor een hogere detectiegevoeligheid in de massaspectrometrie analyse in positieve ion modus (Brownridge en Beynon, 2011; Vandermarliere et al., 2013). Onderzoek in het *proteomics*-veld heeft ook uitgewezen dat het gebruik van meerdere proteolytische enzymen (zelfs met gedeelde specificiteit voor dezelfde aminozuren) kan leiden tot een diepere analyse van het proteoom (Choudhary et al., 2003; Hohmann et al., 2009). In **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 5** worden twee verschillende methodieken beschreven waarbij meerdere enzymen *in-situ* worden gebruikt; **Hoofdstuk 3** beschrijft de combinatie van verschillende proteolytische enzymen met een specificiteit voor arginine en lysine en hoe het gebruik van deze enzymen zowel de totale hoeveelheid geanalyseerde eiwitten alsmede de eiwit-aminozuursequentiedekking beïnvloedt; **Hoofdstuk 5** beschrijft een multimodale MSI methode waarin twee opvolgende *in-situ* enzymatische digesties worden uitgevoerd. De eerste digestie wordt gedaan met de glycosidase PNGase F en de tweede digestie met de protease trypsine. Deze sequentiële digestie maakt het mogelijk om achtereenvolgens *N*-glycanen en proteolytische peptiden te analyseren vanaf hetzelfde weefsel. De methode beschreven in **Hoofdstuk 3** is afhankelijk van de analyse van meerdere weefselcoupes, terwijl voor de methode beschreven in **Hoofdstuk 5** maar een enkele weefselcoupe nodig is voor de analyse van de twee datasets. Het voordeel van het de methode beschreven in **Hoofdstuk 5** is dat de moleculaire informatie die verkregen wordt in beide datasets zijn origine vindt in exact dezelfde morfologische gebieden van het weefsel. Hierdoor beschrijven de twee datasets de moleculaire informatie van dezelfde histopathologische karakteristieken van deze weefsels. Hierbij moet wel vermeld worden dat de MALDI-MS-analyse van *N*-glycanen verbeterd kan worden door middel van een bindings-specifieke derivatisering van de siaalzuren. Deze procedure stabiliseert de normaliter labiele siaalzuren, zorgt ervoor dat de isobare α 2,3- en α 2,6-gebonden siaalzuren van elkaar onderscheiden kunnen worden en reduceert de negatieve effecten die het negatief geladen siaalzuur heeft op de ionisatie van positieve ionen (Holst et al., 2016). De chemische dimethylamidatie-reactie, die voor de derivatisatie wordt uitgevoerd,

reageert met alle vrije carboxylgroepen (COOH) en heeft als bijkomend effect dat ook de C-termini van eiwitten en de zijgroepen van zure aminozuren worden gemodificeerd. De exacte modificaties van de eiwitten ten gevolge van de derivatisatie zijn niet in detail gekarakteriseerd en zullen ervoor zorgen dat de *in-situ* identificatie van de proteolytische fragmenten van hetzelfde FFPE-weefsel moeilijker wordt. Desalniettemin is in **Hoofdstuk 5** aangetoond dat de sequentiële *in-situ* digestie een bruikbare en waardevolle techniek is voor de analyse van *N*-glycanen.

Histologie-gedreven MALDI-MSI

Recente technologische ontwikkelingen, met name de ontwikkeling van een ultrasnel MALDI-TOF-MS-platform, en de verbeterde resolutie van MALDI-FTICR-MS-analyse, hebben ervoor gezorgd dat MSI met hoge beeld- en massaresolutie beschikbaar kwam. De toename in cellulaire en chemische specificiteit, als resultaat van de hoge beeld en massaresolutie, gaat ten koste van de data acquisitie tijd en data grootte. Vooral in het klinisch MSI-onderzoek levert dit uitdagingen op voor de MSI-infrastructuur en data managementsystemen door de grote weefselreeksen van patiëntmateriaal die gemeten worden. Om de data-acquisitietijd en -grootte binnen de perken te houden hebben we in **Hoofdstuk 4** een histologie-gedreven MSI (HG-MSI) platform ontwikkeld gebaseerd op een serie geautomatiseerde beeldregistratie algoritmen. Tijdens de beeldregistratie wordt een geannoteerd histologisch beeld van een weefselcoupe, opgenomen met een hoge beeldresolutie, ge-co-registreerd aan een ander beeld van een opeenvolgende coupe, opgenomen met een lagere beeldresolutie. Deze tweede weefselcoupe is opgewerkt voor MALDI-MSI-analyse. Na deze beeldregistratie worden de contouren van de annotaties gereproduceerd op het lage-resolutie beeld van de MSI-weefselcoupe. Dit geeft de mogelijkheid om exclusief de *a priori* geselecteerde regionen van interesse (ROIs) met MSI te analyseren en daarmee de data acquisitie tijd en grootte te verminderen. Het succes van het platform werd aangetoond door de analyse van een kleine weefselreeks met behulp van het HG-MSI-platform. Deze analyse resulteerde in een reductie van de data grootte en acquisitietijd van ongeveer 80% in vergelijking met de analyse van de volledige weefselcoupes. Met het gebruik van het HG-MSI-platform is de toepassing en het routinematig gebruik van MSI met hoge beeld- en massaresolutie in klinisch onderzoek een stap dichterbij gekomen.

