

**Entwicklung einer Methode zur Diagnose
und Klassifizierung von Amyloidosen in
Formalin-fixiertem und Paraffin-
eingebettetem Gewebe mittels
bildgebender Massenspektrometrie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von
Martin Winter
Hamburg, 2019

Erster Gutachter: Prof. Dr. Andreas Tholey

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2019

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Christoph Röcken für die Erarbeitung des Themas sowie die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein anfertigen zu können, bedanken. Das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Zusammenarbeit haben stets zu einem kreativen und angenehmen Arbeitsumfeld beigetragen. Für die Betreuung seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät möchte ich Prof. Dr. Andreas Tholey danken.

Bei Dr. Alex Muck von Waters Corporation, möchte ich mich herzlich für seine unermüdliche Bereitschaft zur Klärung technischer Fragen und theoretischer Grundlagen zum Synapt G2-S sowie den wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Christoph Röcken und Prof. Dr. Andreas Tholey für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die fachliche Unterstützung und Hilfe bei vielen Laborarbeiten bedanken. Vielen Dank an Dr. Franziska Wilhelm, Dr. Jochen Haag, Dr. Hans-Michael Behrens, Dr. Christine Böger, Marten Rönckendorf, Denisa Hajzeri, Sarah Kersten, Hanna-Maria Köhler-Mindak, Dr. Dennis Linke, Dr. Liam Cassidy, Dr. Tomas Koudelka, Dr. Joanna Tucher, Prasath Somasundaram, Christian Treitz und Jana Schlenk. Besonderer Dank gilt Sandra Krüger für die vielen anregenden und weiterführenden Diskussionen. Dr. Prof. Christoph Röcken, Prof. Dr. Andreas Tholey, Dr. Alex Muck und Dr. Franziska Wilhelm danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Einen großen Dank möchte ich schließlich meiner Mutter Heidrun, meinem Bruder Christoph sowie meiner Freundin Isabel für die liebevolle Unterstützung und den emotionalen Beistand aussprechen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mithilfe der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Betreuer verfasst habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Röcken am Institut für Pathologie unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft und wurde keiner anderen Universität als der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Begutachtung vorgelegt.

Martin Winter

Hamburg, den 27. September 2018

Publikationsliste

Teile dieser Dissertation finden sich in folgenden Veröffentlichungen wieder:

Martin Winter, Andreas Tholey, Sandra Krüger, Hartmut Schmidt, Christoph Röcken: MALDI-mass spectrometry imaging identifies vitronectin as common constituent of amyloid deposits. *J Histochem Cytochem* 2015, 63:772-9.

Martin Winter, Andreas Tholey, Arnt Kristen, Christoph Röcken: MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Novel Tool for the Identification and Classification of Amyloidosis. *Proteomics* 2017 (online veröffentlicht) DOI: 10.1002/pmic.201700236.

Tagungsbeiträge

Posterbeiträge

MALDI-mass spectrometry imaging a new promising method to reveal the composition of amyloid deposits.

99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), Mai 2015, Frankfurt am Main, Deutschland

MALDI-mass spectrometry imaging reveals vitronectin as potential biomarker of amyloid deposits.

Conference of German Network on systemic AL Amyloidosis (GERAMY), November 2015, Heidelberg, Deutschland

Imaging Mass Spectrometry a novel tool for the identification and classification of amyloidosis.

1st Meeting on "Biophysics of Amyloid Formation", März 2017, Ulm, Deutschland

Vorträge

Imaging Mass Spectrometry a novel tool for the identification and classification of amyloidosis.

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), März 2017, Kiel, Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
a.E.	arbiträre Einheit
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ANI	Anilin
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> , Amyloid-Vorläuferprotein
CCS	<i>Collision Cross-Section</i> , Kollisionsquerschnittsfläche
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid</i> , α -Cyano-4-hydroxizimtsäure
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i> , Kollisions-induzierte Dissoziation
DC	<i>Direct Current Voltage</i> , Gleichspannung
DHB	<i>2,5-Dihydroxybenzoic Acid</i> , 2,5-Dihydroxybenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
FDR	<i>False Discovery Rate</i> , Falsch-positiv Rate
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> , Halbwertsbreite
GluFib	[Glu ¹]-Fibrinopeptid B
HIAR	<i>Heat-induced Antigen Retrieval</i> , Hitze-induzierte Antigendemaskierung
IAA	Iodacetamid
IMS	<i>Ion Mobility Separation</i> , Ionenmobilitätstrennung
LC	<i>Liquid Chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-gestützte Laserdesorption-Ionisierung
MGF	<i>Mascot Generic Format</i>
MS	Massenspektrometrie, massenspektrometrisch
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie, Fragmentierungsmassenspektrometrie

MS1	MS-Ebene
MS2	MS/MS-Ebene
MSI	<i>Mass Spectrometry Imaging</i> , bildgebende Massenspektrometrie
MSIP	<i>Mass Spectrometry Imaging Profiling</i>
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
oa-TOF	<i>orthogonal acceleration Time of Flight</i> , orthogonaler Beschleunigungs-Flugzeitanalysator
OcGlc	Octyl- α/β -glucosid
ppm	<i>parts per million</i>
RF	<i>Radio Frequency Voltage</i> , hochfrequente Wechselspannung
ROI	<i>Region of Interest</i> , gemessenes Areal
SA	<i>Sinapinic Acid</i> , Sinapinsäure
S/N	<i>Signal-to-Noise Ratio</i> , Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SRIG	<i>Stacked Ring Ion Guide</i>
SVM	<i>Support Vector Maschine</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>Total Ion Current</i> , Totalionenstrom
TWV	<i>Transfer Wave Velocity</i> , Transferwellengeschwindigkeit
v/v	<i>volume/volume</i> , Volumen/Volumen
WH	<i>Wave Height</i> , Wellenhöhe
WV	<i>Wave Velocity</i> , Wellengeschwindigkeit
w/w	<i>weight/weight</i> , Masse/Masse

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Amyloid und Amyloidosen.....	5
3.1.1	Pathogenese und Ätiologie.....	6
3.1.2	Diagnose und Klassifizierung.....	8
3.2	Bildgebende Massenspektrometrie.....	10
3.2.1	Instrumenteller Aufbau.....	14
3.2.2	Ionenmobilitätstrennung.....	16
4	Zielsetzung der Arbeit	19
5	Material und Methoden	20
5.1	Massenspektrometrie.....	20
5.1.1	Chemikalien.....	20
5.1.2	Biologisches Material.....	20
5.1.3	Präparation von FFPE Gewebeschnitten.....	21
5.1.4	Allgemeine instrumentelle Einstellungen und Kalibrierung.....	22
5.1.5	MALDI MS und MALDI-IMS MS Experimente.....	24
5.1.6	MALDI MSI und MALDI-IMS MSI Experimente.....	25
5.1.7	MALDI MS/MS und MALDI-IMS MS/MS Experimente.....	26
5.1.8	Identifizierung von Peptiden mittels MDIC-Filter.....	27
5.1.9	Statistische Analyse.....	28
5.2	Histologie und Immunhistochemie.....	29
5.2.1	Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen.....	29
5.2.2	Validierung von Vitronectin als Bestandteil von Amyloidablagerungen.....	29
6	Ergebnisse und Diskussion	31
6.1	Essentielle Vorversuche.....	31
6.1.1	Einstellung der Laserenergie.....	31
6.1.2	Massengenauigkeit und Erstellung eines Matrixfilters.....	34

6.1.3	Einstellung der Ionenmobilitätstrennung	37
6.1.4	Vergleich von MALDI MS und MALDI-IMS MS	44
6.2	Etablierung der Probenvorbereitung	47
6.2.1	Experimentelle und analytische Strategie	49
6.2.2	Entwicklung der Probenvorbereitungsmethoden A und B.....	51
6.3	Identifizierung von Vitronectin als allgemeine Komponente von Amyloiden mittels MALDI MSI.....	77
6.4	Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen mittels MALDI-IMS MSI in FFPE Gewebeschnitten	84
6.5	Bedeutung für die Diagnostik	95
7	Ausblick	99
8	Literaturverzeichnis	101
9	Anhang	119
9.1	Anhang Kapitel 6.2	119
9.2	Anhang Kapitel 6.3	125
9.3	Anhang Kapitel 6.4	128

1 Zusammenfassung

Amyloidosen beschreiben eine Gruppe von Krankheiten, die durch intra- und extrazelluläre Ablagerungen fibrillärer Polypeptidaggregate verursacht werden. In der klinischen Routine erfolgt die Diagnose an FFPE Gewebeschnitten über Kongorotfärbung und polarisationsmikroskopischer Untersuchung. Anschließend wird an Serienschnitten mittels immunhistochemischer Färbungen das verursachende Protein identifiziert. Diese Methode birgt jedoch einige Probleme bezüglich der Sensitivität und Spezifität. Aufgrund dessen werden zusätzliche analytische Verfahren zur Unterstützung der Klassifizierung von Amyloidosen benötigt. Des Weiteren beinhalten die Amyloidablagerungen diverse Komponenten aus der extrazellulären Matrix. Deren Einfluss auf die Ausbildung und den Aggregationsprozess der Amyloidfibrillen ist bislang weitestgehend unverstanden. Zur Aufklärung inwiefern die extrazelluläre Matrix zu Amyloidosen beiträgt, ist es wichtig detaillierte Kenntnisse über die Zusammensetzung von Amyloid zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit wurden amyloidhaltige FFPE Gewebeproben mittels MALDI MSI untersucht. Dafür wurde zunächst eine geeignete Probenvorbereitung etabliert, um sowohl eine gute Spektrenqualität als auch den Erhalt der Gewebestruktur in den Messungen zu gewährleisten.

In einem ersten Projekt wurde durch die Analyse vier verschiedener Amyloidfälle mit MALDI MSI Vitronectin als allgemeine Komponente von Amyloidablagerungen identifiziert. Die Ergebnisse wurden durch immunhistochemische Färbungen an 175 Amyloidfällen mit verschiedenen Amyloidtypen und unterschiedlichen Gewebearten validiert. Ferner wurde durch die Identifizierung weiterer allgemeiner Komponenten in den Ablagerungen gezeigt, dass mit MALDI MSI auch die Zusammensetzung von Amyloiden untersucht werden kann.

In einem zweiten Projekt wurden mittels MALDI-IMS MSI Peptide von amyloidogenen und Amyloid-assoziierten Proteinen in den Ablagerungen von 16 verschiedenen Amyloidfällen identifiziert. Durch die Anwendung einer neuen Peptid-Filtermethode wurde eine universelle Peptidsignatur für Amyloidosen gefunden. Das Ergebnis wurde durch die Untersuchung von 66 Amyloidfällen und 31 Kontrollproben validiert. Des Weiteren wurden Unterschiede in der Peptidzusammensetzung von AL λ - und ATTR-Amy-

loid herausgefunden und für die Erstellung eines Klassifizierungsmodells genutzt. Durch die Implementierung des Peptidfilters in die MALDI-IMS MSI Analyse, wurde ein innovatives Verfahren entwickelt, das sowohl die Identifizierung als auch die Klassifizierung von Amyloidosen mit einem geringeren Zeitaufwand und Probenverbrauch ermöglicht. Die Ergebnisse demonstrieren ebenfalls das Potential für die Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Amyloiden, wodurch sowohl die Etablierung neuer Klassifizierungsmodelle für andere Amyloidtypen als auch ein tieferer Einblick in den komplexen Prozess der Amyloidogenese ermöglicht wird.

2 Summary

Amyloidoses are diseases caused by intra- and extracellular accumulation of fibrillar polypeptide aggregates. In clinical routine the diagnosis is performed by Congo red staining of FFPE tissue sections in combination with polarization microscopy. Subsequently, immunohistochemical staining on serial sections is used to identify the causative protein, but harbors some difficulties regarding sensitivity and specificity. Therefore, additional analytical techniques are required to support the classification of amyloidoses. Furthermore, amyloid deposits commonly enclose several non-fibrillar components of the extracellular matrix. Their potential to regulate the formation and aggregation process of amyloid fibrils is still poorly understood. For a better understanding of the role of the extracellular matrix in amyloidoses it is essential to gain deeper insights into the amyloid's composition.

In the present work MALDI MSI was used to investigate amyloid-laden FFPE tissue samples. For that purpose a suitable sample preparation method was established first in order to obtain good spectra quality as well as preserving the tissue's morphology.

In a first project MALDI MSI analysis was applied on four different amyloid cases and revealed vitronectin as common component of amyloid deposits. These results were validated by immunohistochemical staining of 175 amyloid cases including diverse types of amyloid and several different tissues. Furthermore, peptides of other common components were identified within the deposits demonstrating the potential of MALDI MSI for the investigation of the amyloid's composition.

In a second project MALDI-IMS MSI was used to identify peptides of amyloidogenic and amyloid-associated proteins within the deposits of 16 different amyloid cases. Utilizing a novel peptide filter method a universal peptide signature was found for amyloidoses. The results were validated by investigating 66 amyloid cases and 31 control samples. Furthermore, differences in the peptide composition of AL λ - and ATTR amyloid were revealed and used to build a classification model. Integrating the peptide filter in MALDI-IMS MSI analysis an innovative workflow was developed facilitating the identification and classification of amyloidosis in a less time and sample consuming experimental setup. These findings also demonstrate the feasibility to investigate the

amyloid's protein composition, thus paving the way to establish classification models for other types of amyloidoses and to shed further light on the complex process of amyloidogenesis.

3 Einleitung

3.1 Amyloid und Amyloidosen

Der Begriff Amyloid wurde im Jahr 1854 zum ersten Mal vom Pathologen Rudolf Virchow in die Medizin eingeführt und bedeutet stärkeähnliche Substanz.^{1, 2} Die Bezeichnung beruht auf der Beobachtung, dass pathologische Ablagerungen im menschlichen Gehirn und Rückenmark mit Iod eine Blaufärbung ähnlich zur Iod-Stärke-Reaktion ergeben. Nach heutigen Kenntnissen handelt es sich bei Amyloid um intra- und extrazelluläre Ablagerungen von unlöslichen fibrillären Polypeptidaggregaten mit einem hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen.³ Die β -Stränge sind dabei orthogonal zur Fibrillen-Achse ausgerichtet, so dass sich in der Röntgenbeugungsanalyse isolierter Amyloidfibrillen ein charakteristisches Reflexionsmuster ergibt, welches auch als β -cross-Muster bezeichnet wird.⁴⁻⁶ In der Elektronenmikroskopie werden nichtverzweigte Fibrillen variabler Länge mit einem Durchmesser von ca. 10 nm beobachtet.^{7, 8} Des Weiteren können die Fibrillen aufgrund ihrer speziellen Ultrastruktur den Farbstoff Kongorot einlagern.⁹ In der Polarisationsmikroskopie ergibt sich dadurch eine charakteristische anomale Polarisationsfarbe, die in Abhängigkeit des Färbeprotokolls zwischen orange-gelb-rötlich und grünlich-türkis-bläulich variiert.¹⁰⁻¹² Anhand dieser Eigenschaften werden Amyloide eindeutig von anderen Ablagerungen im Gewebe unterschieden.¹³

Amyloid kann sich prinzipiell in jedem Organ und Gewebetyp ausbilden und ablagern. Die Ablagerungen führen zu Veränderungen der Gewebestruktur sowie Fehlfunktionen der betroffenen Organe und werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht, die als Amyloidosen bezeichnet werden.^{3, 14} Je nachdem, ob nur ein Organ oder mehrere Organe betroffen sind, wird zwischen lokalen und systemischen Amyloidosen unterschieden. Bis heute sind bereits 35 verschiedene Proteine bekannt, die im Menschen Amyloid ausbilden können.¹⁵ Nach den Empfehlungen des „International Nomenclature Committee on Amyloidosis“ und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erfolgt die Nomenklatur der Amyloide und Amyloidosen über einen Buchstabencode.^{13, 16} Dieser setzt sich zusammen aus einer Abkürzung des verursachenden Proteins und einem ohne Leerzeichen vorangestellten „A“ zur Kenn-

zeichnung, dass es sich um ein Amyloidpeptid/-protein handelt: z. B. ATTR. Das „TTR“ steht für das amyloidogene Protein Transthyretin, welches dementsprechend eine ATTR-Amyloidose auslösen kann. Weitere Beispiele können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Beispiele für Amyloidpeptide/-proteine und deren Vorläuferproteine.

Amyloidpeptid/-protein	Vorläuferprotein	systemisch (S)/lokal (L)
AA	Serum Amyloid A	S
AApoAI	Apolipoprotein AI	S
A β	Amyloid-Vorläuferprotein	L
A β 2M	β 2-Mikroglobulin	S
AFib	Fibrinogen	S
AIns	Insulin	L
AL	Immunglobulin Leichtkette	S, L
ALys	Lysozym	S
ATTR	Transthyretin	S

3.1.1 Pathogenese und Ätiologie

Die Pathogenese von Amyloidosen ist ein sehr komplexer Prozess, der von diversen Faktoren beeinflusst wird. Der genaue Verlauf ist bisher noch weitestgehend unverstanden, so dass dessen Aufklärung Gegenstand vieler aktueller Forschungen auf dem Gebiet der Physik, Chemie, Biologie und Medizin ist.¹⁷

Die Ausbildung fibrillärer Strukturen liegt in der Natur von Proteinen und Peptiden begründet, mehrere Konformationen bzw. Faltungszustände einnehmen zu können.¹⁸ Nach ihrer Synthese befindet sich die native oder biologisch funktionale Konformation in einem dynamischen Gleichgewicht mit einem partiell gefalteten Zustand. Aus diesem Zustand heraus können die Proteine und Peptide eine fehlgefaltete oder pathologische Konformation einnehmen, die zur Aggregation neigt.^{9, 19} Bei Amyloidosen kann die Fehlfaltung durch verschiedene Umstände hervorgerufen werden. Einige amyloidogene Proteine besitzen eine gewisse intrinsische Tendenz, von der nativen in die patholo-

gische Konformation überzugehen. Dies kann entweder altersbedingt (z.B. Transthyretin)²⁰ oder durch eine permanent erhöhte Konzentration des Proteins im Serum (z.B. β 2-Mikroglobulin)²¹ ausgelöst werden. Bei anderen Proteinen wird der fehlgefaltete Zustand durch hereditäre²²⁻²⁴ oder erworbene²⁵ Mutationen begünstigt. Schließlich können Fehlfaltungen auch durch proteolytische Spaltungen des Proteins hervorgerufen werden, wie im Fall des Amyloid-Vorläuferproteins (APP = *Amyloid Precursor Protein*) in der Alzheimer-Erkrankung.²⁶

Erreicht die pathologische Konformation eine gewisse kritische lokale Konzentration, kommt es zur Ausbildung der Amyloidfibrillen.⁹ *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass die Fibrillogenese ähnlich einer Kristallisation nach einem Nukleations- und Wachstumsmechanismus verläuft.^{17, 27, 28} In der Nukleationsphase bilden sich zunächst langsam erste Aggregate in Form von Oligomeren und Protofibrillen aus. Letztere verfügen bereits über einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen und werden als Nukleus angenommen.¹⁴ In der folgenden Wachstumsphase aggregieren weitere Monomere und Oligomere mit dem Nukleus rasch zu Protofilamenten, die sich schließlich zu einer stabilen Amyloidfibrille zusammenlagern.^{9, 14} Für den Aggregationsprozess lässt sich daher ein typischer sigmoidaler Reaktionsverlauf über die Zeit beobachten. Ferner wurde gezeigt, dass die Nukleationsphase durch Zugabe ausgebildeter Amyloidfibrillen zur Reaktionslösung erheblich verkürzt werden kann.²⁹⁻³¹ Im Tiermodell zur Untersuchung der Transmissivität von Amyloidosen wurde zudem demonstriert, dass eine intravenöse oder orale Gabe von Amyloidfibrillen^{7, 8} sowie amyloidhaltiger Monozyten³² und amyloidhaltiger Gänseleberpastete³³ zu einer rasanten Ausbildung von Amyloid führt. Die Amyloidfibrillen wirken demnach selbst als Nidus und tragen ebenfalls zum exponentiellen Verlauf der Wachstumsphase bei. Des Weiteren kann durch Veränderungen der experimentellen Bedingungen, wie pH-Wert und Temperatur, oder durch Austausch einzelner Aminosäuren der untersuchten Polypeptide die Nukleationsphase beeinflusst werden.^{34, 35}

In vitro können theoretisch alle Proteine und Peptide fibrilläre Strukturen ausbilden. Doch müssen dafür häufig extreme chemische oder physikalische Bedingungen vorherrschen, die nicht den physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus entsprechen.^{36, 37} *In vivo* scheinen daher weitere Faktoren einen Einfluss auf die

Ausbildung von Amyloid zu haben. Neben dem amyloidogenen Protein beinhalten die Amyloidablagerungen auch diverse andere Komponenten, wie Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Kollagen, Serum Amyloid P-Komponente, Apolipoprotein E und Proteasen.³⁷⁻⁴⁰ Für das β 2-Mikroglobulin und die Leichtketten des Immunglobulins konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Kollagen und Heparansulfaten die Fibrillogenese beschleunigt.⁴¹⁻⁴⁴ Für die anderen Komponenten wird daher ebenfalls eine Beteiligung an der Ausbildung von Amyloidfibrillen angenommen. Dies indiziert, dass die Prozesse *in vivo* wesentlich komplexer sind als *in vitro* und letztendlich das Zusammenwirken aller Effekte den Übergang von der nativen in die fibrilläre Struktur bestimmt. Zur Aufklärung der Amyloidogenese, ist es demnach entscheidend herauszufinden, ob und inwiefern die verschiedenen Komponenten einen Einfluss haben. Die genaue Kenntnis der Zusammensetzung von Amyloidablagerungen ist dabei grundlegend, um Rückschlüsse auf mögliche molekulare Wechselwirkungen ziehen zu können und letztendlich ein detaillierteres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen.

3.1.2 Diagnose und Klassifizierung

Einige Amyloidosen können bereits erfolgreich therapiert werden. Der Fokus liegt dabei häufig auf der Reduzierung der Produktion des verursachenden Proteins. Bei systemischen Amyloidosen ist die Behandlung nicht selten mit einer Chemotherapie oder Transplantation des betroffenen Organs verbunden.⁴⁵⁻⁴⁷ Die Prognose des Patienten und die therapeutische Strategie hängen sowohl vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose als auch vom Amyloidtyp ab.³ Eine frühzeitige Erkennung sowie akkurate Klassifizierung der vorliegenden Amyloidose sind daher essentiell für den Erfolg der Therapie.

Die klinischen Symptome von Amyloidosen sind jedoch sehr variable und meist unspezifisch.⁴⁸ Beim Auftreten bestimmter Amyloid-assoziiertes Symptome kann daher lediglich ein Verdacht auf das Vorliegen einer Amyloidose geäußert werden.³ Für eine eindeutige Diagnose müssen dem Patienten Gewebeproben der betroffenen Organe

entnommen und anschließend histochemisch untersucht werden. Zur Herstellung der Schnittpräparate wird in der klinischen Routine Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe verwendet.³⁷ Aufgrund der hohen Spezifität, gilt die Kongorotfärbung als Goldstandard für den Nachweis von Amyloid. Die Ablagerungen werden dabei polarisationsmikroskopisch anhand der charakteristischen anomalen Polarisationsfarbe identifiziert. Diese ist jedoch nur im Dunkelfeld zu sehen, welches durch eine orthogonale Ausrichtung des Polarisators (Polarisationsfilter zwischen Lichtquelle und Präparat) zum Analysator (Polarisationsfilter zwischen Präparat und Beobachter) erzeugt wird. Die Intensität der anomalen Polarisationsfarbe ist relativ gering, daher können kleine diskrete Ablagerungen leicht übersehen werden. Um diese besser sichtbar zu machen, kann entweder die Schnittdicke von 2-5 µm auf 6-10 µm erhöht oder die Kongorotfärbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.^{3, 49, 50} Bei letzterer ergibt sich unter Verwendung eines FITC-Filters (Fluorescein-Isothiocyanat) für die positiv gefärbten Areale eine intensive gelb-orange Färbung, die sich deutlich von einem dunkelgrünen Hintergrund abhebt. Die Fluoreszenz ist jedoch nicht spezifisch für Amyloid, so dass der Nachweis der charakteristischen Polarisationsfarbe für die Diagnose unabdingbar ist.⁵⁰

Nach positivem Befund erfolgt die Klassifizierung der Amyloidose durch die Identifizierung des verursachenden Proteins. In der klinischen Routine werden dafür mehrere FFPE Serienschnitte auf die am häufigsten vorkommenden Amyloidtypen mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht.⁵¹ Die Klassifizierung kann sich jedoch in einigen Fällen als problematisch erweisen. Kontaminationen der Amyloidablagerungen durch andere aus dem Serum stammende amyloidogene Proteine können zu einer intensiven Hintergrundfärbung führen und eine eindeutige Identifizierung des verursachenden Proteins erschweren. Des Weiteren kann es aufgrund der im pathologischen Faltungszustand veränderten dreidimensionalen Struktur und der durch die Formalinfixierung entstandenen Proteinquervernetzung zu sterischen Hinderungen kommen. Die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Epitop wird dadurch beeinträchtigt und führt zu einer schwach ausgeprägten bis gar keiner Immunfärbung. Dieser Effekt kann ebenso durch eine partielle oder vollständige proteolytische Spaltung der

Epitopsequenz hervorgerufen werden. Ferner existieren nicht für alle Amyloidtypen spezifische Antikörper.^{37, 48, 52-57}

Alternativ zur IHC können die Amyloidproteine durch Mikroextraktionsverfahren aus dem Gewebe extrahiert und anschließend mittels Immunodiffusion⁵⁸, Western Blot⁵⁸ oder Aminosäuresequenzierung^{59, 60} identifiziert werden. Des Weiteren werden zunehmend massenspektrometrische Verfahren in Kombination mit 2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE)⁶¹⁻⁶³ oder Laser-Mikrodissektion (LMD)⁶⁴⁻⁶⁸ verwendet, welche sich durch eine besonders hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnen. Im Gegensatz zur IHC geht jedoch, wie auch bei den anderen genannten Verfahren, durch die Homogenisierung der Proben die räumliche Information verloren. Zudem sind diese häufig mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Aus diesen Gründen ist die IHC trotz ihrer eingeschränkten Sensitivität und Spezifität am weitesten in der Amyloiddiagnostik verbreitet. Eine neue vielversprechende Methode ist die bildgebende Massenspektrometrie (MSI = *Mass Spectrometry Imaging*), mit der Gewebeschnitte unter Erhalt ihrer Architektur massenspektrometrisch untersucht werden können.

3.2 Bildgebende Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie (MS) werden die Analyten basierend auf den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) ihrer korrespondierenden Ionen getrennt nachgewiesen. Zudem können durch Fragmentierungsexperimente (MS/MS oder Tandem-MS) Informationen über die molekulare Struktur erhalten werden, um die Analyten, z.B. Peptide und Proteine, zu charakterisieren und zu identifizieren. Mit der Entwicklung sanfter Ionisationsmethoden, wie der Matrix-gestützten Laserdesorption-Ionisation (MALDI = *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*)^{69, 70} und Elektronenspray-Ionisation (ESI = *Electrospray Ionization*)⁷¹, wurde in den 1980er Jahren erstmals die Analyse großer intakter Biomoleküle ermöglicht. Seither wurde die Technologie stetig verbessert und hat sich zu einer universell einsetzbaren analytischen Methode für die Untersuchung komplexer biologischer Proben etabliert. Ein wesentlicher Vorteil massenspektrometrischer Verfahren, insbesondere in Kombination mit der Flüssigkeitschromatographie (LC = *Liquid Chromatography*), besteht darin, dass mehrere hundert Verbindungen

simultan detektiert werden können, ungeachtet dessen, ob diese im vorliegenden analytischen Kontext bekannt oder unbekannt sind. Sie eignen sich daher für die Untersuchung molekularer Zusammensetzungen sowie der Entdeckung neuer Biomarker und nehmen heute eine zentrale Rolle in der Proteomik, Lipidomik und Metabolomik ein.

Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung der Massenspektrometrie ist die bildgebende Massenspektrometrie (MSI = *Mass Spectrometry Imaging*). Diese Technik ermöglicht zusätzlich die räumliche Verteilung der Analyten innerhalb einer Probe darzustellen. MSI fand bereits 1960 erstmals Anwendung in der Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS = *Secondary Ion Mass Spectrometry*), doch dauerte es rund 40 Jahre, bis diese Methode durch die Implementierung von MALDI auf die Analyse von Gewebeproben übertragen wurde.^{72, 73} Dadurch können wertvolle Erkenntnisse über die Funktionen und Eigenschaften der Analyten in biologischen Prozessen erhalten werden, die in klassischen MS Messungen aufgrund der Homogenisierung des Probenmaterials verloren gehen.

In Abbildung 1 ist der allgemeine Ablauf einer MALDI MSI Messung schematisch dargestellt. Ein entsprechend präparierter Gewebeschnitt, der sich entweder auf einer Metallplatte oder einem Glasobjektträger befindet, wird zunächst mit einer Matrixlösung beschichtet. Während der Auftragung werden die Analyten aus dem Gewebe extrahiert. Durch Evaporation des Lösungsmittels kristallisiert die Matrix unter Einschluss der Analyten aus. Bei der Matrix handelt es sich in der Regel um eine organische Verbindung mit einem Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich des verwendeten Lasers. Die Probe wird anschließend an einer bestimmten Position mit dem Laser bestrahlt, was zur Desorption und Ionisation der Analyten führt. Die erzeugten Ionen werden dann in einen Massenanalysator transferiert und getrennt, wodurch ein Spektrum der detektierten m/z -Werte mit deren Intensitäten erhalten wird. Auf die gleiche Weise werden weitere Positionen auf dem Gewebe analysiert, wobei die Probe in definierten Abständen in x- und y-Richtung bewegt wird. In einer Messung entstehen so hunderte bis tausende Spektren, die über spezielle Softwarealgorithmen in zweidimensionale Bilder konvertiert werden, in denen jede der analysierten Positionen durch einen Bildpunkt wiedergegeben wird. Aus den Bildern kann anschließend ent-

nommen werden, wo und mit welcher Intensität die einzelnen Analyten im Gewebeschnitt nachgewiesen wurden.

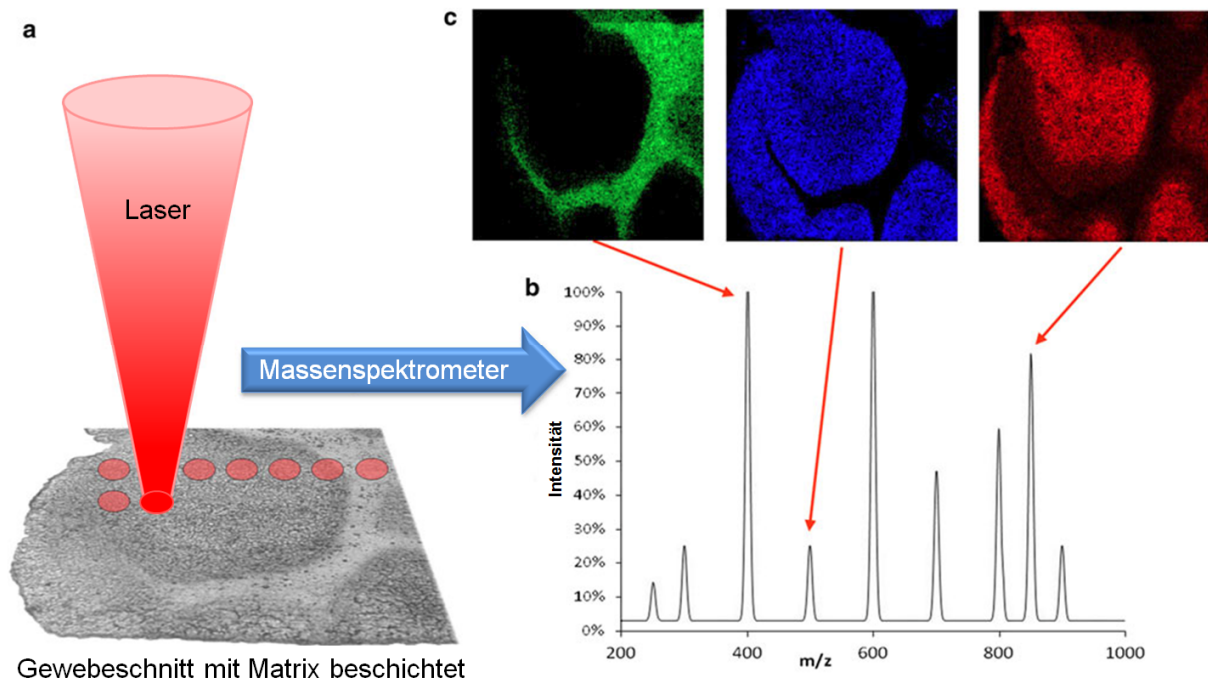


Abbildung 1: Schematischer Ablauf eines MALDI MSI Experimentes. a) Ein mit Matrix beschichteter Gewebeschnitt wird mit einem Laser bestrahlt. b) Für jede Position wird ein Massenspektrum erhalten. c) Die unterschiedlichen m/z -Werte werden schließlich als zweidimensionale Bilder ausgegeben. Die Abbildung wurde von Römpp et al.⁷⁴ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

Bei Messungen auf einem Glasobjektträger können durch einen Vergleich der Bilder mit histologischen Färbungen die Verteilung der Analyten mit charakteristischen Gewebestrukturen oder pathologischen Erscheinungen in Korrelation gebracht werden. Die Gewebeschnitte werden dafür entweder vor der Messung mit MSI kompatiblen Farbstoffen, wie Methylenblau oder Kresylviolett⁷⁵, gefärbt oder im Anschluss an die Messung nach Entfernung der Matrixschicht einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung⁷⁶ unterzogen. Aufgrund dessen, dass in einem Experiment Bilder für mehrere verschiedene Analyten simultan erstellt werden, können darüber hinaus direkt Informationen über die molekulare Zusammensetzung erhalten werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der Immunhistochemie, mit der nur Einzelnachweise durchgeführt werden können und die zudem auf spezielle Antikörper angewiesen ist.

Mittlerweile hat sich MALDI MSI zu einer sehr leistungsfähigen Methode für die Analyse diverser Verbindungsklassen, wie Proteine⁷⁷, Peptide⁷⁸, Lipide⁷⁹ und Metabolite⁸⁰, entwickelt. Der Großteil der Anwendungen konzentriert sich hierbei auf die Untersuchung von Krankheitsbildern, wie Krebs und neurodegenerative Erkrankungen, welche mit einer lokalen Veränderung in der Peptid- oder Proteinzusammensetzung des Gewebes einhergehen. In den Arbeiten von Schwamborn *et al.*⁸¹ konnten beispielsweise neue Biomarker identifiziert werden, die eine Unterscheidung von Prostatakrebs und normalem Gewebe mit hoher Sensitivität und Spezifität erlauben. Balluff *et al.*⁸² haben für Magenkarzinome eine Proteinsignatur nachweisen können, die mit der Überlebensrate der Patienten korreliert und somit für die Erstellung einer Prognose verwendet werden kann. In einer Studie von Elsner *et al.*⁸³ wurde mittels MALDI MSI aufgezeigt, dass bestimmte Proteine genutzt werden könnten, um die Entstehung von Speiseröhrenkrebs frühzeitig zu erkennen. Des Weiteren wurden hier potentielle Marker identifiziert, mit denen das Risiko einer Metastasierung abgeschätzt werden kann. Kang *et al.* haben in ihren Arbeiten die molekulare Zusammensetzung von Tumorgewebe, normalem Gewebe und Gewebe der Grenzflächenregion miteinander verglichen. Dabei haben sie sowohl in Eierstockkrebs⁸⁴ als auch Brustkrebs⁸⁵ spezifische Marker für die Grenzfläche ermittelt, mit denen gezielt Untersuchungen zum Tumorstadiumsverhalten durchgeführt werden könnten. Ferner wurde in mehreren Arbeiten das Potential von MALDI MSI für die Klassifizierung verschiedener Karzinome demonstriert.⁸⁶⁻⁸⁹ Darüber hinaus findet diese Technologie zunehmend Anwendung in pharmakologischen Studien, um die Verteilung von Medikamenten und deren Metabolite in tumorbehafteten Gewebe zu untersuchen.⁹⁰⁻⁹⁵ Die Visualisierung, ob und inwiefern das Tumorgewebe vom jeweiligen Medikament durchsetzt wird, kann dabei Aufschluss über die zugrunde liegende Pharmakokinetik geben. Für die Parkinson Krankheit haben Stauber *et al.*⁹⁶ zeigen können, dass sich mittels MALDI MSI bestimmte Proteine den betroffenen Regionen im Gehirn eindeutig zuordnen lassen. Dadurch konnten einerseits die Ergebnisse bisheriger Studien bestätigt und andererseits die Auffindung neuer potentieller Biomarker validiert werden. Des Weiteren wurde für Gehirnproben mit Alzheimer-Erkrankung demonstriert, dass im Gegensatz zur Immunhistochemie nicht nur die unterschiedlichen A β -Peptide des APP in den Amyloidablagerungen dargestellt

werden können, sondern zudem eine Aussage getroffen werden kann, in welchem relativen Mengenverhältnis diese vorliegen.⁹⁷

Zusammengefasst verdeutlichen diese Beispiele das Potential von MALDI MSI als eine wertvolle analytische Methode für die Identifizierung diagnostisch und prognostisch relevanter Biomarker sowie zur Erforschung therapeutischer Wirkstoffe und der molekularen Zusammensetzung pathologisch veränderter Gewebszustände.

3.2.1 Instrumenteller Aufbau

Aufgrund des zunehmenden Interesses an der zusätzlichen räumlichen Information, wurde die Entwicklung der MSI-Technologie über die letzten Jahrzehnte immer stärker vorangetrieben. So existiert heute eine Vielzahl an verschiedenen Ionisationstechniken, die sich im Prinzip mit allen gängigen Massenanalysatoren kombinieren lassen.⁹⁸ Dadurch ergeben sich diverse Möglichkeiten für den Aufbau der Massenspektrometer. In der vorliegenden Arbeit wurde das Synapt G2-S der Firma Waters verwendet und soll daher im Folgenden kurz vorgestellt werden (Abbildung 2).

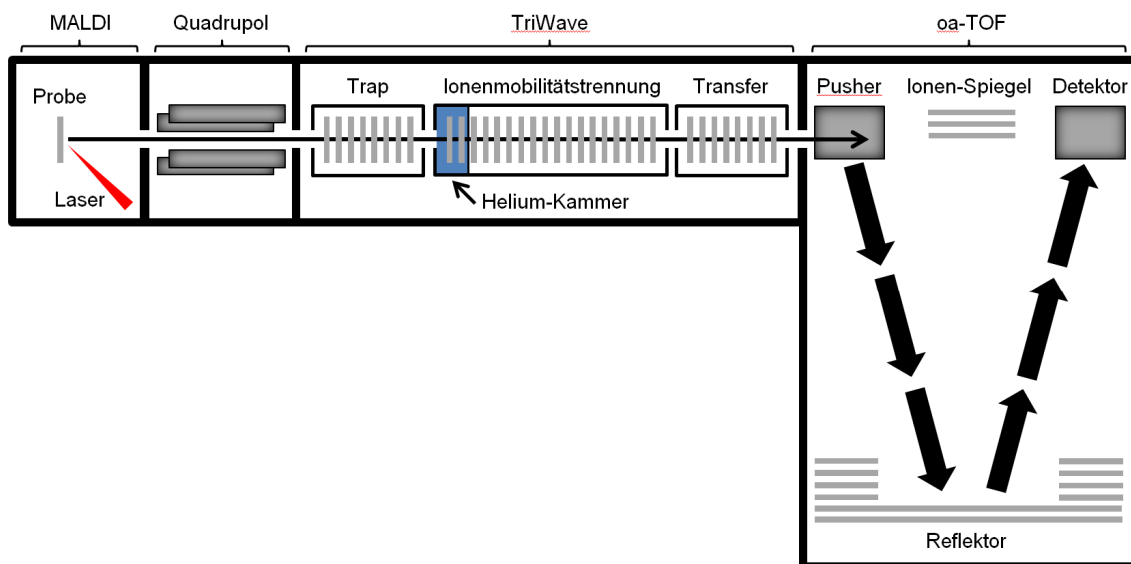


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Synapt G2-S.

Die Ionisation der Probe erfolgt bei diesem Instrument über MALDI unter Verwendung eines Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Lasers (Nd:YAG-Laser). Der Laserfokus kann dabei auf zwei vordefinierte Größen mit einem Durchmesser von 150 µm bzw. 60 µm eingestellt werden. Als Massenanalysator wird hier ein orthogonaler Beschleunigungs-Flugzeitanalysator (oa-TOF = *orthogonal acceleration Time of Flight*) verwendet, welcher in drei Auflösungsmodi mit nominell 10.000, 20.000 und 40.000 Halbwertsbreite (FWHM = *Full Width at Half Maximum*) betrieben werden kann. Für MSI Messungen finden jedoch nur die ersteren beiden Anwendung, da mit zunehmender Auflösung die Signalintensitäten abnehmen und somit das Risiko steigt, dass Analyten niedrigerer Konzentrationen nicht mehr detektiert werden können. Bei einem oa-TOF werden die Ionen im Hochvakuum senkrecht zu ihrer Bewegungsrichtung von einem *Pusher* durch kurze Hochspannungspulse beschleunigt. Die Pulsfrequenz ist dabei für unterschiedliche Massenbereiche vordefiniert. Aus der Zeit, die die Molekül-Ionen für die Strecke vom *Pusher* bis zum Detektor benötigen, können schließlich die m/z-Werte ermittelt werden:

$$t^2 = \frac{s^2 m}{2eUz}$$

Dabei gilt der Zusammenhang je kleiner die Masse (m) und je höher die Ladung (z), desto kürzer die Flugzeit (t), da die Flugstrecke (s), die Elementarladung (e) sowie die Beschleunigungsspannung (U) für alle Ionen konstant sind. Im Gegensatz zu einem axialen TOF, sind bei der orthogonalen Anordnung die Ionenquelle und der Massenanalysator entkoppelt.⁹⁹ Dies hat den Vorteil, dass Höhenunterschiede in der Probe, bedingt durch die dreidimensionale Struktur des Gewebes, die Auflösung und Massengenauigkeit weniger beeinträchtigen.⁷⁴ Des Weiteren ist dem oa-TOF ein Quadrupol vorgelagert, so dass sowohl MS als auch MS/MS Messungen durchgeführt werden können.¹⁰⁰ Der Quadrupol dient dabei als Massenfilter und lässt dementsprechend entweder einen gewissen Massenbereich passieren (MS Messung) oder nur eine bestimmte Vorläufer-Ionenmasse, die anschließend fragmentiert wird (MS/MS Messung). Die Fragmentierung kann dabei in der *Trap*-Zelle und/oder der *Transfer*-Zelle der *TriWave*-Region¹⁰¹ mittels Kollisions-induzierter Dissoziation (CID = *Collision-*

induced Dissociation)¹⁰² erfolgen. Zwischen diesen beiden Zellen befindet sich eine dritte Zelle, die eine Ionenmobilitätstrennung (IMS = *Ion Mobility Separation*) ermöglicht.

3.2.2 Ionenmobilitätstrennung

Die IMS ist eine Technologie, mit der Analyt-Ionen basierend auf ihrer Mobilität in der Gasphase getrennt werden können. Mittlerweile existieren verschiedene Ausführungen für die technische Umsetzung, doch funktionieren sie alle nach dem gleichen Grundprinzip.¹⁰³ Nach der Ionisation werden die Analyten in die IMS-Zelle transferiert, welche mit einem Driftgas gefüllt ist. Häufig werden dafür die Inertgase Helium, Stickstoff, Kohlendioxid oder Argon verwendet. Unter Einfluss eines schwachen elektrischen Feldes bewegen sich die Ionen durch die IMS-Zelle. Dabei kommt es zu Zusammenstößen mit den Molekülen bzw. Atomen des Inertgases, wodurch die Analyten in ihrer Bewegung verlangsamt werden. Da große und verzweigte Verbindungen eine größere mittlere Kollisionsquerschnittsfläche (CCS = *Collision Cross Section*) besitzen, erfahren diese mehr Zusammenstöße als kleine und nichtverzweigte. Dies hat zur Folge, dass erstere stärker verlangsamt werden und letztendlich mehr Zeit benötigen, um die IMS-Zelle zu passieren. Des Weiteren bewegen sich höher geladene Verbindungen schneller durch die IMS-Zelle.¹⁰⁴ Die Mobilität wird daher durch die dreidimensionale Struktur und Ladung der Analyt-Ionen bestimmt.

Beim Synapt G2-S wird für die Trennung die *Travelling Wave* Technologie verwendet (Abbildung 3). In der IMS-Zelle befinden sich mehrere aneinandergereihte planare Ringelektroden, die orthogonal zur Bewegungsrichtung der Ionen angeordnet sind (SRIG = *Stacked Ring Ion Guide*). An die einzelnen Elektroden sind im Wechsel die entgegengesetzten Phasen einer hochfrequenten Wechselspannung (RF = *Radio Frequency Voltage*) angelegt, was in einer radialen Fokussierung der Ionen auf ihrem Weg durch die IMS-Zelle resultiert (Abbildung 3a). Zusätzlich wird an einem Elektrodenpaar der Wechselspannung kurzzeitig eine Gleichspannung (DC = *Direct Current Voltage*) überlagert. Dies erfolgt zeitlich versetzt für benachbarte Elektrodenpaare und wiederholt sich in bestimmten Abständen entlang des gesamten Elektrodenbereichs (Abbildung 3b), so dass letztendlich eine Spannungswelle erzeugt wird, die die Ionen

durch die IMS-Zelle befördert. Durch die Zusammenstöße mit dem Driftgas (Stickstoff), werden die Analyten über die Wellenberge gedrückt. Dieses Phänomen wird auch als *Roll-Over* Effekt bezeichnet. Bei Verbindungen mit einer größeren CCS tritt dieser Effekt häufiger auf als bei denen mit einer kleineren CCS und führt letztendlich zur Trennung der Analyten (Abbildung 3c). Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, befindet sich die IMS-Zelle in der *TriWave*-Region zwischen der *Trap*- und der *Transfer*-Zelle. Während einer Messung werden durch erstere die erzeugten Ionen akkumuliert und in mehreren einzelnen Paketen in die IMS-Zelle injiziert, wohingegen letztere die aus der IMS-Zelle austretenden Ionen unter Erhalt der Trennung zum oa-TOF transferiert. Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise der einzelnen Komponenten ist in den Arbeiten von Giles *et al.*¹⁰⁵ und Pringle *et al.*¹⁰¹ gegeben.