De strategie toegepast in de HG-MSI-methode, waarbij de histopathologische specificatie van het weefsel is gedaan voorafgaand aan de MSI-analyse, is zeer geschikt voor toepassingen waar de *a priori* histologische specificatie mogelijk, betekenisvol, en/of nodig is. Een voorbeeld hiervan is de analyse van tumor progressie, gebaseerd op cellulaire differentiatie of andere specifieke morfologische karakteristieken. Een ander voorbeeld is de toepassing van MSI waar hoge beeldresolutie of hoge massaresolutie nodig is, maar onpraktisch is door een te groot aantal te analyseren pixels, of een langzame data acquisitie. **Hoofdstuk 4** beschrijft de toepassing van het HG-MSI-platform voor de analyse van proteolytische peptiden van FFPE-weefsels, gebruik makende van een Bruker Daltonics MALDI-FTICR-MS-

instrument dat met ultrahoge massa-resolutie meet. Om ervoor te zorgen dat het HG-MSI platform bruikbaar en waardevol zou zijn voor de hele MSI-gemeenschap is ervoor gezorgd dat het gebruikt kan worden met massaspectrometers van alle producenten, met alle MSI-modaliteiten (SIMS, DESI, LESA, etc.), en dat het gratis/vrij beschikbaar is op het internet.

De analyse van *tissue microarrays* (TMAs), zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**, is een andere oplossing voor het analyseren van grote reeksen patiëntweefsels. Een TMA is een verzameling van "punches" (diameter 0.5 – 2 mm), genomen uit specifieke gebieden van weefselblokken na histopathologische analyse van de weefsels. De voordelen van de analyse van een TMA zijn dat je de weefsels van een groot aantal patiënten in een kort tijdsbestek kunt vergelijken en dat de experimentele variantie aanzienlijk wordt verminderd, omdat de weefsels afkomstig van verschillende patiënten op hetzelfde moment dezelfde monsteropwerking ondergaan en samen worden geanalyseerd.

Klinische applicatie

De moleculaire achtergrond van tumor progressie in myxoid liposaroom

De methoden beschreven in dit proefschrift, met name deze in **Hoofdstukken 4 en 5**, werden ontwikkeld voor toepassing in klinisch onderzoek. **Hoofdstuk 6** beschrijft de toepassing van de multimodale MSI-methode omschreven in **Hoofdstuk 5** in een studie waarin de moleculaire achtergrond van tumor progressie in myxoid liposaroom (MLS) werd onderzocht. In deze studie werd aangetoond dat er een associatie bestaat tussen de progressie van MLS en een hogere aanwezigheid van het type mannose-rijke glycanen en het type complexe glycanen met een verhoogd aantal antennes. Deze moleculaire veranderingen werden niet eerder beschreven voor MLS of andere mesenchymale tumoren, maar wel voor colorectaal-, borst-, en eierstoktumoren. Mannose-rijke glycanen worden zowel intra- als extracellulair aangetroffen. De MALDI-MSI-analyse in **Hoofdstuk 6** werd echter uitgevoerd met een beeldresolutie die het niet mogelijk maakt om het verschil te kunnen zien tussen intra- en extracellulaire moleculen. Om de gevonden resultaten te valideren en verdere informatie te verzamelen over de precieze locatie van de glycanen in het cellulaire milieu zullen experimenten met complementaire technieken, zoals immunohistochemie, moeten worden uitgevoerd. Verdere inzichten in de moleculaire achtergrond van MLS-tumorprogressie zouden ook gehaald kunnen worden uit extra MSI-analyses van lipiden en eiwitten. Ook een diepgaande analyse van het proteoom zou van toegevoegde waarde kunnen zijn en inzicht kunnen geven over de moleculaire veranderingen die ten grondslag liggen aan de progressie van MLS.

Toekomstperspectief

In dit proefschrift wordt de optimalisatie en toepassing van *in-situ* enzymatische digestie in combinatie met MALDI-MSI beschreven om de toepassing hiervan in klinisch onderzoek te bevorderen. Sinds de introductie van MSI is het koppelen van een moleculaire identiteit aan een gedetecteerde m/z waarde een van de grootste uitdagingen. Voor klinische studies en studies waarin men tracht biomarkers te vinden is de identiteit van de gedetecteerde moleculen van essentieel belang om de biologische achtergrond van de biomarker te doorgronden. Eén van de voordelen van het toepassen van de *in-situ* enzymatische eiwit digestie vóór de analyse met MALDI-MSI, is dat het de identificatie van de eiwitten achteraf bevordert. Het werk beschreven in dit proefschrift laat zien dat het aantal verschillende geïdentificeerde eiwitten, toegekend aan pieken in het MSI-massaspectrum, aanzienlijk toeneemt wanneer de MSI-analyse met hoge massa-resolutie wordt uitgevoerd. Hier moet echter wel bij vermeld worden dat slechts 10-15% van het totale aantal pieken in het MSI-massaspectrum geïdentificeerd kon worden. Ook bleven de pieken met de hoogste intensiteit vaak ongeïdentificeerd. Door de complexiteit van het probleem, heeft de oplossing die resulteert in een hoger aantal peptide identificaties verschillende facetten.