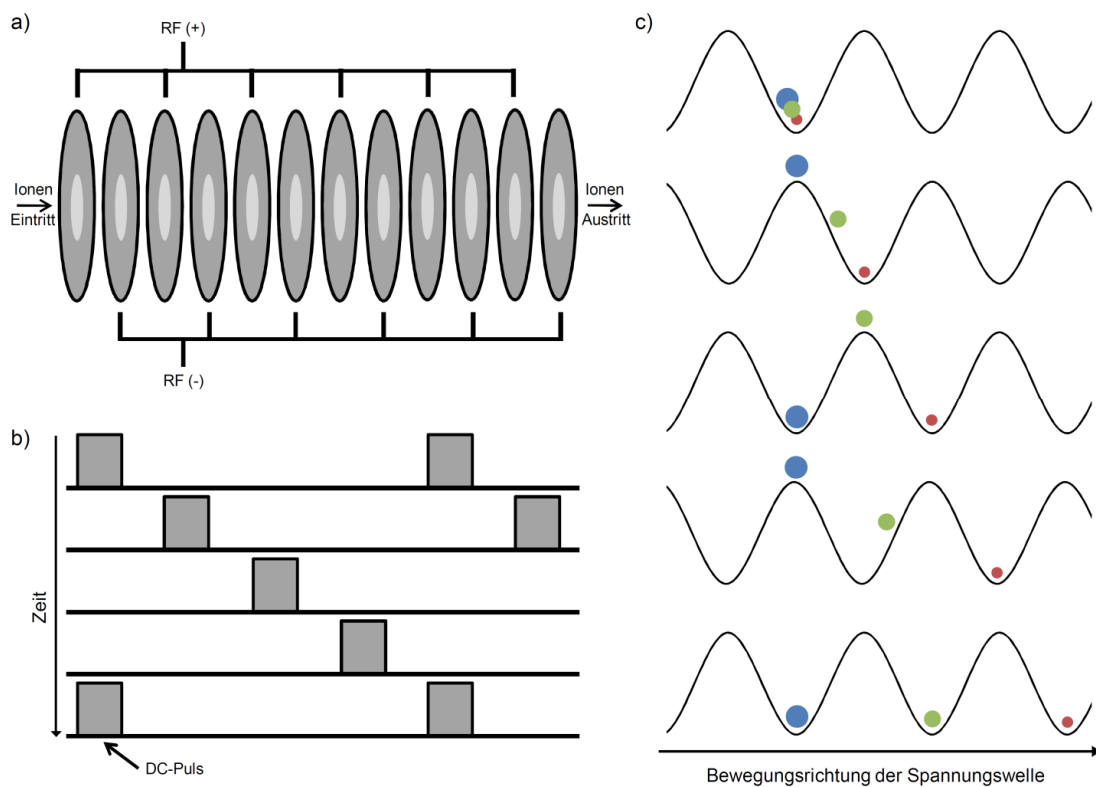


Abbildung 3: Schematische Darstellung a) des Stacked Ring Ion Guides (SRIG), b) der zeitlich versetzt angelegten Gleichspannung entlang des Elektrodenbereichs, c) der erzeugten Spannungswelle und der Trennung für Ionen unterschiedlicher Kollisionsquerschnittsflächen (• < • < •).

Ein wesentlicher Vorteil, der sich aus der Kopplung von IMS mit der Massenspektrometrie ergibt, ist die Möglichkeit isobare Verbindungen getrennt voneinander detektieren zu können. Clemmer *et al.*¹⁰⁶ demonstrierten erstmals in ihren Arbeiten, dass sich darüber verschiedene Konformere eines Proteins unterscheiden lassen. Seither findet die Technologie häufig Anwendung in der Strukturanalytik diverser Biomoleküle.¹⁰⁷⁻¹¹² Des Weiteren wurde gezeigt, dass IMS auch zur Aufklärung von Fragmentierungsmechanismen in MS/MS Experimenten genutzt werden kann.¹¹³ Ferner können mit der Methode unterschiedliche Verbindungsklassen, wie Peptide, Lipide, Nukleotide, und Oligosaccharide in komplexen biologischen Proben voneinander getrennt werden.^{114, 115} Aus den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen geht hervor, dass mit Hilfe der IMS die spektralen Interferenzen in MALDI MSI Messungen reduziert werden können und somit eine höhere Bildqualität erzielt wird.^{116, 117} Bei MS/MS Messungen, die direkt auf dem Gewebe durchgeführt werden, kommt es häufig zu einer Überlagerung von Fragmentenspektren isobarer Verbindungen. Eine eindeutige Identifizierung wird dadurch erschwert oder sogar unmöglich. Djidja *et al.*¹¹⁸ haben gezeigt, dass durch den Einsatz der IMS die Fragmentenspektren isobarer tryptischer Peptide voneinander getrennt werden können und somit eine Verbesserung für die Identifizierung erreicht wird.

4 Zielsetzung der Arbeit

In der klinischen Routine erfolgt die gewebebasierte Amyloiddiagnostik in zwei Schritten: 1) Bestätigung des Vorliegens einer Amyloidose mittels Kongorotfärbung und 2) Identifizierung des verursachenden Proteins über immunhistochemische Färbungen. Letzterer birgt Probleme bezüglich der Sensitivität und Spezifität, so dass mittlerweile verschiedene alternative analytische Verfahren zur Unterstützung der Klassifizierung entwickelt wurden. Die bisherigen Methoden führen jedoch aufgrund der Homogenisierung des Gewebes zum Verlust der räumlichen Information und sind zudem auf die Kongorotfärbung angewiesen.

MALDI MSI ist eine Technologie, mit der Amyloidablagerungen im Gewebe theoretisch räumlich aufgelöst analysiert werden können. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Verfahren entwickelt werden, um sowohl die Diagnose als auch die Klassifizierung von Amyloidosen anhand eines Gewebeschnitts mittels MALDI MSI zu realisieren. Dafür sollte zunächst eine geeignete Probenvorbereitung für die Analyse von amyloidhaltigen FFPE Gewebe etabliert werden, mit der für die Messungen eine möglichst hohe Spektrenqualität unter gleichzeitigem Erhalt der räumlichen Verteilung der Analyten erhalten wird. Nach der Etablierung der Probenvorbereitung sollten mit der Methode Peptide von amyloidogenen und Amyloid-assoziierten Proteinen in den Ablagerungen nachgewiesen und identifiziert werden. Zusätzlich sollten weitere Proteine als Bestandteil von Amyloiden identifiziert werden. Basierend auf diesen Vorarbeiten sollten unterschiedliche Amyloidtypen in verschiedenen Gewebearten auf eine für Amyloide spezifische Massensignatur untersucht werden, anhand der eine Diagnose für Amyloidosen erstellt werden kann. Schließlich sollte bei der Untersuchung eines großangelegten Kollektivs festgestellt werden, ob für verschiedene Amyloide Unterschiede in den Massensignaturen existieren, die eine Klassifizierung von Amyloidosen ermöglichen.

5 Material und Methoden

5.1 Massenspektrometrie

5.1.1 Chemikalien

ABC	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aceton	Sigma Aldrich
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Anilin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
CHCA	LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, Frankreich)
Citronensäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DTT	Sigma Aldrich
EtOH	99%, Chemsolute Th. Geyer (Hamburg, Deutschland)
GluFib	<i>Homo sapiens</i> , Sigma Aldrich
IAA	Sigma Aldrich
Natriumcitrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
OcGlc	10 mM in Wasser, Sigma Aldrich
rekombinantes ApoAI	PeproTech (Hamburg, Deutschland)
rekombinantes Vitronectin	PeproTech (Hamburg, Deutschland)
roter Phosphor	Sigma Aldrich
sequenz-modifiziertes Trypsin	Promega (Mannheim, Deutschland)
TFA	Sigma Aldrich
Wasser	doppelt destilliert, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol	BüFa (Lübeck, Deutschland)

5.1.2 Biologisches Material

Für die MALDI MSI und MALDI-IMS MSI Experimente wurden aus dem Amyloid Register der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel amyloidhaltige FFPE Gewebeproben von 114 Patienten mit den Amyloidtypen AA, AApoAI, AFib, AIns, AL λ , ALys und ATTR ausgewählt. Die Proben umfassten die folgenden Gewebearten: Gehirn (1 Patient),

Herz (73), Milz (1), Niere (4), Leber (3) und subkutanes Fettgewebe der Bauchhaut (1). Desweiteren wurden nicht-amyloidhaltige Herzproben von 31 Patienten ausgewählt. Mit einem Mikrotom (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) wurden 5 µm und 2 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgezogen und über Nacht bei 54 °C in einem Trockenschrank (Binder B028-230V) getrocknet. Bis zur weiteren Präparation wurden die Gewebeschnitte im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

5.1.3 Präparation von FFPE Gewebeschnitten

Methode A (ohne Antigendemaskierung)

Zur Entfernung des Paraffins wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte für 2 x 10 min in Xylolbäder gestellt. Die anschließende Rehydrierung erfolgte über eine Alkoholreihe mit 99 %, 70 %, 50 % EtOH (jeweils 2 x 2 min) und Wasser (2 x 1 min). Danach wurden die Gewebeschnitte im Exsikkator bei Raumtemperatur und einem Vakuum von -400 mBar mindestens 15 min getrocknet. Für den Verdau wurde eine 20 µg/ml Trypsinlösung (gelöst in 50 mM ABC mit H₂O/OcGlc, 95,5:0,5 v/v, pH 8.1) verwendet. Bei einer Flussrate von 20 µl/min wurden zehn Schichten der Lösung mit dem SunCollect Micro Fraction Collector/MALDI Spotter (SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) im Sprühmodus auf die Gewebeschnitte aufgetragen (*Offset* für z-Position: 35 mm, Geschwindigkeit in x- und y-Richtung: *low* 10, Sprühkopf 210.209-026). Anschließend wurden die Proben bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre für 2 h inkubiert und danach im Exsikkator bei Raumtemperatur unter einem Vakuum von -400 mBar mindestens 15 min getrocknet. Danach wurden zehn Schichten einer 5 mg/ml CHCA-Lösung (gelöst in ACN/0,1 % TFA, 50:50, v/v) mit dem Sprühroboter von SunChrom aufgetragen (*Offset* für z-Position: 35 mm, Geschwindigkeit x- und y-Richtung: *low* 10, Sprühkopf 210.209-026). Für die ersten drei Schichten wurde die Flussrate sukzessiv erhöht und danach konstant gehalten: 1. Schicht 10 µl/min, 2. Schicht 20 µl/min und 3.-10. Schicht 30 µl/min.

Methode B (mit Antigendemaskierung)

Zur Entfernung des Paraffins wurden 2 µm dicke Gewebeschnitte für 2 x 15 min in Xylolbäder gestellt. Die Rehydrierung erfolgte über eine Alkoholreihe mit 99 %, 70 %, 50 % EtOH (jeweils 2 x 2 min) und Wasser (2 x 1 min). Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden ohne Trocknung in eine Plastikküvette, befüllt mit einer 10 mM Natriumcitrat-puffer-Lösung (pH 6,0), überführt. Die Küvette wurde mit einem Deckel abgedeckt, aber nicht verschlossen. In einem Dampfdruckkocher (Pascal S2800, DakoCytomation California, Inc., USA) wurden die Proben für 30 min auf 100 °C erhitzt. Danach wurden die Schnitte zunächst auf 90 °C und anschließend in einem kalten Wasserbad (ca. 10 °C) für 15 min weiter abgekühlt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte zehnmal mit Wasser gespült, abgetropft und im Exsikkator bei Raumtemperatur unter einem Vakuum von -800 mBar mindestens 15 min getrocknet. Für den Verdau wurde eine 50 µg/ml Trypsinlösung (gelöst in 50 mM ABC mit 10 % ACN/OcGlc, 99,5:0,5 v/v; pH 8,1) hergestellt. Mit einer Flussrate von 10 µl/min wurden 10 Schichten der Enzymlösung mit dem Sprühroboter von SunChrom auf die Gewebeschnitte aufgetragen (*Offset* für z-Position 30 mm, Geschwindigkeit in x- und y-Richtung: *low* 10, Sprühkopf 210.209-101). Anschließend wurden die Proben bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre für 2 h inkubiert und danach im Exsikkator bei Raumtemperatur unter einem Vakuum von -800 mBar mindestens 15 min getrocknet. Danach wurden acht Schichten einer 5 mg/ml CHCA-Lösung (gelöst in ACN/0,2 % TFA, 50:50, v/v) mit dem Sprühroboter von SunChrom auf die getrockneten Proben aufgetragen (*Offset* für z-Position: 25 mm, Geschwindigkeit in x- und y-Richtung: *low* 10, Sprühkopf 210.209-101). Für die ersten vier Schichten wurde die Flussrate sukzessiv erhöht und danach konstant gehalten: 1. Schicht 20 µl/min, 2. Schicht 30 µl/min, 3. Schicht 40 µl/min und 4.-8. Schicht 60 µl/min.

5.1.4 Allgemeine instrumentelle Einstellungen und Kalibrierung

Die Messungen der MS1- und MS2-Spektren wurden mit dem Synapt G2-S (1kHz Nd:YAG-Laser, Waters Corporation, Manchester, U.K) durchgeführt. Alle Spektren

wurden mit 1.000 Laserschüssen pro Scan (1 s) im Sensitivitätsmodus (10.000 FWHM) für positive Ionen aufgenommen. Der Laserfokus wurde auf einen Durchmesser von 150 µm eingestellt. Die Geräteparameter Laserenergie, Quadrupol Profil, Transferwellengeschwindigkeit (TWV), Wellengeschwindigkeit (WV) und *Trap DC Bias* wurden für die Kalibrierung des Massenspektrometers und die Peptidmessungen entsprechend angepasst (Tabelle 2). Für die manuelle Einstellung des Quadrupols wurde ein vom Hersteller vordefiniertes Profil für Peptidmessungen verwendet (*Mass 1*: 100 m/z, *Dwell Time 1*: 4 %, *Ramp Time 1*: 1 %; *Mass 2*: 900 m/z, *Dwell Time 2*: 90 %, *Ramp Time 2*: 5 %; *Mass 3*: 900 m/z). Weitere Einstellungen werden in den jeweiligen Experimenten beschrieben.

Tabelle 2: Übersicht der Einstellungen der Geräteparameter, die für die Kalibrierung und Peptidmessungen angewendet wurden. Die Transferwellengeschwindigkeit (TWV), Wellengeschwindigkeit (WV) und Trap DC Bias wurden nur bei Messungen mit IMS angepasst.

	Kalibrierung		Messungen	
Massenbereich [m/z]	100-3.000	100-2.000	100-3.000	100-2.000
Quadrupol Profil	automatisch	automatisch	manuell	manuell
Laserenergie [a. E.]	240	240	200	200
TWV [m/s]	110	175	110	175
WV [m/s]	–	–	400	350
<i>Trap DC Bias</i> [V]	–	–	80	70

– = nicht aktiviert

Für die Kalibrierung wurden 5 µl (5 x 1 µl *Spots pro Well*) einer übersättigten Lösung roten Phosphors (ca. 30 mg gelöst in 500 µl Aceton) auf eine 96 *Well* MALDI-Platte (Waters Corporation, Manchester, U.K.) aufgetragen. Die MS1-Spektren für den jeweiligen Massenbereich wurden mit den in Tabelle 2 beschriebenen Einstellungen aufgenommen (Aufnahmezeit: 180 s).

5.1.5 MALDI MS und MALDI-IMS MS Experimente

i) Einstellung der Laserenergie

Für die Einstellung der Laserenergie wurden 1 μl Spots einer 100 nM GluFib-Lösung (2,5 mg/ml CHCA, ACN/0,1 % TFA, 50:50, v/v) auf eine 96 Well MALDI-Platte aufgetragen. Die MS1-Spektren wurden in einem Massenbereich von 700-3.000 m/z analog zu Kapitel 5.1.4 (Tabelle 2; Aufnahmezeit: 60 s) aufgenommen. Die Laserenergie wurde schrittweise um 10 arbiträre Einheiten (a. E.) über den Bereich 140-250 a.E. erhöht. Die in MassLynx (Waters Corporation, Manchester, U.K.) aufsummierten MS1-Spektren wurden mit der Software mMass (Version 5.5, <http://www.mmass.org>) wie folgt prozessiert: *baseline correction* (*precision*: 15; *relative offset*: 25), *smoothing* (Savitzky-Golay-Algorithmus; *window*: 0,2 m/z; *cycles*: 2) und *peak picking* (*picking height*: 75 %; *S/N* \geq 3).

ii) Optimierung der Ionenmobilitätstrennung

Zur Untersuchung der Stabilität der IMS über die Zeit, wurde die Driftzeit des GluFib-Signals bei 1.570,68 m/z zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 - 2 h alle 15 min; 2 - 12 h alle 60 min) nach Aktivierung des IMS-Modus bestimmt. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kapitel 5.1.5i beschrieben. Für die Optimierung der IMS-Parameter wurden jeweils 50 μl 500 nM ApoAI und VTN (gelöst in 25 mM ABC, pH 8,1) hergestellt. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden 12 μl 50 mM DTT (gelöst in 25 mM ABC, pH 8,1) zu 50 μl 500 nM VTN zugegeben und für 30 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden freie Thiolgruppen durch Zugabe von 6 μl 200mM IAA (gelöst in 25 mM ABC, pH 8,1) bei 20 °C für 15 min unter Ausschluss von Licht alkyliert. Die Reduktions- und Alkylierungsreaktion wurden für ApoAI nicht durchgeführt, da das Protein keine Disulfidbrücken ausbildet. Die Proteine wurden mit der Protease Trypsin (Enzym-Protein-Verhältnis, 1:28, w/w) bei 37 °C für 14 h verdaut. Der Abbruch des Verdaus erfolgte durch Zugabe von 15 μl 1 % TFA. Die tryptischen Peptide wurden nachfolgend mit ZipTip-C18 Pipettenspitzen (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufgereinigt. Die Proben wurden dafür zunächst bis zur Trockne eingengt (*Concentrator Plus*, Eppendorf, Deutschland) und danach in 30 μl 0,1 % TFA gelöst. Vor dem Beladen mit

der Probe wurde das C18 Material mit 0,1 % TFA equilibriert. Anschließend wurden die Peptide mit 0,1 % TFA gewaschen und in 25 µL ACN/0,1 % TFA (50:50, v/v) eluiert. Nach der Aufreinigung wurden die Peptidlösungen von ApoA1 und VTN zusammengeführt und mit einer CHCA-Lösung (5 mg/ml, ACN/0,1 % TFA, 50:50, v/v) verdünnt (Peptidlösung/CHCA-Lösung, 50:50, v/v). Für die Messungen wurden 1 µl *Spots* auf eine 96 *Well* MALDI-Platte aufgetragen. Die MS1-Spektren wurden im Massenbereich von 100-3.000 m/z oder 100-2.000 m/z analog zu Kapitel 5.1.4 (Tabelle 2, Aufnahmezeit: 60 s) gemessen. Für die Optimierung der IMS wurden die Wellengeschwindigkeit (*Wave Velocity*, WV) schrittweise um 25 m/s und der *Trap DC Bias* um 10 V variiert. Die Wellenhöhe (*Wave Height*, WH) wurde dabei auf 40 V eingestellt. Die in MassLynx aufsummierten MS1-Spektren wurden mit der Software mMass, wie in Kapitel 5.1.5i beschrieben, prozessiert. Die Software Driftscope (Version 2.7, Waters Corporation, Manchester, U.K.) wurde für die Bestimmung der Driftzeiten und die Darstellung der 1D- und 2D-Mobilogramme verwendet.

5.1.6 MALDI MSI und MALDI-IMS MSI Experimente

i) Massengenauigkeit und Erstellung eines Matrixfilters

Auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) wurden zehn Schichten einer 200 nM GluFib-Lösung (5 mg/ml CHCA, ACN/0,1 % TFA, 50:50, v/v) mit dem Sprühroboter von SunChrom aufgetragen (*Offset* für z-Position: 35 mm, Geschwindigkeit in x- und y-Richtung: *low* 10, Sprühkopf 210.209-026). Die Flussrate wurde über die ersten vier Schichten sukzessiv erhöht und danach konstant gehalten: 1. Schicht 10 µl/min, 2. Schicht 25 µl/min, 3. Schicht 30 µl/min 4.-10. Schicht 35 µl/min. Für die Definition der zu messenden Areale (ROI = *region of interest*) wurden digitale Bilder (Epson[®] Perfection 1640SU) der Proben in die Software High Definition Imaging (HDI) (v1.3.5, Waters Corporation, Manchester, U.K.) importiert. Die MS1-Spektren wurden für den Massenbereich 700-3.000 m/z mit den in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Parametern aufgenommen (Tabelle 2, Aufnahmezeit: 1 s/Pixel; räumliche Auflösung: 200 µm). Für die Bestimmung der Massengenauigkeit wurden die Rohdaten mit der

Software HDI prozessiert (*number of most intense peaks*: 3.000; *m/z window*: 0,1 Da; *lock mass*: 1.570,6768 m/z; *lock mass tolerance*: 0,25 Da). Zur Erstellung einer Peakliste für den Matrixfilter wurden die in MassLynx aufsummierten MS1-Spektren mit der Software mMass wie folgt prozessiert: *peak picking* (*picking height* 75 %; *S/N* ≥ 3) und interne Rekalibrierung auf die Peptidmasse 1.570,6768 m/z von GluFib.

ii) Peptidmessungen auf FFPE Gewebeschnitten

Die Proben wurden nach Methode A bzw. nach Methode B präpariert. Für die Definition der ROIs wurden analog zu Kapitel 5.1.6i digitale Bilder der Gewebeschnitte in die Software HDI importiert. Die MS1-Spektren wurden mit einer räumlichen Auflösung von 200 µm für den jeweiligen Massenbereich analog zu Kapitel 5.1.4 (Tabelle 2) gemessen. Bei den Messungen ohne IMS wurden die MS1-Spektren in dem Massenbereich 700-3.000 m/z aufgenommen. Für die Erstellung der Peptidbilder wurden die Rohdaten analog zu Kapitel 5.1.6i mit der Software HDI prozessiert. Zur Rekalibrierung der MS1-Spektren wurde für Proben, die nach Methode A präpariert wurden, das Signal von GluFib bei 1570,6768 m/z verwendet und für Proben, die nach Methode B präpariert wurden, das Signal des CHCA-Matrixclusters bei 825,101 m/z. Bei den Messungen mit IMS wurden die MS1-Spektren in dem Massenbereich 700-2.000 m/z aufgenommen und die Prozessierung mit der Software HDI entsprechend angepasst (*m/z window*: 0,1 Da; *lock mass*: 825,101 m/z; *lock mass tolerance*: 0,25 Da; *intensity threshold*: 10 counts; *drift window*: 5 bin; *IMS peak width*: 2-10 bin). Anschließend wurde für die Darstellung der Peptidbilder eine Normalisierung der spektralen Daten auf den Basispeak durchgeführt.

5.1.7 MALDI MS/MS und MALDI-IMS MS/MS Experimente

Die Präparation der Gewebeschnitte erfolgte nach Methode A bzw. Methode B. Für die Aufnahme der MS2-Spektren wurden ROIs in den Amyloidablagerungen, wie in Kapitel 5.1.6i beschrieben, mit der Software HDI definiert. Die MS2-Spektren wurden mit einer räumlichen Auflösung von 200 µm mit den in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Parametern

für den Massenbereich 100-2.000 m/z (Tabelle 2, Quadrupol: automatisch) aufgenommen. Die Vorläufer-Ionen wurden manuell bestimmt. Die CID-Fragmentierung der tryptischen Peptide erfolgte in der Transferzelle der *TriWave*-Region¹⁰¹ und wurde für die jeweiligen Vorläufer-Ionen angepasst. Für Messungen ohne IMS wurde eine 20 V Rampe für die Kollisionsenergie verwendet. Für Messungen mit IMS wurde ein fester Wert für die Kollisionsenergie sowie eine WV von 450 m/s eingestellt. Die erhaltenen MS2-Spektren wurden mit der Software MassLynx (Waters Corporation, Manchester, U.K.) prozessiert. Zur externen Rekalibrierung der MS2-Spektren wurde für Proben, die nach Methode A präpariert wurden, das Signal von GluFib bei 1.570,6768 m/z verwendet und für Proben, die nach Methode B präpariert wurden, das Signal des CHCA-Matrixclusters bei 825,101 m/z. Anschließend erfolgte eine Deisotopierung unter Verwendung des MaxEnt 3 Algorithmus (*minimum molecular mass*: 100 Da, *maximum molecular mass*: Vorläufer-Ionenmasse +20 Da, *maximum number of charges*: 1, *ensemble members*: 1, *iterations*: 100, *intensity threshold*: 0,5 %). Die prozessierten MS2-Spektren wurden mit Hilfe des Windows Editors (v6.1, Microsoft, Redmond, USA) als MGF-Dateien (*Mascot Generic Format*) exportiert. Die Datenbanksuche wurde mit dem Proteome Discoverer Softwarepaket (v1.4.0.288, Thermo Fischer Scientific, Deutschland) mit Suchalgorithmen von MASCOT (v2.2.07) und SequestHT durchgeführt. Die verwendete FASTA-Datenbank bestand aus 20.183 Proteinsequenzen der Referenzproteomdatenbank *Homo sapiens* (UniProt, heruntergeladen am 07.04.2017). Für die Enzymspezifität wurde Trypsin mit maximal einer verpassten Spaltstelle eingestellt. Die Massentoleranz der Vorläufer-Ionen wurde auf 25 ppm und die der Fragment-Ionen auf 0,2 Da gesetzt. Für die Sicherheit der Zuordnung wurde eine Falsch-positiv Rate (*False Discovery Rate* = FDR) von 5 % definiert.

5.1.8 Identifizierung von Peptiden mittels MDIC-Filter

Für die Detektion der zuvor mittels MS/MS Experimenten identifizierten 19 tryptischen Peptide (Anhang 9.3, Tabelle A3) von Apolipoprotein AI (ApoAI), Apolipoprotein E (ApoE), Serum Amyloid A (SAA), Serum Amyloid P Komponente (SAP), Transthyretin (TTR) und Vitronectin (VTN) wurde auf die prozessierten MALDI-IMS MSI Daten der

MDIC-Peptidfilter angewendet. Die Toleranzen für die Massengenauigkeit, Driftzeit und den Korrelationskoeffizienten der Peptidbilder (Pearson Korrelationskoeffizient¹¹⁹, R) wurden auf 30 ppm, 2,5 bin und $R \geq 0,75$ festgelegt. Als Referenzmassen wurden die Peptidmassen aus einem *in silico* Verdau (PeptideMass, www.expasy.org) der sechs Proteine verwendet. Für die Driftzeit wurden die empirisch ermittelten Werte aus Kapitel 6.4 als Referenz genommen. Zur Bestimmung von R mit der Software HDI, wurde das Peptidbild von m/z 968.55 (ApoE) als Referenzbild verwendet. Ein Peptid gilt als identifiziert, wenn alle drei Kriterien erfüllt wurden. Die Referenzwerte für die Peptidmassen und Driftzeiten können im Anhang 9.3 der Tabelle A4 entnommen werden.

5.1.9 Statistische Analyse

Für die statische Auswertung wurden die Rohdaten von MALDI-IMS MSI, wie in Kapitel 5.1.6ii und mit einer zusätzlichen Peptidliste (*target list*) der 19 tryptischen Peptide (Kapitel 6.4, Tabelle 5) von ApoAI, ApoE, SAA, SAP, TTR und VTN, prozessiert. Die Liste enthielt sowohl die Peptidmassen als auch die dazugehörigen spezifischen Driftzeiten, die in dem MDIC-Filter als Referenz verwendet wurden. Anschließend wurden mit der Software HDI die spektralen Daten von Arealen mit hoher Signalintensität für die Peptidmasse bei m/z 968,55 (ApoE) gegen den *Total Ion Current* (TIC) normalisiert und zur statistischen Analyse exportiert. Für alle 19 Peptide wurde mit der Software SPSS (v20.0, IBM Corporation, Armonk, USA) ein Mann-Whitney U Test (*2-tailed test*, $p < 0,05$) bezüglich der Signalintensitäten durchgeführt. Um falsch positive Resultate aufgrund multipler Testung auszuschließen, wurden die p-Werte mit dem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau verglichen ($p^* < 0,05/19 = 0,0026$). Peptidmassen, für die im Mann-Whitney U Test signifikante Unterschiede ermittelt wurden, wurden für die Erstellung eines *Support Vector Maschine* (SVM)¹²⁰ Models (*kernel function: radial basis function, sigma: 2, C: 10, cross-validation: 4-fold*) mittels des Softwarepakets Perseus (v1.5.5.3, www.perseus-framework.org) verwendet.

5.2 Histologie und Immunhistochemie

5.2.1 Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen

Der Nachweis und die Klassifizierung von Amyloid wurde unabhängig von dieser Arbeit mit den in unserer Arbeitsgruppe etablierten und in der Literatur beschriebenen Protokollen durchgeführt.^{51, 121-123} Allgemein wurden Amyloidablagerungen mit der Kongorotfärbung und Polarisationsmikroskopie nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.3). Für die Klassifizierung wurden die Gewebeschnitte mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern gegen Serum Amyloid A (anti-SAA, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), Insulin (BioGenese), β 2-Mikroglobulin und polyklonalen Antikörpern gegen Amyloid P-Komponente, λ -Leichtkette, κ -Leichtkette, Fibrinogen, β - Amyloid; alle von DAKO (Hamburg, Deutschland) sowie nicht-kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpern gegen Apolipoprotein AI (anti-ApoAI), Transthyretin (TTR3), λ -Leichtkette (AL1, AL3 und AL7), und κ -Leichtkette (AK3) gefärbt.

5.2.2 Validierung von Vitronectin als Bestandteil von Amyloidablagerungen

Aus dem Amyloid-Register der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurden Leerschnitte amyloidhaltiger FFPE Gewebeproben von 175 Patienten mit den Amyloidtypen AA, A β , A β 2M, AApoAI, AL λ , AL κ , ATTR, AIns und AFib ausgewählt. Die Proben umfassten die folgenden Gewebearten: Gehirn (8 Patienten), Nase (1), Lippe (1), Speicheldrüse (1), Lunge (8), Herz (27), Zunge (3), Magen (12), Dünn- (10) und Dickdarm (20), Leber (6), Milz (1), Niere (19), Blase (5), Karpaltunnel Ligament/Synovialis (19), Bandscheibe (1), Lymphknoten (2), Haut (4), subkutanes Fettgewebe (12), Weichteile (5) und Knochenmark (10). Die immunhistochemische Färbung des Validierungskollektivs wurde mit dem Färbeautomaten Bond-Max (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpers gegen Vitronectin (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Durch Abgleichen der positiv gefärbten Areale mit der Kongorotfärbung, wurde von Prof. Dr. Christoph Röcken der prozentuale Flächenanteil des Vitronectins in den

Amyloidablagerungen bestimmt und die Proben daraufhin in die vier Kategorien 0 %, ≤ 10 %, 11-90 % und >90 % unterteilt.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Essentielle Vorversuche

6.1.1 Einstellung der Laserenergie

Für MALDI MS Messungen ist die Fluenz des Lasers (Pulsenergie pro Fläche, J/cm^2) ein entscheidender Parameter, der wesentlich zur Qualität der Spektren beiträgt. Damit es zu einer messbaren Desorption/Ionisation der Analyten kommt, muss für die Fluenz zunächst ein bestimmter Wert erreicht werden.¹²⁴ Dieser Wert wird daher häufig auch als Ionendetektionsgrenze bezeichnet und hängt u.a. von der UV-Absorption der verwendeten Matrix, dem Analyten und dem Laserfokus ab.^{125, 126} Untersuchungen zur Abhängigkeit der Ionenausbeute von der Fluenz haben gezeigt, dass letztere über einen gewissen Bereich erhöht werden kann, um die Signalintensität zu verbessern.¹²⁵⁻¹²⁹ Eine weitere Erhöhung über diesen Bereich hinaus führt zunächst zu einer "Sättigung" und schließlich zu einer Abnahme der Signalintensität. Dieses Verhalten wurde für verschiedene Matrices, Analyten und Größen des Laserfokus beobachtet und wird auf eine zunehmende Fragmentierung sowie Detektorsättigung zurückgeführt.^{125, 126} Die entstehenden Fragment-Ionen können zum chemischen Rauschen beitragen, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) zusätzlich verringert werden würde und somit auch die Spektrenqualität.^{130, 131}

Aufgrund dessen sollte in einem MALDI MS Experiment zunächst eine Fluenz eingestellt werden, mit der eine gute Spektrenqualität bezüglich Signalintensität und S/N-Verhältnis für Peptidmessungen erhalten wird. Die Fluenz des Lasers kann sowohl durch Variation des Laserfokus' als auch der Laserenergie verändert werden. Für die Einstellung der Fluenz wurde in diesem Experiment die Spektrenqualität in Abhängigkeit von der Laserenergie untersucht. Die zugehörigen Fluenzwerte konnten jedoch nicht ermittelt werden, da die Laserenergie in der Gerätesoftware in arbiträren Einheiten (a.E.) angegeben wird. Entsprechend den experimentellen Bedingungen der späteren MALDI MS und MALDI MSI Messungen wurde der Laserfokus auf einen Durchmesser von $150 \mu\text{m}$ eingestellt und als Matrix CHCA verwendet (siehe Kapitel 5.1.5i). In Abbildung 4 sind die Intensität und das S/N-Verhältnis des GluFib-Signals bei 1.570,68

m/z als Funktion der Laserenergie dargestellt. Die Laserenergie bei 140 a.E. wurde hier als Ionendetektionsgrenze bestimmt, da unterhalb dieses Wertes keine auswertbaren Spektren erhalten wurden. Mit zunehmender Laserenergie steigt das S/N-Verhältnis zunächst an und durchläuft schließlich bei 230 a.E. ein Maximum (Abbildung 4a), wohingegen die Signalintensität über den gesamten Energiebereich linear ansteigt (Abbildung 4b).

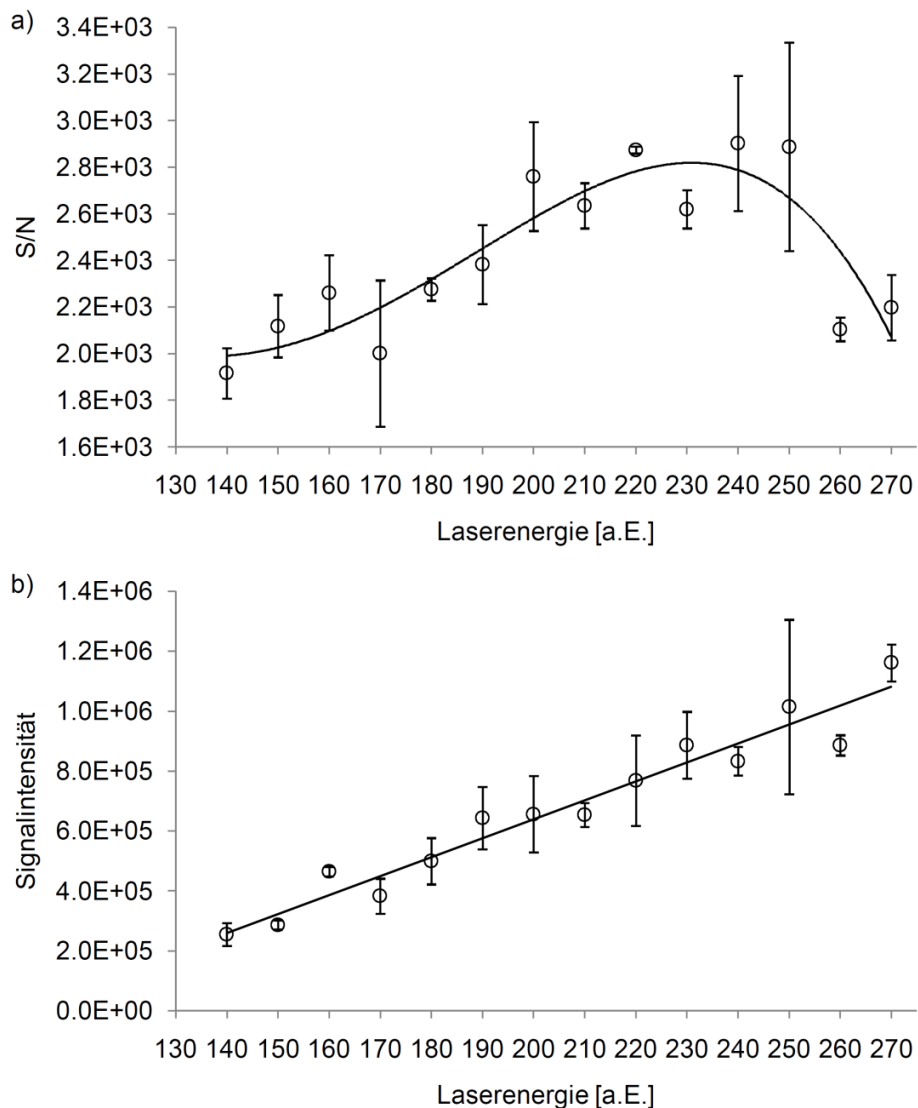


Abbildung 4: a) Signal-Rausch-Verhältnis und b) Signalintensität des GluFib-Signals bei $1.570.68 m/z$ als Funktion der Laserenergie. Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei Wiederholungsmessungen. Die eingezeichneten Funktionen sind Trendlinien und dienen zur besseren Visualisierung.

Dieses Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen^{125, 126, 130}, nach denen die Abnahme des S/N-Verhältnis bei höheren Laserenergien (und damit Fluenzen) auf eine geringere Signalintensität und Zunahme des chemischen Rauschens durch Fragmentierung des GluFib zurückzuführen wäre. Für den hier untersuchten Bereich der Laserenergie kann jedoch eine Fragmentierung als Ursache ausgeschlossen werden, da für die Intensität des GluFib-Signals keine Sättigung beobachtet werden konnte. Krutchinsky und Chait¹³² haben mittels MSMS Messungen von zufällig ausgewählten Signalen des Rauschens zeigen können, dass das chemische Rauschen größtenteils von Matrixcluster gebildet wird. In Abbildung 5 ist der Verlauf der Signalintensitäten von drei ausgewählten CHCA-Matrixclustern in Abhängigkeit der Laserenergie dargestellt. Während der Anstieg der Signalintensität bis 230 a.E. näherungsweise als linear angesehen werden kann (schwarze gestrichelte Linie), scheint der Anstieg für höhere Energien einen "exponentiellen" Charakter anzunehmen (farbige Linien). Mit der Annahme, dass das Verhalten der drei Matrixcluster repräsentativ für alle Matrixsignale ist, nimmt ab einer bestimmten Laserenergie das chemische Rauschen im Vergleich zu der Signalintensität des GluFib überproportional zu. Dies würde erklären warum sich das S/N-Verhältnis bei höheren Energien verringert, obwohl keine Fragmentierung des GluFib stattfindet.

Unabhängig davon konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass für die Fluenz bei einer Laserenergie von 230 a.E. die höchste Spektrenqualität erhalten wird, da hier das S/N-Verhältnis ein Maximum durchläuft. Aus den Arbeiten von Dreisewerd *et al.*¹²⁵ geht hervor, dass für verschiedene Analyten die Fragmentierung bei unterschiedlichen Fluenzen einsetzen kann. Da insbesondere Gewebeproben sehr komplex sind, können diese auch Peptide enthalten, die bei 230 a.E. bereits fragmentiert werden. Für die folgenden MALDI MS und MALDI MSI Messungen wurde daher eine Laserenergie von 200 a.E. eingestellt. Dies stellt einen Kompromiss aus maximaler Signalintensität, maximalem S/N-Verhältnis und minimalem Fragmentierungsrisiko. Für die Kalibrierung mit rotem Phosphor wurde hingegen eine Laserenergie von 240 a.E. verwendet, um stabile Signale mit hohen Intensitäten in den MS1-Spektren zu erhalten.

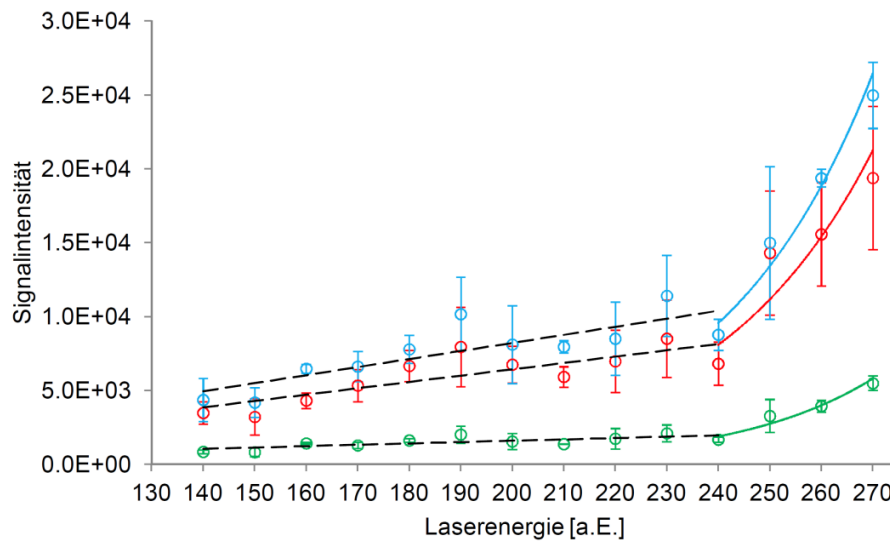


Abbildung 5: Signalintensität von CHCA-Matrixclustern bei 861,07 m/z (■), 1066,08 m/z (■) und 1.277.10 m/z (■) als Funktion der Laserenergie. Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei Wiederholungsmessungen. Die schwarzen gestrichelten Linien deuten einen linearen Anstieg der Signalintensitäten bis zur Laserenergie von 230 a.E. an, während die farbigen Linien einen "exponentiellen" Anstieg für die höheren Laserenergien bis 270 a. E. andeuten. Die eingezeichneten Funktionen sind Trendlinien und dienen zur besseren Visualisierung.

6.1.2 Massengenauigkeit und Erstellung eines Matrixfilters

Das Synapt G2-S ist mit einem oa-TOF ausgestattet. Ein bekanntes Problem bei TOF-Analysatoren ist ihre Anfälligkeit gegenüber Temperaturschwankungen. Ausgehend von einer bestimmten Anfangstemperatur, z. B. zum Zeitpunkt der Kalibrierung des Massenspektrometers, kommt es mit zunehmender Temperatur zur Expansion des TOF und damit zur Verlängerung der Flugstrecke für die Molekül-Ionen. Im Vergleich zu den Anfangsbedingungen benötigen die Ionen mehr Zeit, um den Detektor zu erreichen. Dadurch werden höhere m/z-Werte detektiert, was wiederum in einer positiven Abweichung für die Massengenauigkeit resultiert. Bei einer Abnahme der Temperatur wird aufgrund einer Kontraktion die Flugstrecke verkürzt und führt letztendlich zu einer negativen Abweichung. Für eine hohe Massengenauigkeit, ist es daher wichtig, diese Effekte zu minimieren. In der Regel wird dies über eine Klimatisierung des Labors erreicht. Zusätzlich können die Spektren auf einen internen oder externen Standard rekali­briert werden. Die Imaging Software HDI bietet bei der Prozessierung der Roh-

daten die Möglichkeit einer externen Einzelreferenzpunkt-Rekalibrierung (*Lock Mass*). Für den Fall, dass die Aufnahme eines externen Standards erforderlich ist, muss dies in der Probenpräparation berücksichtigt werden. Des Weiteren kann die Dauer einer MALDI MSI Messung wenige Minuten bis mehrere Stunden betragen, je nach Größe der zu messenden Probe und Höhe der Bildauflösung.

Aus diesem Grund wurde in einem Experiment die Stabilität der Massengenauigkeit über die Zeit überprüft. Dazu wurden sechs gleichgroße Areale (7x7 mm) auf einem mit einer GluFib/CHCA-Lösung besprühten Objektträger gemessen (siehe Kapitel 5.1.6i). Für die Aufnahme der MS1-Spektren des externen Standards (hier GluFib) wurde ein separater Bereich des Objektträgers mit derselben Lösung präpariert (Abbildung 6).



Abbildung 6: Experimenteller Aufbau für die Untersuchung der Stabilität der Massengenauigkeit.

Die Messung wurde zunächst an drei kalten Tagen mit ähnlichen Außentemperaturen durchgeführt und später an zwei wärmeren Tagen mit unterschiedlichen Außentemperaturen wiederholt. Die Prozessierung der Rohdaten mit der Software HDI erfolgte sowohl ohne als auch mit Rekalibrierung. In Abbildung 7 ist für die jeweiligen Messungen die Massengenauigkeit des GluFib-Signals bei 1.570,68 m/z als Funktion der Zeit dargestellt. Für die Messungen an den kalten Tagen (durchschnittl. -4 °C Außentemperatur) nimmt die Abweichung für den m/z-Wert ohne eine externe Rekalibrierung bis 160 min stetig zu (Abbildung 7a). Danach ist der Anstieg deutlich geringer und die Abweichung scheint gegen ein Maximum zu streben. Die maximale Abweichung in dem hier untersuchten Bereich der Messzeit beträgt $9,6 \pm 0,5$ ppm (bei 240 min, $n = 3$). Bei einer externen Rekalibrierung hingegen ändert sich die Abweichung über die gesamte Messzeit kaum und ist mit maximal $1,5 \pm 1,2$ ppm (bei 200 min, $n = 3$) deutlich geringer. Ähnliche Beobachtungen können auch für die Messungen an den wärmeren Tagen gemacht werden (Abbildung 7b). Der Unterschied zwischen der Prozessierung ohne und mit Rekalibrierung fällt jedoch wesentlich größer aus. Für erstere ist die Abweich-

ung nach 240 min bis auf 21.3 ppm (3 °C Außentemperatur) bzw. 27.1 ppm (15 °C) angestiegen. Durch eine externe Rekalibrierung ändert sich die Abweichung über die Zeit erneut nur geringfügig und beträgt maximal 1,9 ppm bzw. 2,1 ppm (jeweils bei 160 min, n = 1). Auffällig ist, dass mit zunehmender Außentemperatur die Abweichung in der gleichen Zeitspanne stärker ansteigt. Ob es einen direkten Zusammenhang mit der Außentemperatur gibt, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Unabhängig davon zeigen die Ergebnisse, dass für MALDI MSI Messungen eine externe Rekalibrierung der Rohdaten vorgenommen werden muss, um eine hohe Massengenauigkeit zu erhalten.

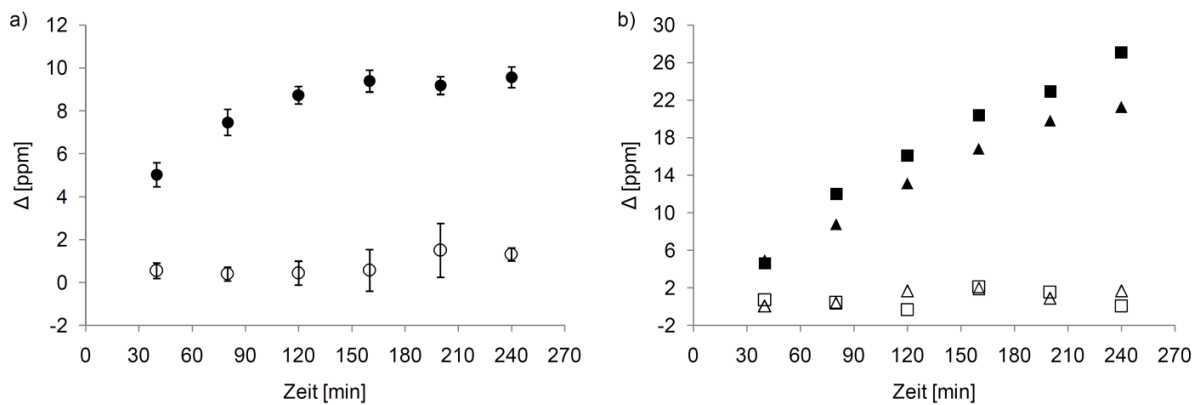


Abbildung 7: Massengenauigkeit für das GluFib-Signal bei 1.570,68 m/z als Funktion der Zeit. a) Abweichungen an kalten Tagen mit (○) und ohne (●) externe Rekalibrierung. Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei Wiederholungsmessungen und die Fehlerindikatoren repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. b) Abweichungen an zwei wärmeren Tagen mit (Δ = 3 °C, \square = 15 °C) und ohne (\blacktriangle = 3 °C, \blacksquare = 15 °C) externe Rekalibrierung. Die Messdauer einer ROI beträgt 40 min.