In FFPE-weefsel wordt formaldehyde gebruikt om eiwitten aan elkaar te koppelen. Deze koppeling vindt plaats door de verbinding van de basische aminozuren lysine, arginine en histidine. Om het mogelijk te maken eiwitten in FFPE-weefsels te analyseren moeten deze verbindingen verbroken worden tijdens een antigeenherwinning. Het proces van de formaline fixatie is echter niet volledig reversibel, en de eiwitten blijven vaak achter met onregelmatige, en veelal niet gekarakteriseerde moleculaire modificaties. Deze modificaties resulteren in een groot aantal niet-geïnterpreteerde MS/MS-spectra na de LC-MS/MS-analyse, wat een groot aantal ongeïdentificeerde pieken in het MSI-massaspectrum ten gevolge heeft. Om het volledige potentieel van eiwit MSI van FFPE-weefsels te benutten zouden de formaline-geïnduceerde modificaties grondig gekarakteriseerd moeten worden. Eerdere pogingen, en het feit dat de meerderheid van het *bottom-up proteomics* veld ver weg blijft van FFPE-weefsels, geven aan dat dit een enorme uitdaging behelst. Een alternatief om de hoeveelheid identificaties te vergroten zou zijn om doelmatige LC-MS/MS-analyses te doen, gebaseerd op de pieklijsten verkregen uit de MSI-analyse.

Verder is het enzymatisch gedigesteerde proteoom een zeer complex geheel en resulteert, mede door het grote aantal isobare proteolytische peptiden, in een uitermate complex massaspectrum met veel overlappende isotoop patronen. De massaspectra worden nog complexer gemaakt door de aanwezigheid van zoutcomplexen. Weefsels hebben een zoutrijk milieu, en zoals beschreven in **Hoofdstuk 5** wordt een variëteit aan peptide-zoutcomplexen, zoals Na^+ , 2Na-H^+ , K^+ , 2K-H^+ waargenomen. Dit terwijl er vóór de eiwitanalyse een aantal spoel stappen in de monstervoorbewerking zijn opgenomen om zouten en lipiden uit het weefsel te

verwijderen. Na de MSI-analyse zou het identificeren en verwijderen van de zoutcomplex-pieken uit het massaspectrum een oplossing kunnen bieden om het massaspectrum minder complex te maken. Het zou echter beter zijn om de daadwerkelijke formatie van de zoutcomplexen te voorkomen. Dit zou bereikt kunnen worden door het toepassen van additionele weefsel spoel stappen, of door het toepassen van een meer zout resistente MALDI-matrix die de vorming van zoutadducten tegengaat. Wang *et al.* hebben recentelijk gepubliceerd over de matrix (*E*)-propyl *α*-cyano-4-hydroxycinnamylaat, gevormd door de reactie van de reguliere MALDI-matrix *α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid met een propyl-alcohol, welke een hoge zouttolerantie heeft voor de analyse van intacte eiwitten (Wang et al., 2015b). Nadat we deze MALDI-matrix gesynthetiseerd hadden en hier proteolytische peptiden mee hebben geanalyseerd, toonden de preliminaire resultaten een verhoogd aantal zoutcomplexen.

De toegekende peptide identiteiten, beschreven in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift werden allen gedaan op basis van de accurate massa van de moleculen. Hoewel de beschreven methode waardevolle informatie geeft over de potentiële identiteit van de gedetecteerde moleculen, heeft *in-situ* fragmentatie en directe tandem MS-analyse vanaf het weefsel de voorkeur. Deze aanpak is veelvuldig beschreven in de literatuur met gebruik van massaspectrometers met lage massa resolutie (zoals MALDI-TOF-MS-platformen), maar de beschikbaarheid van deze techniek voor instrumenten met hoge massa-resolutie is erg beperkt. Om de definitieve identificatie van peptiden te doen met behulp van MSI zullen massaspectrometers moeten worden uitgerust met verbeterde *quadrupole* technologie, zodat een specifiekere selectie van ionen kan plaatsvinden, wat uiteindelijk zal leiden tot een meer accurate peptide identificatie direct vanaf het weefsel.

Het additionele werk wat hierboven beschreven is zal ons inzicht in de moleculaire histologie van de weefsels waarmee we werken drastisch vergroten, wat uiteindelijk zal resulteren in meer specifieke en efficiënte methoden die nog beter geschikt zijn voor de MSI-analyse van FFPE-weefsel. Ondanks de huidige tekortkomingen van de techniek is de impact van MSI op klinisch onderzoek de laatste jaren enorm toegenomen. Verbeterde methoden en meer geavanceerde technologie zullen deze impact met zekerheid gaan vergroten wat de implementatie van MSI in klinisch onderzoek zal versterken en mogelijk de implementatie van MSI in de moleculaire diagnostiek zal bewerkstelligen.