Des Weiteren wurden die Daten genutzt, um einen CHCA-Matrixfilter für die Auswertung der MS1-Spektren bei der Entwicklung der Probenvorbereitung von FFPE Gewebe zu erstellen (siehe Kapitel 6.2). Dazu wurden die Rohdaten mit der Software mMass unter Verwendung einer internen Rekalibrierung auf das GluFib-Signal prozessiert (siehe Kapitel 5.1.6i). Aufgrund dessen, dass es sich nicht voraussagen lässt welche und wie viele Matrixsignale tatsächlich bei Messungen auf dem Gewebe detektiert werden, sollte die Peakliste ein möglichst breites Spektrum an Matrixsignalen umfassen. Daher wurden die m/z-Werte der 500 intensivsten Matrixsignale, die für min-

destens 6 der insgesamt 30 gemessenen ROIs detektiert wurden, in die Peakliste des Filters aufgenommen.

6.1.3 Einstellung der Ionenmobilitätstrennung

Equilibrierung der IMS-Zelle

Für die Trennung der Analyten mittels Ionenmobilitätstrennung wird in die IMS-Zelle Stickstoff eingeleitet, wodurch es in diesem Bereich zu einer Erhöhung des Drucks von ca. $1,5e^{-4}$ mbar auf ca. 3 mbar kommt. Nach Angaben des Geräteherstellers (persönliche Mitteilung Alex Muck und Jonathan Fox, beide Waters Corporation), benötigt das Synapt G2-S eine gewisse Vorlaufzeit, bis sich für den Druck ein Gleichgewicht eingestellt hat und für die Messungen konstante Driftzeiten erhalten werden können.

Zur Ermittlung des Zeitpunktes, ab dem die IMS-Zelle equilibriert ist, wurde die Driftzeit des GluFib-Signals bei 1.570,68 m/z zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aktivierung des IMS-Modus in einem MALDI-IMS MS Experiment untersucht (siehe Kapitel 5.1.5ii). Dazu wurde zunächst über die ersten 2 h alle 15 min ein MS1-Spektrum für den Massenbereich 100-3.000 m/z aufgenommen und danach alle 60 min. In Abbildung 8 ist die Driftzeit als Funktion der verschiedenen Zeitpunkte dargestellt. Nach der Aktivierung des IMS-Modus nimmt die Driftzeit des GluFib-Signals zunächst zu und erreicht schließlich nach 60 min einen maximalen Wert, der sich für die weiteren Messungen nur geringfügig ändert. In den Arbeiten von Tabrizchi *et al.*¹³³ konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Druckerhöhung die Driftzeit der Analyten verlängert. Demnach ist die anfängliche Zunahme der Driftzeit wahrscheinlich auf den ansteigenden Druck in der IMS-Zelle zurückzuführen. Für die Messungen 60 min bis 720 min wurde für die Driftzeit des GluFib-Signals ein Mittelwert von $86,18 \pm 0,09$ min berechnet. Dies spiegelt sowohl die Einstellung des Druckgleichgewichts wider als auch dessen hohe Stabilität über die Zeit. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der IMS-Modus mindestens 60 min vor der eigentlichen Messung aktiviert werden muss, um über die gesamte Aufnahmezeit eines Experiments reproduzierbare Driftzeiten für die Analyten zu erhalten.

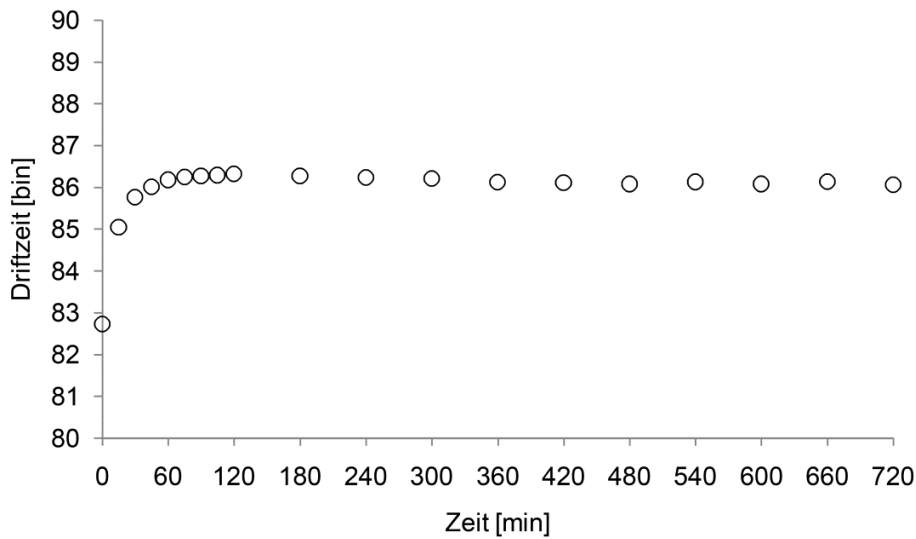


Abbildung 8: Driftzeit des GluFib-Signals bei 1.570,68 m/z als Funktion des Zeitpunktes nach Aktivierung des IMS-Modus. Die Driftzeiten wurden über die ersten 2 h alle 15 min und danach alle 60 min gemessen.

Optimierung des Trap DC Bias

Einen kritischen Schritt für Messungen im IMS-Modus stellt die Transmission der Analyt-Ionen von der *Trap*-Zelle zur IMS-Zelle (Abbildung 2, Kapitel 3.2.1) dar. Diese hat unter anderem einen großen Einfluss auf die Signalintensitäten. Während der Messung wird in dem vorderen Bereich der IMS-Zelle Helium (He-Eingangszelle) eingeleitet, um die Fragmentierung der Analyt-Ionen beim Übergang vom Vakuumbereich der *Trap*-Zelle in den Mitteldruckbereich der IMS-Zelle zu verringern. Beim Austritt aus dem IMS-Zelleneingang strömt das Gas entgegengesetzt der Ionenbewegung und wirkt somit der Transmission entgegen (Abbildung 9). Um die Transmission aufrechtzuerhalten, muss für diesen Übergangsbereich ein wesentlich höheres Potential angelegt werden als bei Messungen ohne IMS. Das Potential wird dabei über den Parameter *Trap DC Bias* in der MassLynx Software reguliert und kann zur Verbesserung der Signalintensitäten erhöht werden. Eine Erhöhung des Potentials führt jedoch auch zu stärkeren Kollisionen der Analyten mit den Heliumatomen, wodurch es vermehrt zur Fragmentierung kommen kann.

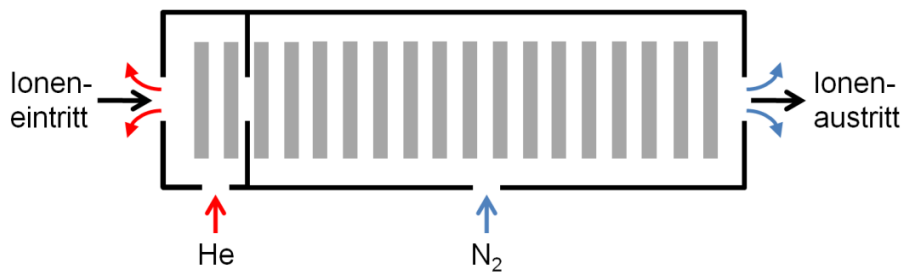


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ionenbewegung und der Gasströme in der IMS-Zelle.

In einem MALDI-IMS MS Experiment sollte daher der *Trap DC Bias* so eingestellt werden, dass für Peptidmessungen möglichst hohe Signalintensitäten erhalten werden können. Dazu wurden MS1-Spektren eines Peptidgemisches (siehe Kapitel 5.1.5ii) in dem Massenbereich 100-3.000 m/z bei unterschiedlichen Potentialen aufgenommen. In Abbildung 10 sind die Signalintensitäten für die m/z -Werte ausgewählter tryptischer Peptide von ApoAI und VTN als Funktion des Trap DC Bias dargestellt. Generell kann für alle m/z -Werte ein ähnliches Verhalten bei einer Erhöhung des Potentials beobachtet werden. Die Signalintensität steigt zunächst an und erreicht schließlich ein Maximum. Danach fällt sie wieder bis auf einen bestimmten Wert ab und bleibt bei weiterer Erhöhung annähernd konstant. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass sich mit der Eintragung der Ionen und deren Fragmentierung zwei gegenläufige Prozesse überlagern. Beide stehen in einem gewissen Verhältnis zueinander, das sich mit der Erhöhung des Trap DC Bias zu verändern scheint. Während ersterer zu einer Zunahme der Signalintensität führt, resultiert letzterer in einer Intensitätsabnahme. Bis zum Erreichen des Intensitätsmaximums überwiegt demnach der Effekt des erhöhten Ioneneintrags und anschließend der Effekt der vermehrt auftretenden Fragmentierung. Ab einem bestimmten Potential nehmen beide Prozesse gleichermaßen zu, so dass sich die Signalintensität nicht mehr ändert. Diese Hypothese wurde jedoch im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht.

Des Weiteren kann aus Abbildung 10 entnommen werden, dass für den Großteil der Peptide das Maximum bei ca. 70 V durchlaufen wird. Im Gegensatz dazu wird für das VTN-Peptid bei 2652,18 m/z erst ab 70 V ein auswertbares Signal detektiert. Dies kann mit Hilfe der IMS-Theorie erklärt werden, wonach größere Moleküle aufgrund einer größeren CCS stärker durch Kollisionen mit dem Driftgas zurückgehalten werden (siehe

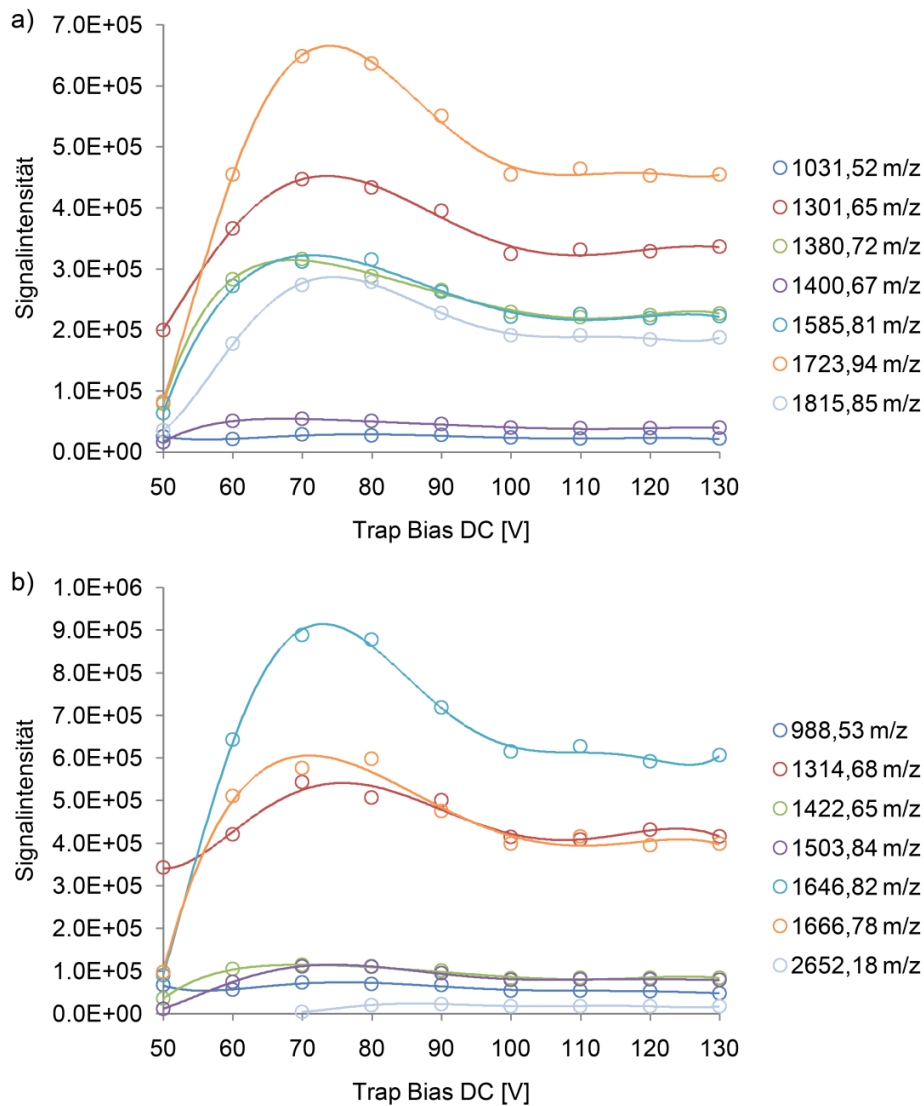


Abbildung 10: Signalintensitäten als Funktion des Trap DC Bias. a) Intensitätsverlauf der m/z-Werte von tryptischen ApoAI-Peptiden. b) Intensitätsverlauf der m/z-Werte von tryptischen VTN-Peptiden. Die eingezeichneten Funktionen sind Trendlinien und dienen zur besseren Visualisierung.

Kapitel 3.2.2). Analog dazu kommt es bei größeren Peptiden vermehrt zu Kollisionen mit den Heliumatomen am Zelleneingang. Folglich werden diese stärker am Übergang gehindert und benötigen ein höheres Potential, damit es zu einem messbaren Eintrag in die IMS-Zelle kommt. Ferner wurde für das VTN-Peptid ein Intensitätsmaximum bei 90 V erhalten, wohingegen es bei diesem Potential für die anderen Peptide bereits zu einer stärkeren Intensitätsabnahme kommt. Ausgehend davon, dass das beobachtete Verhalten des VTN-Peptids repräsentativ für m/z-Werte >2.000 ist, wurde bei den

späteren Messungen im Massenbereich 100-3.000 m/z ein Potential von 80 V gewählt. Dieser Wert stellt einen Kompromiss für die maximale Signalintensität aller Peptidmassen dar. Für Messungen im Massenbereich 100-2.000 m/z wurde hingegen aufgrund der beobachteten Intensitätsmaxima ein *Trap DC Bias* von 70 V verwendet.

Optimierung der IMS-Wellengeschwindigkeit

Die Trennung der Analyten kann generell über die drei Parameter Wellengeschwindigkeit (*Wave Velocity*, WV), Wellenhöhe (*Wave Height*, WH) und Druck des Driftgases optimiert werden. Dabei werden die Einstellungen so vorgenommen, dass die Analyten über den gesamten Driftzeitbereich verteilt sind.^{105, 134} Nach Angaben des Geräteherstellers ist der Druck mit ca. 3 mbar für die meisten Anwendungen bereits optimal eingestellt (persönliche Mitteilung Alex Muck und Ian Edwards, beide Waters Corporation). Des Weiteren wird für die Wellenhöhe der Maximalwert von 40 V empfohlen, um die höchste Auflösung zu ermöglichen. Demnach stellt beim Synapt G2-S die Wellengeschwindigkeit den wichtigsten Parameter für die Optimierung der Trennung dar.

In einem MALDI-IMS MS Experiment sollte daher die Wellengeschwindigkeit so eingestellt werden, dass für Peptidmessungen eine möglichst hohe Trennung der Peptide erhalten werden kann. Dazu wurden MS1-Spektren eines Peptidgemisches (siehe Kapitel 5.1.5ii) für die zwei Massenbereiche 100-3.000 m/z und 100-2.000 m/z bei unterschiedlichen Wellengeschwindigkeiten aufgenommen und die Verteilung der tryptischen Peptide von ApoA1 und VTN über den Driftzeitbereich untersucht. In Abbildung 11 sind die entsprechenden 1D (*mobility plot*) und 2D Mobilogramme (*mass-mobility plot*) für den Massenbereich 100-3.000 m/z dargestellt. Aus beiden Darstellungen lässt sich entnehmen, dass die Peptide für alle vier untersuchten WV-Werte über den gesamten Driftzeitbereich (0 - 200 bin) verteilt sind und somit prinzipiell eine Trennung gewährleistet ist. Mit zunehmender Wellengeschwindigkeit verschiebt sich jedoch das Verteilungsprofil im 1D Mobilogramm zu längeren Driftzeiten, da die Analyten aufgrund vermehrter *Roll-Over* Effekte (siehe Kapitel 3.1.2) die IMS-Zelle langsamer

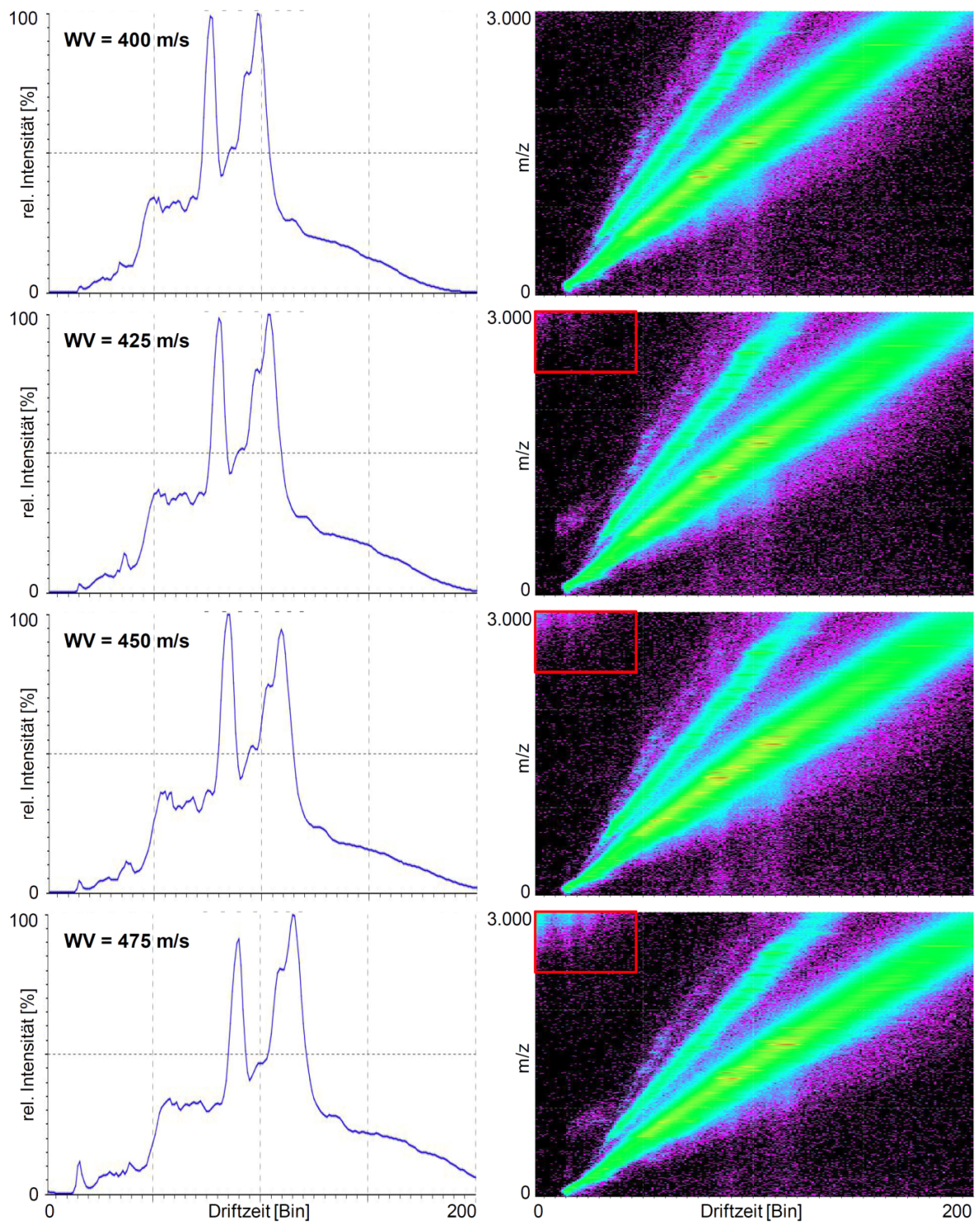


Abbildung 11: Verteilung der Peptide über den Driftzeitbereich für den Massenbereich 100-3.000 m/z. 1D Mobilogramme (links) zeigen das Verteilungsprofil über den Driftzeitbereich. 2D Mobilogramme (rechts) zeigen bei welcher Driftzeit welche m/z-Werte detektiert werden. Die eingezeichneten roten Rechtecke verdeutlichen den Bereich, in dem ein Carry-Over Effekt beobachtet werden kann.

passieren. Für WV-Werte ≥ 450 m/s sinkt die relative Intensitätskurve bei 200 Bin nicht mehr auf 0 % ab. Dies ist ein Indiz für den sogenannten *Carry-Over* Effekt. Das bedeutet, dass Ionen geringer Mobilität den *Pusher*-Bereich des oa-TOF-Analysators noch nicht erreicht haben, bevor ein neues Ionen-Paket aus der *Trap*-Zelle in die IMS-Zelle eingetragen wird. Folglich werden diese Ionen im niedrigen Driftzeitbereich detek-

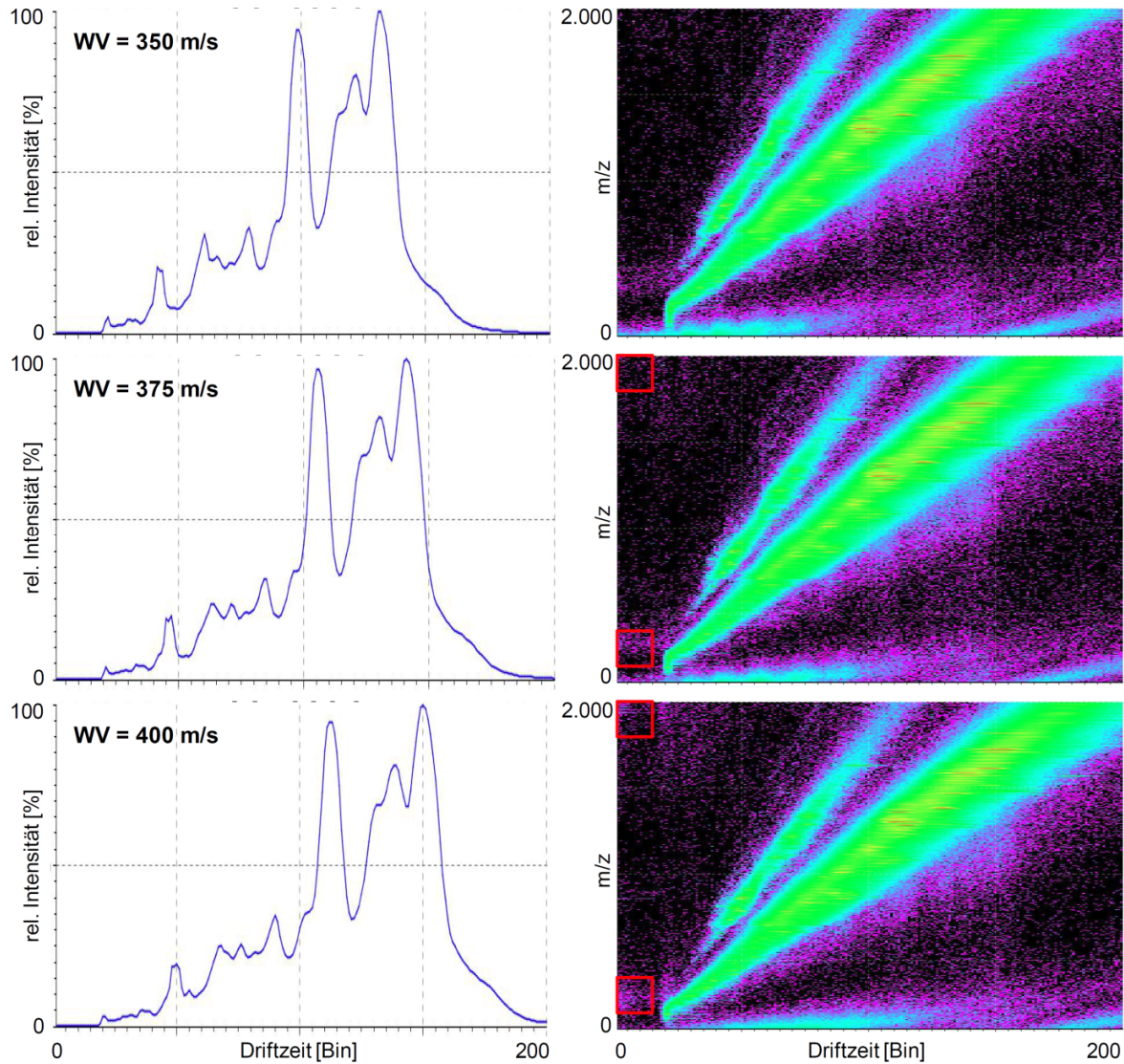


Abbildung 12: Verteilung der Peptide über den Driftzeitbereich für den Massenbereich 100-2.000 m/z. 1D Mobilogramme (links) zeigen das Verteilungsprofil über den Driftzeitbereich. 2D Mobilogramme (rechts) zeigen bei welcher Driftzeit welche m/z-Werte detektiert werden. Die eingezeichneten roten Rechtecke verdeutlichen den Bereich, in dem ein Carry-Over Effekt beobachtet werden kann.

tiert. Aus den 2D Mobilogrammen lässt sich entnehmen, dass ein *Carry-Over* Effekt bereits bei $WV = 425$ m/s auftritt. Aufgrund dessen wurde für die Messungen im Massenbereich 100-3.000 m/z eine Wellengeschwindigkeit von 400 m/s gewählt. Für den Massenbereich 100-2.000 m/z kommt es bei diesem WV-Wert zu einem *Carry-Over* Effekt (Abbildung 12). Der Grund hierfür ist, dass für den kleineren Massenbereich von der Software eine höhere *Pusher*-Frequenz eingestellt wird. Dadurch verkürzt sich die Dauer eines IMS-Zyklus¹⁰¹ (Zeitspanne zwischen dem Eintrag zwei aufeinanderfolgender Ionen-Pakete) und die Ionen geringer Mobilität erreichen in diesem Zeitfenster den *Pusher*-Bereich nicht mehr. Aus den 2D Mobilogrammen geht hervor, dass die Wellengeschwindigkeit für Messungen in diesem Massenbereich auf 350 m/s reduziert werden muss, um einen *Carry-Over* Effekt zu vermeiden.

6.1.4 Vergleich von MALDI MS und MALDI-IMS MS

Ein generelles Problem klassischer IMS-Driftzellen ist die geringe Sensitivität aufgrund eines niedrigen *Duty Cycle* und radialer Diffusion der Ionen.^{101, 135} Ersteres ist auf die Eintragung einzelner Ionen-Pakete in den IMS-Bereich zurückzuführen. Während sich ein Ionen-Paket im IMS-Bereich befindet, gehen die am IMS-Eingang ankommenden Ionen verloren. Dies hat zur Folge, dass nur ein sehr geringer Anteil der erzeugten Ionen transmittiert wird. Des Weiteren diffundiert ein Teil der Ionen auf ihrem Weg durch den IMS-Bereich über den Durchmesser der Eingangslinse des Massenanalysators hinaus und wird somit nicht detektiert. Mit der im Synapt G2-S verwendeten *Travelling Wave* Technologie werden diese Effekte reduziert und die Transmissionseffizienz gesteigert.¹⁰¹ Einerseits wird durch die Ionen-Akkumulation in der *Trap*-Zelle vor der IMS-Zelle ein höherer *Duty Cycle* erzielt.¹⁰³ Auf der anderen Seite führt die am SRIG anliegende hochfrequente Wechselspannung zu einer besseren Fokussierung der Ionen-Pakete.¹⁰⁵ Pringle *et al.*¹⁰¹ konnte in einem ESI-IMS MS/MS Experiment zeigen, dass für Konzentrationen, die üblich für MS Messungen ohne IMS sind, gute Signalintensitäten erhalten werden können. Ferner wurde geschlossen, dass die Sensitivität durch den IMS-Modus nicht beeinträchtigt wird. Diese Aussage ist jedoch fraglich, da keine direkten Vergleichsmessungen durchgeführt wurden.

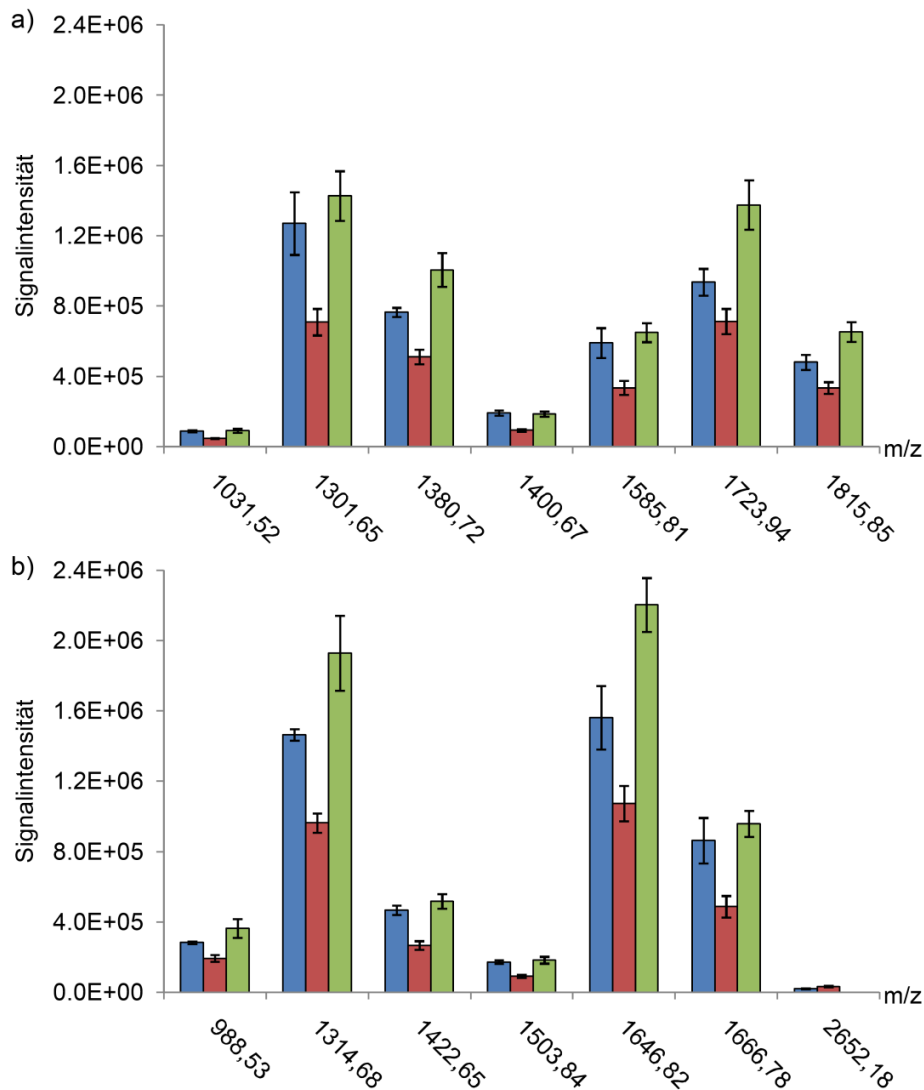


Abbildung 13: Vergleich der Sensitivität unterschiedlicher Aufnahmemodi. Dargestellt sind die Signalintensitäten ausgewählter tryptischer Peptide von a) ApoAI und b) VTN für den Massenbereich 100-3.000 m/z ohne IMS (■) und mit IMS (■) sowie für den Massenbereich 100-2.000 m/z mit IMS (■). Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei Wiederholungsmessungen und die Fehlerindikatoren repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

In einem MALDI MS Experiment wurde daher der Einfluss des IMS-Modus auf die Signalintensität untersucht. Dazu wurden MS1-Spektren eines Peptidgemisches (siehe Kapitel 5.1.5ii) in dem Massenbereich 100-3.000 m/z sowohl mit als auch ohne IMS aufgenommen. In Abbildung 13 sind die erhaltenen Signalintensitäten ausgewählter tryptischer Peptide von ApoAI und VTN für die beiden Aufnahmemodi gegenübergestellt. Bei den Messungen im IMS-Modus kann für alle Peptidmassen eine signifi-

kante Abnahme der Signalintensität um 23-47 % beobachtet werden. Im Gegensatz dazu nimmt die Signalintensität des VTN-Peptids bei 2652,18 m/z um ca. 53 % zu. Dies steht im Widerspruch zu der Theorie, dass die IMS zu keiner Erhöhung der Signalintensität führen kann, da sie erst nach dem Ionisationsprozess stattfindet.¹⁰³ Demnach muss die Transmissioneffizienz für dieses Peptid im IMS-Modus höher sein als bei der normalen MS Messung. Der Grund dafür wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Wie sich in den späteren MSI Experimenten herausstellen soll (siehe Kapitel 6.4), werden oberhalb von 2.000 m/z keine relevanten Signale detektiert, so dass der aufzunehmende Massenbereich auf 100-2.000 m/z reduziert werden kann. Wie der Grafik in Abbildung 13 zu entnehmen ist, nimmt dadurch die Signalintensität aller Peptidmassen zu. Dieses Ergebnis lässt sich in erster Linie mit der höheren Pusher-Frequenz und den damit verbundenen kürzeren IMS-Zyklen erklären. Im Vergleich zum Massenbereich 100-3.000 m/z werden somit in der gleichen Scanzeit (1 s) mehr der erzeugten Ionen zum Massenanalysator transmittiert. Zusätzlich wurde der Trap DC Bias von 80 V auf 70 V reduziert und trägt, wie im vorherigen Kapitel 6.1.3 gezeigt, ebenfalls zu einer Erhöhung der Signalintensität bei. Des Weiteren kann aus Abbildung 13 entnommen werden, dass die erhalten Signalintensitäten die der Messung über den Massenbereich 100-3.000 m/z ohne IMS sogar um 2-47 % übersteigen mit Ausnahme des ApoAI-Peptids bei 1.400,67 m/z, das eine ca. 3 % geringere Signalintensität besitzt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es durch den IMS-Modus im Allgemeinen zu einem Verlust der Signalintensität kommt und widerlegt die von Pringle *et al.*¹⁰¹ aufgestellte Schlussfolgerung. Ferner kann durch eine Reduzierung des zu messenden Massenbereichs der *Duty Cycle* erhöht und somit die Signalintensität verbessert werden.

6.2 Etablierung der Probenvorbereitung

In MALDI MSI ist die Probenvorbereitung für die Analyse von Proteinen und Peptiden ein sehr komplexer Prozess, der einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Messergebnisse hat. Dieser beginnt bereits mit der Entnahme des Gewebes und der anschließenden Konservierung, um sowohl die Morphologie (= feingewebliche Struktur) zu erhalten als auch den enzymatischen Abbau der Proteine zu verhindern. Die Proben werden dazu entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Frischgewebe) oder mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE Gewebe). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit FFPE Gewebe gearbeitet, so dass hier auf die Präparation des Frischgewebes nicht näher eingegangen werden soll.

In einem ersten Schritt werden die Schnitte mit Xylol gewaschen, um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe zu entfernen, da sonst die Ionisation der Analyten unterdrückt werden würde.⁹⁹ Die anschließende Rehydrierung erfolgt über eine Alkoholreihe mit absteigender EtOH-Konzentration bis hin zum Wasser. In der Regel werden dafür bereits etablierte Protokolle aus der Immunhistochemie angewendet.^{118, 136}

Während des Fixierungsprozesses reagiert Formaldehyd mit den Seitenketten der Aminosäuren Arginin, Asparagin, Glutamin, Histidin, Lysin, Serin, Tryptophan und Tyrosin unter Ausbildung von Methylenbrückenbindungen.¹³⁷ Dies resultiert in unlöslichen intra- und intermolekularen Quervernetzungen der Proteine, so dass die Analyse von intakten Proteinen, im Gegensatz zu Frischgewebe¹³⁸, nicht möglich ist. Die Proben werden daher einer Hitze-induzierten Antigendemaskierung (HIAR = *Heat-induced Antigen Retrieval*) unterzogen gefolgt von einem enzymatischen Verdau. HIAR ist eine Methode aus der IHC, mit der die Proteine denaturiert und die Methylenbrückenbindungen hydrolytisch gespalten werden.^{137, 139} Dadurch ergibt sich eine leichtere Zugänglichkeit der proteolytischen Spaltstellen für die Proteasen, wodurch die Effizienz des enzymatischen Verdau gesteigert wird.¹⁴⁰

Bei letzterem wird auf den Gewebeschnitt eine Enzymlösung aufgetragen. In MSI Experimenten ist die Verwendung von Trypsin am weitesten verbreitet, auch wenn der Einsatz anderer Endopeptidasen, wie Chymotrypsin¹⁴¹, Elastase und Pepsin¹⁴², erfolgreich demonstriert werden konnte. Während des Verdau werden die Proben bei Temperaturen zwischen Raumtemperatur und 37 °C in einer feuchten Atmosphäre

inkubiert.⁹⁹ In Abhängigkeit des zu analysierenden Gewebe kann die Dauer der Inkubation 15 min bis mehrere Stunden (über Nacht) betragen.¹⁴³ Für den Verdau von FFPE Gewebe werden Enzymlösungen mit 20-100 µg/mL Trypsin gelöst in einem Ammoniumbicarbonat-Puffer (ABC-Puffer) mit bis zu 10 % ACN verwendet.

Abschließend wird auf die Probe eine Matrixlösung aufgebracht, um die tryptischen Peptide aus dem Gewebe zu extrahieren und diese durch Kokristallisation in der Matrix einzuschließen. In MALDI MSI finden Sinapinsäure (SA = *Sinapinic Acid*), α -Cyano-4-hydroxycinnamsäure (CHCA = *α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid*) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB = *2,5-Dihydroxybenzoic Acid*) 2,5-Dihydroxybenzoesäure am meisten Anwendung. Die Wahl der Matrix richtet sich dabei nach den zu untersuchenden Analyten. Während sich CHCA besonders für die Analyse von Peptiden eignet, wird SA häufig für Proteine und DHB für Lipide eingesetzt.¹³⁶ Für die Peptidanalyse werden Matrixlösungen mit 5-20 µg/mL CHCA gelöst in ACN, MeOH oder EtOH mit einem Zusatz von 0,1-0,5 % Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt.¹⁴³

Die Auftragung der Enzym- und Matrixlösung kann entweder mit einem *Spotter* oder Sprühroboter erfolgen. Dabei sollte die Oberfläche des Gewebes nicht zu feucht werden, da es sonst zu einer Migration der Analyten kommt. Andererseits führt bei der Matrixauftragung eine geringere Feuchtigkeit zu einer weniger effizienten Extraktion und letztendlich zu geringeren Signalintensitäten. Für die Auftragung muss daher ein Kompromiss aus maximaler Extraktion und minimaler Delokalisation der Analyten gewählt werden. Bei einem *Spotter* werden kleine Tropfen an definierten Positionen eines x,y-Rasters aufgetragen.¹⁴⁴ Einerseits wird dadurch die Migration auf die Tropfengröße beschränkt, doch ist andererseits die Auflösung der Peptidbilder auf den Abstand der Tropfen limitiert. Beim Sprühen hingegen wird die gesamte Oberfläche des Gewebes homogen bedeckt, so dass der räumlichen Auflösung theoretisch keine Grenzen gesetzt sind. Sie hängt stattdessen von dem Ausmaß der Migration und der Größe des Laserfokus ab.⁹⁹

Zusammengefasst zeigt dies, dass für die Probenvorbereitung kein universelles Protokoll existiert. Stattdessen müssen in Abhängigkeit der analytischen Fragestellung sowie der verwendeten Gerätetechnik entsprechende Anpassungen und Optimierungen vorgenommen werden.

6.2.1 Experimentelle und analytische Strategie

In MALDI MSI Experimenten sind eine hohe Spektrenqualität sowie eine geringe Delokalisation der Analyten ausschlaggebend für eine gute Bildqualität. Beide Faktoren werden maßgeblich durch die Probenpräparation beeinflusst. Eine Verbesserung des einen führt jedoch im Allgemeinen zu einer Beeinträchtigung des anderen. Für die Entwicklung der Probenvorbereitung wurde deshalb eine Strategie verfolgt, bei der zunächst die Spektrenqualität maximiert und anschließend die Delokalisation der Analyten minimiert werden sollte.

Um den Einfluss der unterschiedlichen Probenpräparationen auf die Bildqualität zu untersuchen, wurden die Proben sowohl mit MALDI MSI als auch MALDI MSIP (MSIP = *mass spectrometry imaging profiling*), analysiert (Abbildung 14). In den klassischen MALDI MSI Experimenten wurde entweder der gesamte Gewebeschnitt oder ein größerer Ausschnitt mit charakteristischen Amyloidablagerungen gemessen, um zu kontrollieren inwiefern bei der jeweiligen Probenvorbereitung eine Migration der Peptide stattgefunden hat. In den *Profiling* Experimenten wurden dagegen drei kleine ausgewählte ROIs des Gewebes mit unterschiedlichem Amyloidanteil mittels MALDI MSI gemessen, um die Auswirkung auf die Spektrenqualität zu ermitteln. Dabei wurden die aufsummierten MS1-Spektren der jeweiligen ROI anhand der Anzahl detektierter Peptidsignale sowie Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse ausgewählter Peptidmassen miteinander verglichen. Da die Spektren bei MALDI MSI Messungen aufgrund ihrer Komplexität ein hohes chemisches Rauschen besitzen, wurde als Detektionsgrenze $S/N = 3$ definiert. Auf die erhaltenen Peaklisten wurde sowohl ein Trypsinfilter (vordefiniert in mMass) als auch ein CHCA-Matrixfilter (siehe Kapitel 6.1.2) angewendet, damit in die Zählung ausschließlich Peptidsignale einfließen. Für die Beurteilung, ob sich ein geänderter Parameter der Probenvorbereitung positiv oder negativ auf die Spektrenqualität ausgewirkt hat, musste für mindestens zwei ROIs die gleiche Tendenz erkennbar sein.

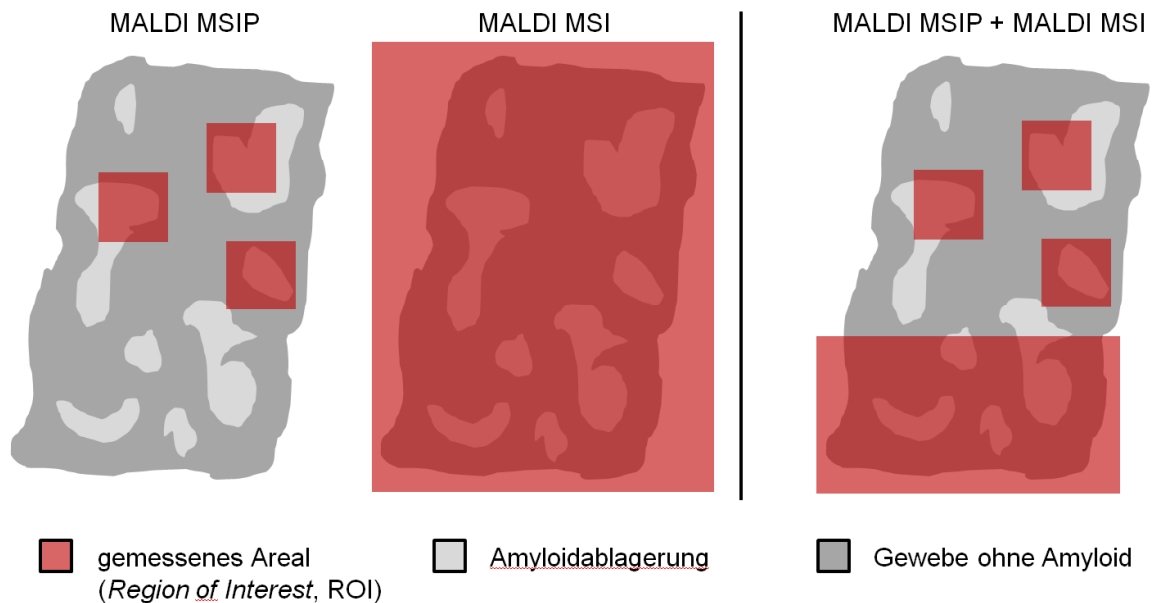


Abbildung 14: Experimenteller Aufbau für die Entwicklung der Probenvorbereitung. Für Methode A wurden MALDI MSIP und MALDI MSI Messungen separat durchgeführt (links) und für Methode B parallel (rechts).

Prinzipiell können auch die MS1-Spektren der klassischen MALDI MSI Messungen für den Vergleich der Spektrenqualität herangezogen werden, wie in den Arbeiten von De Sio *et al.*¹⁴⁵ gezeigt wurde. Die MALDI MSIP Methode hat jedoch einige wesentliche Vorteile. Einerseits wird durch die Aufnahme mehrerer kleiner Areale anstelle des gesamten Gewebeschnitts die Messzeit erheblich verkürzt. Des Weiteren werden für die Auswertung drei MS1-Spektren statt eines einzelnen Spektrums genutzt, wodurch das Risiko einer Fehlinterpretation der Messergebnisse minimiert wird. Der Hintergrund ist, dass sich bei der Herstellung der Präparate mit zunehmender Schnitttiefe des Gewebeblocks die Morphologie ändert. Die damit einhergehende Änderung der Proteinzusammensetzung könnte dazu führen, dass der Einfluss der unterschiedlichen Probenvorbereitungen auf die Spektrenqualität unterdrückt wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Proteinzusammensetzung für alle drei ROIs gleichermaßen variiert, ist jedoch äußerst gering. Daher kann mit höherer Sicherheit eine Aussage getroffen werden, ob eine Änderung der Spektrenqualität auf die geänderte Probenvorbereitung zurückzuführen ist. Zusätzlich wurden für die Vergleichsmessungen Serienschnitte verwendet, um das Ausmaß dieser Effekte auf ein Minimum zu reduzieren.

Für die Evaluierung der Probenvorbereitung wurde aus dem Amyloid Register Kiel FFPE Lebergewebe einer 68-jährigen Patienten mit hereditärer AApoAI Amyloidose ausgewählt. Dieser Fall besitzt räumlich klar definierte Amyloidablagerungen, die sich als transparente Plaques in dem Gewebe bereits ohne mikroskopische Betrachtung erkennen lassen. Daher kann bei der Auswahl geeigneter ROIs und bei der Kontrolle der Delokalisation auf einen immunhistochemisch gefärbten Serienschnitt verzichtet werden, wodurch sich die experimentelle Durchführung erheblich vereinfacht.

6.2.2 Entwicklung der Probenvorbereitungsmethoden A und B

Die Probenvorbereitung von FFPE Gewebeschnitten für die Protein- und Peptidanalytik umfasst die vier Schritte Entparaffinierung/Rehydrierung, Hitze-induzierte Antigen-demaskierung, enzymatischer Verdau und Matrixauftragung (siehe Kapitel 6.2). Dabei haben die letzteren beiden den größten Einfluss auf die Spektrenqualität und Delokalisation der Analyten. Die Auftragung der Reagenzien erfolgte in dieser Arbeit für beide Schritte mit dem Sprühroboter der Firma SunChrom. Daraus ergeben sich eine Vielzahl an Parametern, über die die Probenvorbereitung optimiert werden kann. Wie in Abbildung 15 dargestellt, können diese in die drei Kategorien Sprühroboter, Verdau und Matrix unterteilt werden und hängen darüber hinaus voneinander ab. Eine Erhöhung der Flussrate des Sprühroboters ermöglicht beispielsweise bei der Matrixauftragung eine vermehrte Extraktion der Analyten, da mehr Lösungsmittel aufgetragen wird und somit die Oberfläche des Gewebes länger feucht bleibt. Auf der anderen Seite wird dadurch auch die Menge an aufgetragener Matrix erhöht. Da sich das Matrix-zu-Analyt-Verhältnis auf die Spektrenqualität auswirkt, muss gegebenenfalls die Matrixkonzentration zusätzlich angepasst werden. Eine andere Möglichkeit wäre, die Flussrate bei der Auftragung des Enzyms ebenfalls zu erhöhen. Dies ermöglicht ein vermehrtes Eindringen des Enzyms in das Gewebe und erhöht gleichzeitig die Menge an aufgetragenem Enzym. Dadurch kann die Effizienz des Verdau gesteigert werden und führt letztendlich auch zu einer Änderung des Matrix-zu-Analyt-Verhältnisses. Des Weiteren ist zu beachten, dass mit zunehmender Feuchtigkeit des Gewebes das Risiko einer Migration der Analyten steigt.

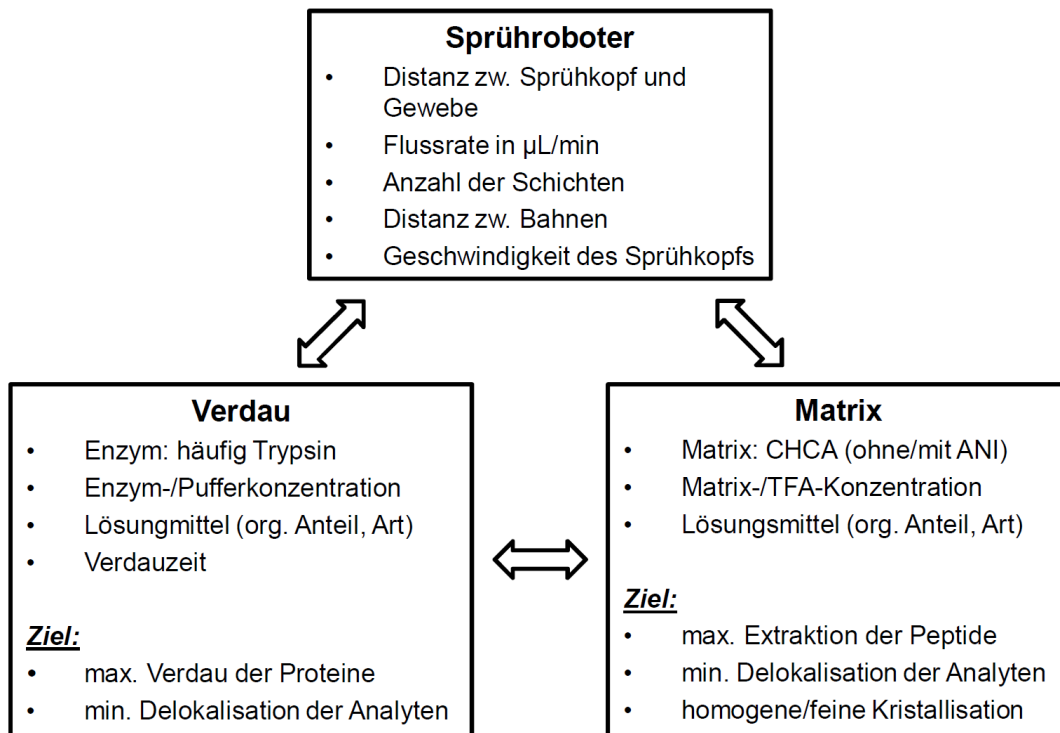
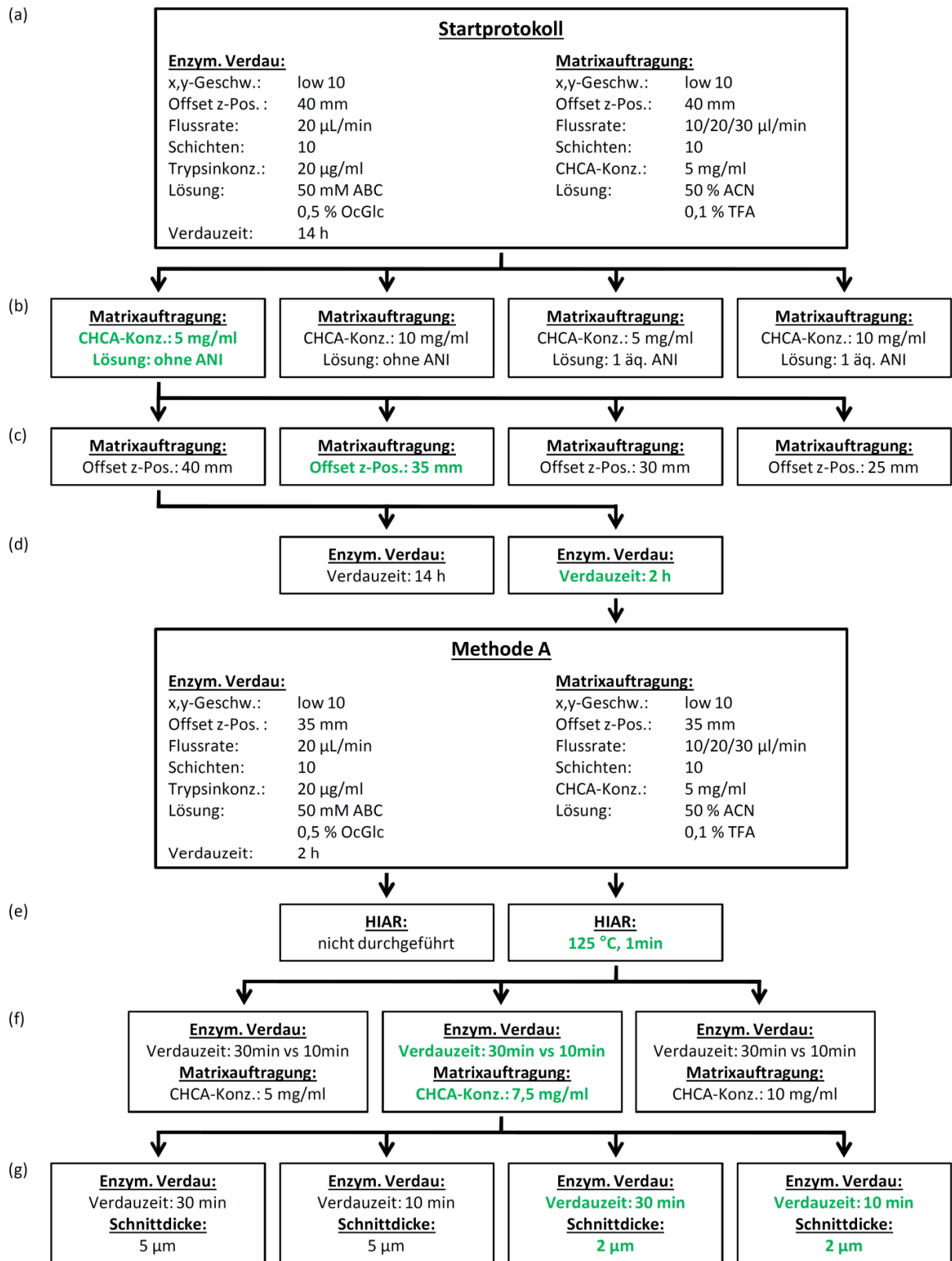
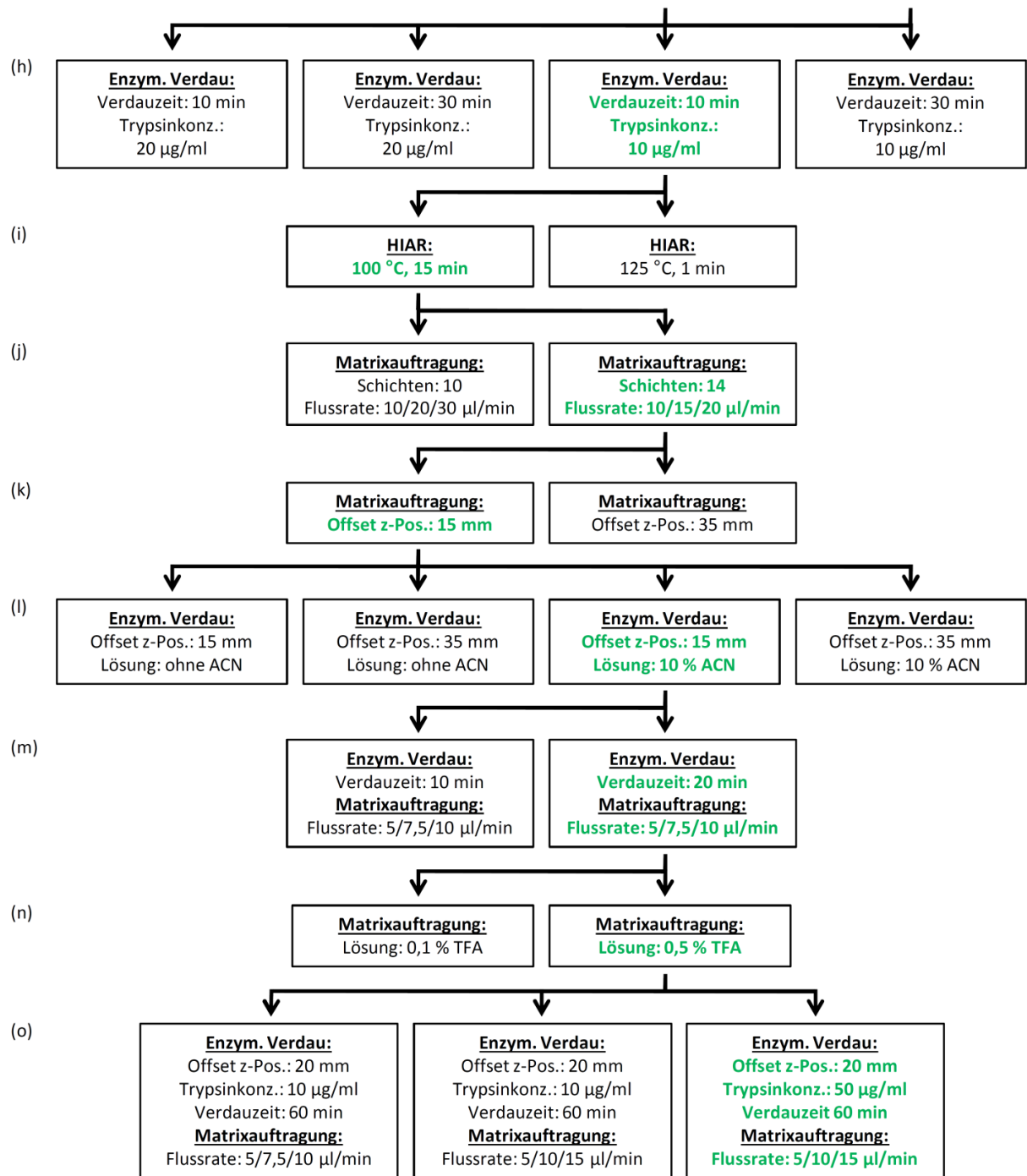


Abbildung 15: Übersicht der verschiedenen Parameter zur Variation der Probenvorbereitung unterteilt in die drei Kategorien Sprühroboter, Verdau und Matrix. Die Doppelpfeile zeigen an, dass sich eine Änderung des einen Parameters gleichzeitig auf einen anderen auswirkt.

In diesem Kapitel soll die Entwicklung der Probenvorbereitungsmethoden A und B erläutert werden. Aufgrund der eben angedeuteten komplexen Zusammenhänge lässt sich nur schwer voraussagen, wie und in welchem Ausmaß sich eine Änderung auf die Messergebnisse auswirken wird. Daher beruhte die Entwicklung im Allgemeinen auf Versuch und Irrtum. Für eine bessere Nachvollziehbarkeit, ist in Abbildung 16 der Entwicklungsverlauf in einer Übersicht zusammengefasst dargestellt.





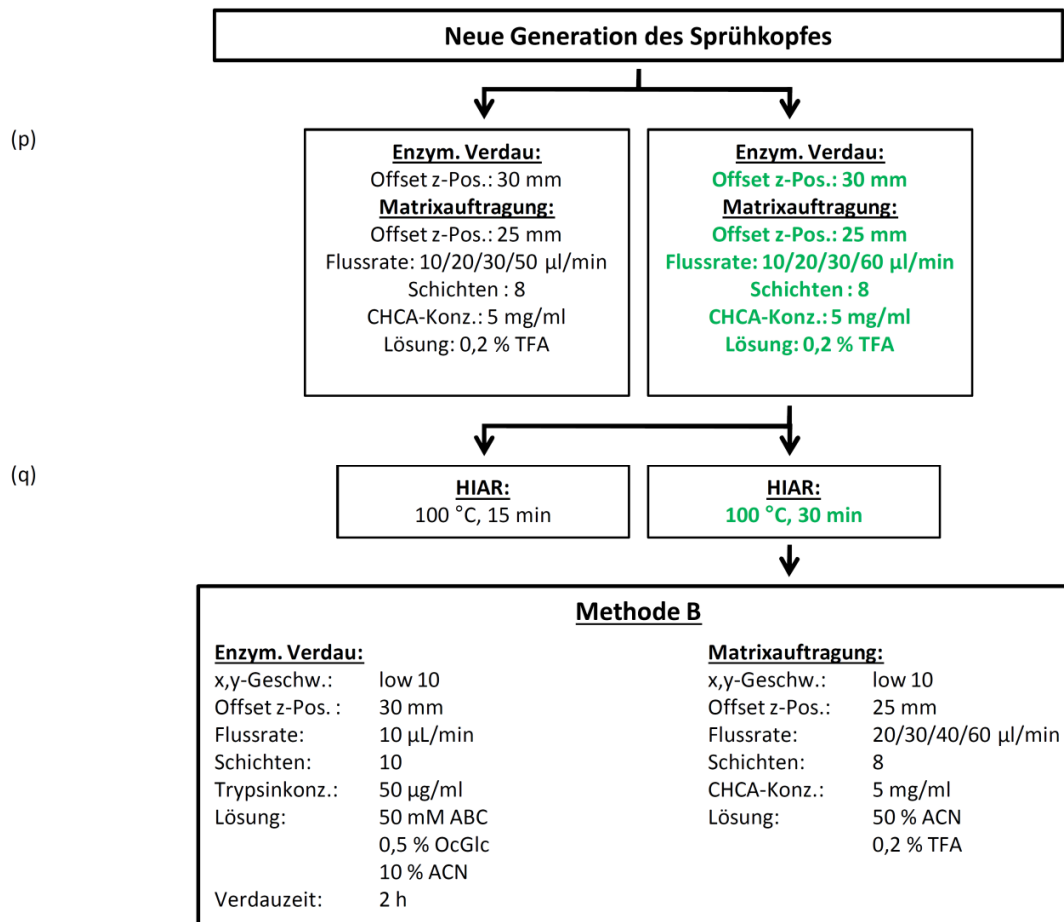


Abbildung 16: Entwicklungsverlauf der Probenvorbereitungsmethoden A und B. Veränderungen der Probenvorbereitung, die zu einer Verbesserung der Spektrenqualität und/oder zu einer Reduzierung der Delokalisierung führten, wurden für das jeweilige folgende Experimente übernommen (grün).

Entwicklung der Methode A

Für die Entparaffinierung und Rehydrierung wurde ein am Institut für Pathologie Kiel etabliertes Protokoll verwendet. Des Weiteren wurde auf den Schritt der Hitze-induzierten Antigendemaskierung zunächst verzichtet, da für Amyloide angenommen wird, dass sie während des Fixierungsprozesses keine Quervernetzungen ausbilden.⁵⁹ Im Folgenden wurden daher der enzymatische Verdau und die Matrixauftragung optimiert.

(a) Test des Inkubationssystems

Zu Beginn dieser Arbeit existierte in der Literatur nur ein Protokoll für die Probenvorbereitung von FFPE Gewebe, in dem der Sprühroboter der Firma SunChrom verwendet wurde.^{88, 118} Zudem sind die darin enthaltenen Angaben für die Einstellungen des Sprühroboters unvollständig. Aus diesem Grund wurde ein von den Geräteherstellern empfohlenes Protokoll (persönliche Mitteilung Emmanuelle Claude und Dominik Bäumlisberger, Waters bzw. SunChrom) in leicht abgewandelter Form als Startprotokoll übernommen (Abbildung 16). Des Weiteren benutzt jedes Labor ein selbstentwickeltes Inkubationssystem für den enzymatischen Verdau. Daher wurde zunächst das hier verwendete System auf seine Eignung überprüft.

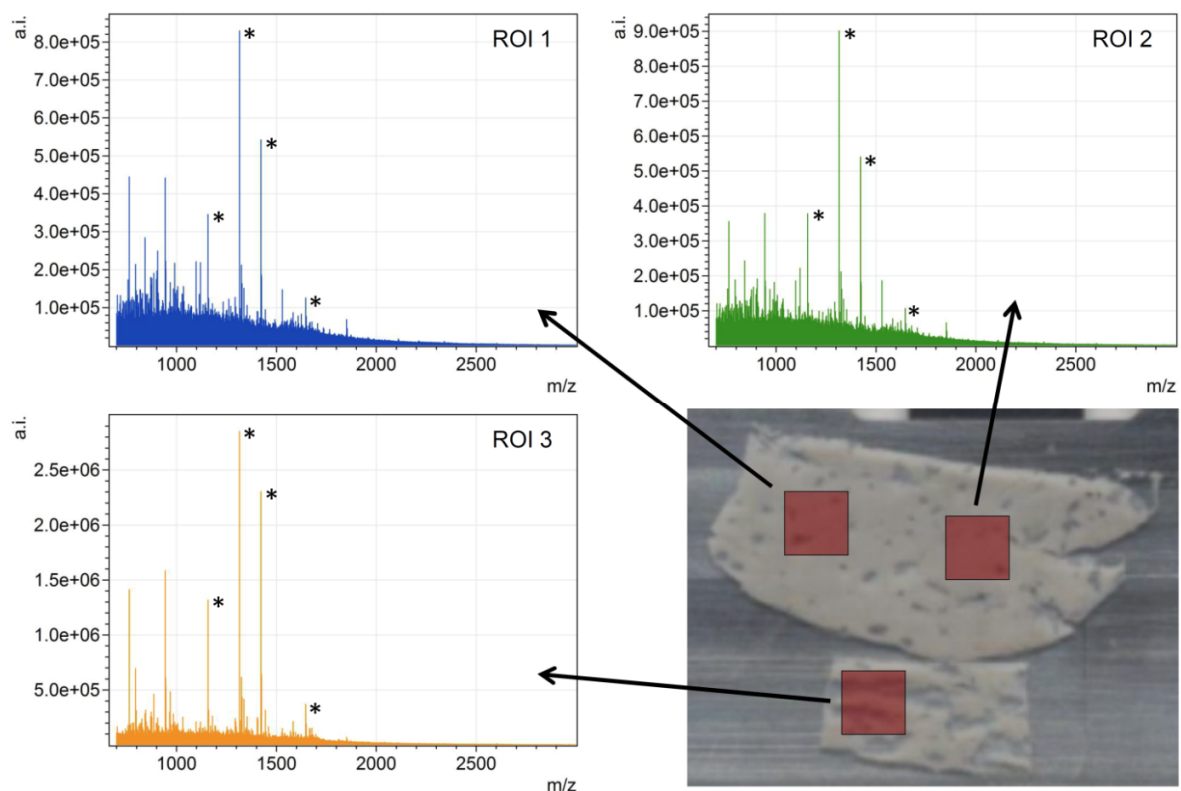


Abbildung 17: Test des Inkubationssystems mittels MALDI MSIP Messungen. Die aufsummierten MS1-Spektren der gemessenen ROIs zeigen eine Signalverteilung typisch für einen tryptischen Verdau. Die Peptidmassen 1.158,58 m/z, 1.314,68 m/z, 1.422,65 m/z und 1.646,82 m/z für alle drei ROIs mit hohen Intensitäten detektiert (Asterisk).

In den MSIP Messungen wurden für alle drei ROIs MS1-Spektren mit einer Signalverteilung typisch für einen tryptischen Verdau¹⁴⁶ erhalten (Abbildung 17). Das Inkubationssystem hat demnach funktioniert und konnte für den enzymatischen Verdau genutzt werden. Bei weiterer Betrachtung der Spektren fällt auf, dass im Massenbereich 1.000-2.000 m/z vier intensive Signale mit den Massen 1.158,58 m/z, 1314,68 m/z, 1.422,65 m/z und 1.646,82 m/z detektiert wurden. Da sich in den zugehörigen Peptidbildern auch höhere Signalintensitäten in den Amyloidablagerungen zeigten, wurden diese Peptidmassen für die Bewertung der Spektrenqualität ausgewählt. Wie sich später herausstellen sollte, handelt es sich dabei um tryptische Peptide des Glykoproteins Vitronectin (siehe Kapitel 6.3).

(b) Auswirkungen von Anilin und Matrixkonzentration

In bisherigen Arbeiten^{147, 148} zu ionischen Matrices konnte für MALDI MSI gezeigt werden, dass die Zugabe von einem Äquivalent Anilin zur CHCA-Matrix (CHCA/ANI) im Allgemeinen eine Verbesserung der Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse bewirkt. In dem Protokoll von Djidja *et al.*^{88, 118} wurde ebenfalls CHCA/ANI als Matrix verwendet, jedoch mit einer CHCA-Konzentration von 5 mg/ml statt 10 mg/ml. In dem folgenden Experiment wurde daher der Einfluss von Anilin auf die Spektrenqualität für beide Konzentrationen untersucht.

Aus der Abbildung 18a geht hervor, dass für CHCA/ANI mehr Peptidsignale mit S/N ≥ 3 detektiert werden als für CHCA ohne Anilin. Entgegen den Erwartungen wurden die Signalintensitäten der vier VTN-Peptide bei einem Zusatz von Anilin geringer, wohingegen die S/N-Verhältnisse zugenommen haben (Abbildung 18b,c). Letztere sollten sich jedoch mit abnehmenden Signalintensitäten verringern. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung ist, dass durch die Zugabe von Anilin die Signalintensitäten der Matrixcluster stärker abnehmen als die der Analyten und somit die S/N-Verhältnisse in der Summe zunehmen. Demzufolge kann die höhere Anzahl der detektierten Peptidsignale auf eine Verbesserung der S/N-Verhältnisse durch ein stark vermindertes chemisches Rauschen in den Spektren zurückgeführt werden. Aus den Grafiken in Abbildung 18 kann auch entnommen werden, dass für Messungen mit 10 mg/ml CHCA intensivere Signale aber auch deutlich geringere S/N-Verhältnisse für

die VTN-Peptide erhalten wurden als mit 5 mg/ml CHCA. Eine höhere Matrixkonzentration führt demnach zu einer besseren Ionenausbeute für die Analyten. Gleichzeitig werden auch mehr Matrix-Ionen erzeugt, die eine starke Zunahme des chemischen Rauschens in den Spektren zur Folge haben und letztendlich zu einer geringeren Anzahl an detektierten Peptidsignalen führt.

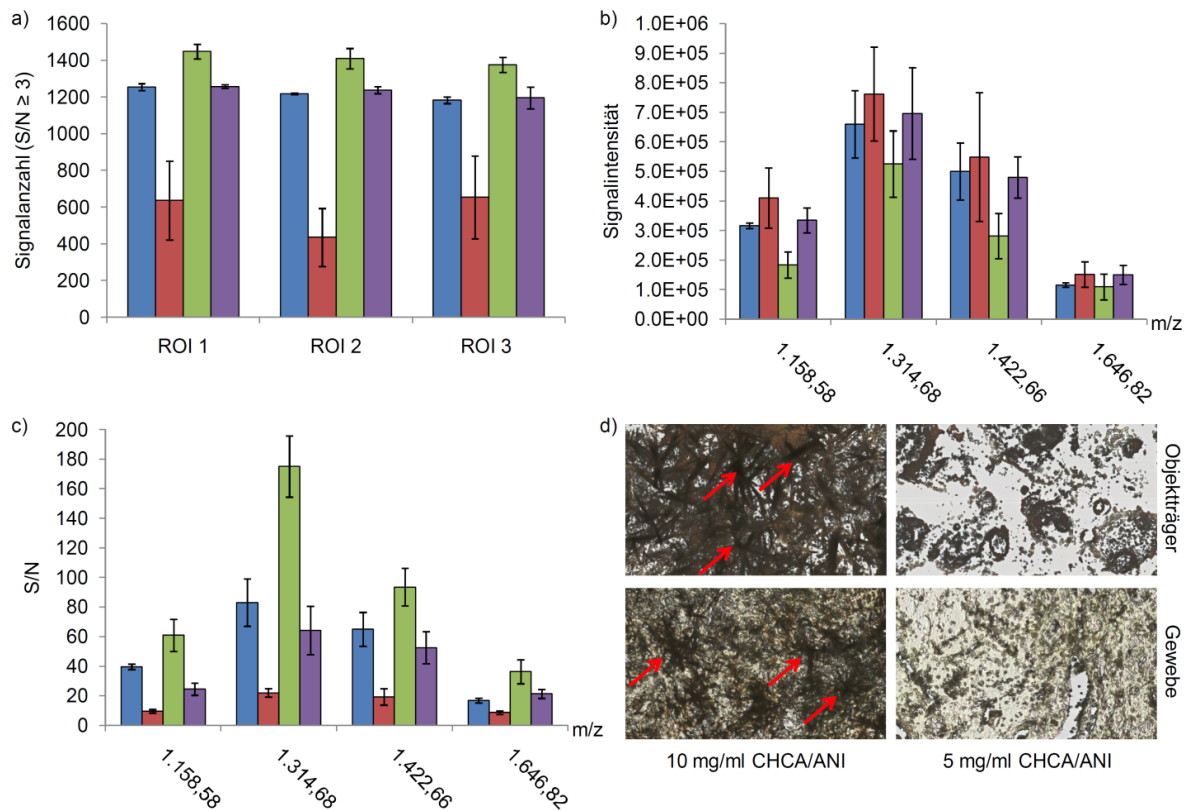


Abbildung 18: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektiertes Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von vier tryptischen VTN-Peptiden für eine repräsentative ROI. Bei der Probenvorbereitung erfolgte die Matrixauftragung mit 5 mg/ml CHCA (■), 10 mg/ml CHCA (■), 5 mg/ml CHCA/ANI (■) und 10 mg/ml CHCA/ANI (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 3$). Die Fehlerindikatoren repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. d) Mikroskopische Betrachtung der Matrixschicht für 5 mg/ml und 10 mg/ml CHCA/ANI. Die roten Pfeile zeigen nadelförmige Kristalle der Matrix an.

Ferner konnte bei Betrachtung der Matrixschicht unter dem Mikroskop festgestellt werden, dass sich für 10 mg/ml CHCA/ANI neben der typischen CHCA-Kristallstruktur auch nadelförmige Kristalle ausbilden (Abbildung 18d). Diese könnten sogenannte

"sweet spots" (hohe Anreicherung von Analyten) darstellen oder auch Kristalle mit sehr geringem Analytanteil.^{99, 149} Die daraus resultierende ungleichmäßige Aufnahme der Analyten in die Matrixschicht würde die MALDI MSI Messungen beeinträchtigen. Die Anwendung von CHCA/ANI wäre demnach auf niedrigere CHCA-Konzentrationen beschränkt. Des Weiteren muss eine CHCA/ANI-Lösung vor der Auftragung frisch hergestellt werden, da sie bereits nach wenigen Stunden Lagerung nicht mehr verwendbar ist. Eine CHCA-Lösung kann hingegen über mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden. Anilin selbst hat zudem ein hohes toxisches Potential und steht im Verdacht krebserregend zu sein.

Aufgrund der Ergebnisse sowie den gesundheitlichen und praktischen Aspekten, wurde in den folgenden Experimenten für die Matrixauftragung eine Lösung mit 5 mg/ml CHCA verwendet und auf den Zusatz von Anilin verzichtet.

(c) Mindestabstand zwischen Sprühkopf und Probe

In diesem Experiment wurde die Homogenität der Matrixauftragung in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Sprühkopf und Probe mittels MALDI MSI untersucht. Der Abstand wird über den *Offset* der z-Position eingestellt und wird mit kleiner werdenden z-Werten größer. In Abbildung 19 sind die Bilder des Matrixcluster-Signals bei 1.066,07 m/z für die unterschiedlichen Einstellungen des *Offsets* dargestellt. Für $z = 40\text{mm}$ wurden im Bild Streifen mit höheren und niedrigeren Intensitäten auf dem Gewebe beobachtet. Für die kleineren z-Werte konnten diese Beobachtungen hingegen nicht gemacht werden.

Dies kann damit erklärt werden, dass die Auftragung mäanderförmig erfolgt. Mit zunehmendem Abstand zwischen Sprühkopf und Probe nimmt auch die Breite des Sprühkegels im Moment des Auftreffens auf den Objektträger zu. Dadurch überlappen die aufgetragenen Bahnen immer stärker, was schließlich in einer gleichmäßigeren Auftragung der Matrix resultiert. Durch eine unzureichende Überlappung der aufgetragenen Bahnen können auf der Probe "Berge" (höhere Intensitäten) und "Täler" (geringere Intensitäten) entstehen. Der Abstand bei $z = 40\text{ mm}$ ist demnach zu gering, um eine ebene Matrixschicht zu erzeugen.

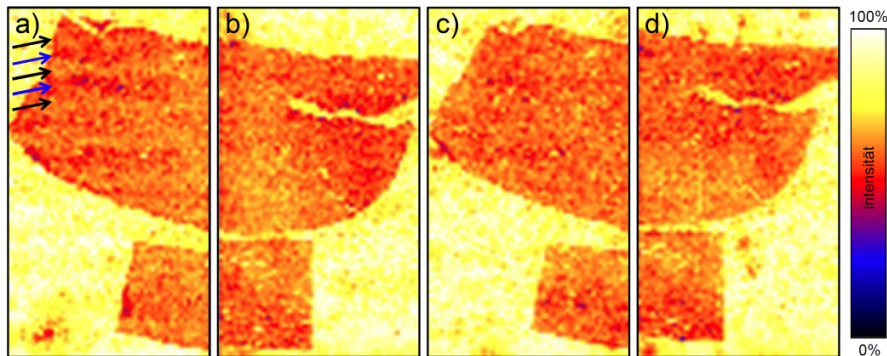


Abbildung 19: Vergleich der Matrixauftragung für unterschiedliche Einstellungen des Offsets der z-Position. Die Bilder der MALDI MSI Messungen zeigen die Intensitätsverteilung des Matrixclusters bei 1.066,07 m/z. Für $z = 40$ mm lassen sich auf dem Gewebeschnitt Streife mit höheren (schwarze Pfeile) und niedrigeren Intensitäten (blaue Pfeile) beobachten.

Da bereits für den Abstand bei $z = 35$ mm keine Streifen mehr im Bild zu erkennen waren, wurde diese Einstellung sowohl für die Typsinauftragung als auch die Matrixauftragung der folgenden Experimente übernommen.

(d) Einfluss der Verdauzeit auf die Delokalisation

In den vorangegangenen MALDI MSIP Messungen hat sich bereits angedeutet, dass es während der Probenvorbereitung zu einer Migration der Peptide auf den Gewebeschnitten kommt. Zur Ermittlung des Ausmaßes, wurde ein kompletter Gewebeschnitt mit MALDI MSI gemessen. Abbildung 20 zeigt, dass das Muster der Amyloidablagerungen für die VTN-Peptide komplett verloren gegangen ist. Lediglich für die Peptidmasse 1.646,82 m/z lässt sich teilweise ein ähnliches Verteilungsmuster erkennen. Da sich die Proben während der Inkubation in einer feuchten Atmosphäre befinden, kann es in dieser Zeit zur Migration der Analyten kommen. Demnach stellt die lange Verdauzeit von 14 h eine mögliche Ursache für die starke Delokalisation dar. Um dies zu überprüfen, wurde die Messung für einen Serienschnitt, der für 2 h inkubiert wurde, wiederholt und die entsprechenden Peptidbilder miteinander verglichen. Wie sich aus Abbildung 20 entnehmen lässt, konnte die Delokalisation für alle VTN-Peptide deutlich reduziert werden, so dass sich Verteilungsmuster ähnlich zu den Amyloidablagerungen erkennen lassen. Aufgrund dessen wurde die Verdauzeit für die folgenden Experimente auf 2 h verkürzt.

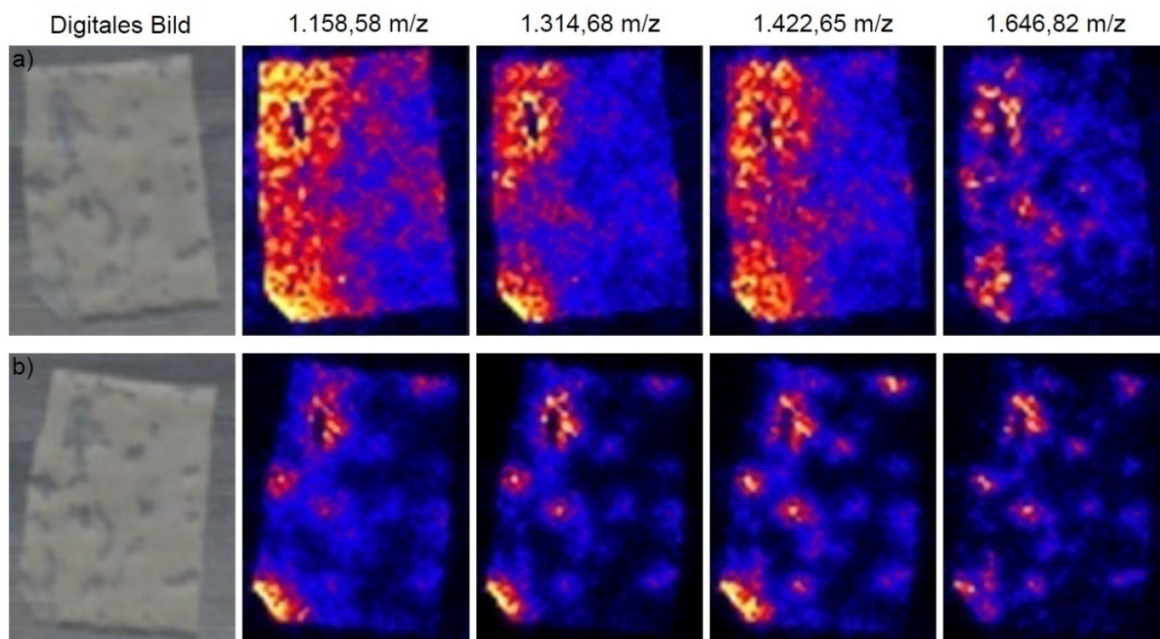


Abbildung 20: Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einer Verdauzeit von 14 h (oben) und 2 h (unten) anhand tryptischer Peptide von VTN. Digitale Bilder des aufgenommenen Gewebeschnitts (links) dienen als Referenz für die Peptidbilder der MALDI MSI Messungen (rechts).

Entwicklung der Methode B

Um die Entwicklung der Probenvorbereitung effizienter zu gestalten, wurde der experimentelle Aufbau verändert. Dadurch konnten sowohl MALDI MSIP als auch MALDI MSI Messungen auf demselben Schnitt durchgeführt werden (Kapitel 6.2.1, Abbildung 14, rechts). Des Weiteren wurde auf Wiederholungsmessungen zur Ermittlung des Einflusses auf die Spektrenqualität verzichtet und anstelle des GluFib-Signals (1.570,6768 m/z) wurde ein Matrixcluster-Signal (861,072 m/z) für die Rekalibrierung verwendet. Letzteres verringert den Aufwand bei der Probenvorbereitung, da nun keine GluFib-Lösung hergestellt werden muss und auch die Spritze des Sprühroboters zwischen der *Lockmass*- und Matrixauftragung nicht mehr gespült werden muss.

(e) Hitze-induzierte Antigendemaskierung (HIAR) I

Mit der bisherigen Methode der Probenpräparation konnten keine Peptidmassen des Amyloidproteins AApoAI detektiert werden. Der Grund dafür könnte sein, dass sich

entgegen der Annahme von Layfield *et al.*⁵⁹ eine Quervernetzung für dieses Protein ausgebildet hat. Daher wurden die Proben bei der Präparation einer Antigendemaskierung unterzogen. Dabei wurden die Proben in einer Citratpuffer-Lösung (pH = 6) für eine Minute auf 125 °C erhitzt.

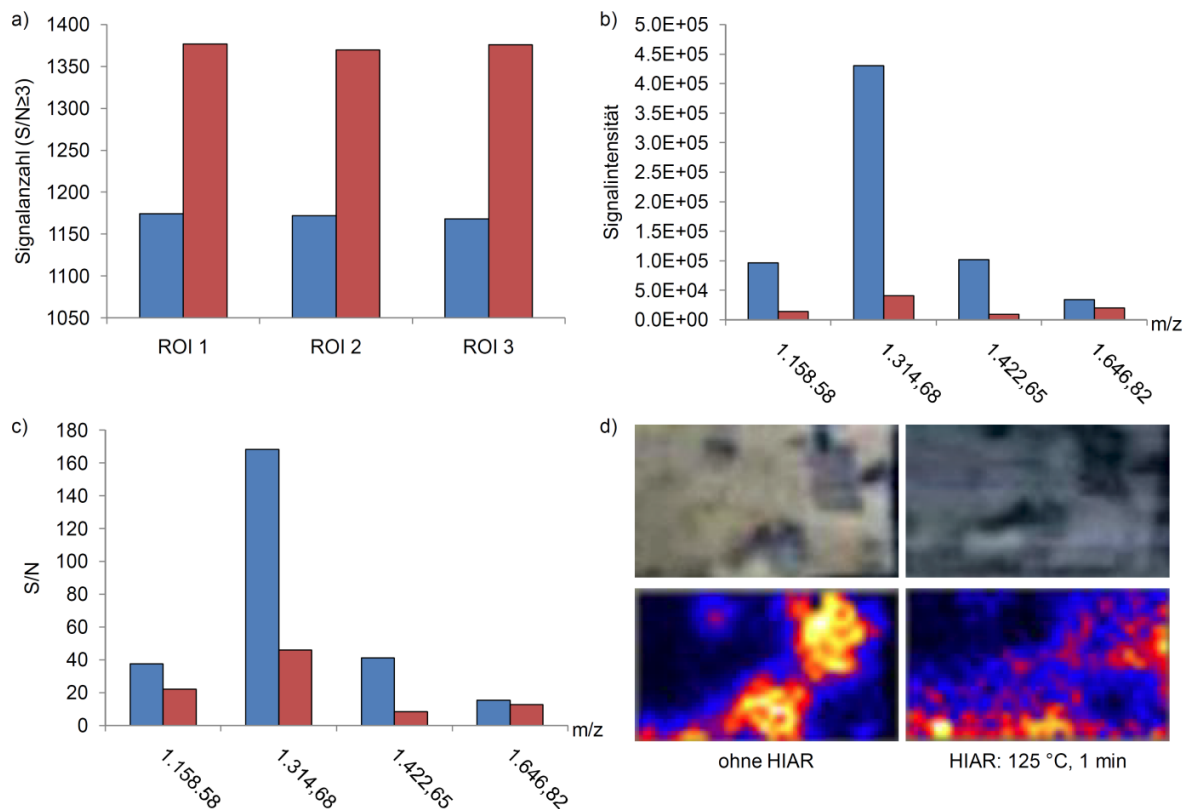


Abbildung 21: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von vier tryptischen VTN-Peptiden für eine repräsentative ROI. Die Probenvorbereitung erfolgte ohne (■) und mit (■) Hitze-induzierter Antigendemaskierung (HIAR). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die Probenvorbereitung ohne und mit HIAR-Behandlung dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

Aus Abbildung 21a kann entnommen werden, dass bei einer HIAR-Behandlung der Proben mehr Peptidsignale detektiert wurden als ohne diese Behandlung. Die Signalintensitäten und S/N -Verhältnisse haben sich hingegen deutlich verringert (Abbildung 21b,c). Diese Beobachtung kann auf die hydrolytische Spaltung der Methylenbrücken-

bindungen durch die Antigendemaskierung zurückgeführt werden. Durch die daraus resultierende geringere sterische Hinderung kann das Enzym die protolytischen Spaltstellen der Proteine besser erreichen und es werden mehr Peptide erzeugt. Dadurch kommt es vermehrt zu Konkurrenzreaktionen während des Ionisationsprozesses¹²⁴, wodurch die Signalintensitäten und letztendlich die S/N-Verhältnisse abnehmen. Des Weiteren ist das Verteilungsmuster der Amyloidablagerungen in den Peptidbildern durch die Antigendemaskierung vollständig verloren gegangen (Abbildung 21). Da auch die Peptide durch die Spaltung der Methylenbrückenbindungen weniger sterische Hinderungen erfahren, können diese während der Inkubation oder der Auftragung der Enzym- bzw. Matrixlösung leichter verschwimmen. Dies hätte eine "Ausdünnung" der lokalen Peptidkonzentrationen für die drei ROIs zur Folge und wäre ebenfalls eine mögliche Ursache für die geringeren Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse.

Aufgrund dessen, dass mehr Peptidsignale erhalten wurden und somit die Möglichkeit besteht, Peptide vom Amyloidprotein AApoAI zu detektieren, wurde die Antigendemaskierung beibehalten und versucht, die Spektrenqualität zu verbessern und die Delokalisation zu verringern. Ferner musste für die Rekalibrierung ein anderes Matrixcluster-Signal (823,106 m/z) verwendet werden, da das Signal bei 861,072 m/z nach einer HIAR-Behandlung eine sehr geringe Intensität besaß und teilweise gar nicht detektiert werden konnte.

(f) Matrixkonzentration und Verdauzeit

In dem Experiment (d) konnte gezeigt werden, dass eine kürzere Verdauzeit die Delokalisation reduzieren kann. Daher wurde in dem folgenden Experiment die Verdauzeit auf 30 min bzw. 10 min verkürzt. Bei diesen kurzen Verdauzeiten wurde die Inkubationskammer auf 37 °C vorgeheizt, um die Aufheizphase zu umgehen. Somit konnte sichergestellt werden, dass über die gesamte Zeit ein Verdau stattfindet. Des Weiteren wurde im Experiment (b) gezeigt, dass eine Erhöhung der Matrixkonzentration zu einer Verbesserung der Signalintensitäten aber auch zu einer Beeinträchtigung der S/N-Verhältnisse führt. Daher wurde gleichzeitig für beide Verdauzeiten der Einfluss

von 5 mg/ml, 7,5 mg/ml und 10 mg/ml CHCA-Lösungen auf die Spektrenqualität untersucht.

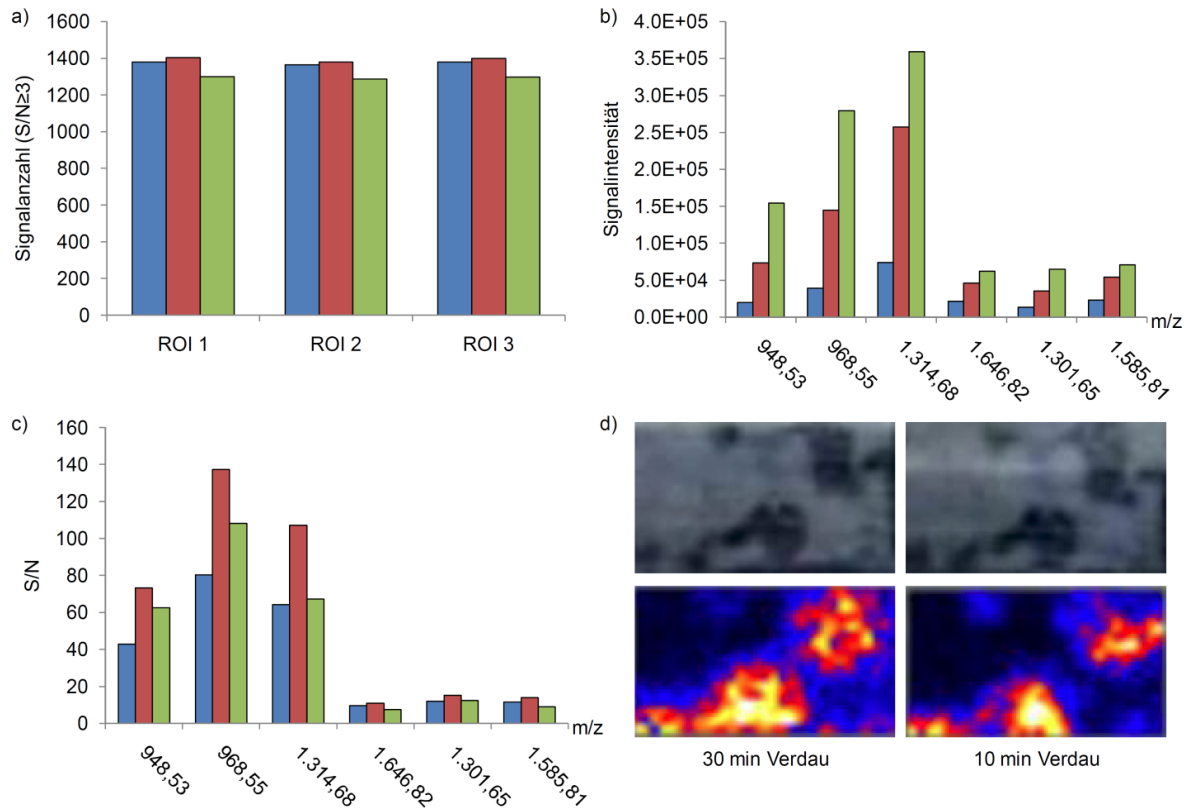


Abbildung 22: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Matrixauftragung erfolgte mit einer CHCA-Konzentration von 5 mg/ml (■), 7,5 mg/ml (■) und 10 mg/ml (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen für den 10-minütigen Verdau ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einer Verdauzeit von 30 min und 10 min anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für 7,5 mg/ml CHCA dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

In den MS1-Spektren wurden hier erstmals potentielle ApoAI-Peptide bei 1.301,65 m/z und 1.585,81 m/z detektiert und folglich in die Bewertung der Spektrenqualität mit aufgenommen. Zusätzlich wurden die VTN-Peptide bei 1.158,58 m/z und 1.422,65 m/z durch die Peptidmassen 948,53 m/z und 968,65 m/z ersetzt, welche bereits unter Anwendung der Methode A als tryptische Peptide von Apolipoprotein E identifiziert werden konnten (siehe Kapitel 6.3). Die Grafiken in Abbildung 22 zeigen für den 10-

minütigen Verdau, dass die Signalintensität mit steigender CHCA-Konzentration zunimmt, während für die S/N-Verhältnisse die höchsten Werte bei 7,5 mg/ml CHCA erhalten werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für den 30-minütigen Verdau gemacht werden (Anhang 9.1, Abbildung A1). Zusätzlich konnte die Delokalisation durch die Verkürzung der Verdauzeit deutlich reduziert werden. Für den 10-minütigen Verdau war dieser Effekt etwas größer als für den 30-minütigen Verdau (Abbildung 22d).

Für die folgenden Experimente wurden zunächst beide Verdauzeiten beibehalten. Aufgrund der beobachteten Maxima für die S/N-Verhältnisse, wurde für die Matrixauftragung eine Lösung von 7,5 mg/ml CHCA verwendet.

(g) Schnittdicke

Bei MALDI MSI Messungen beträgt die Schnittdicke für FFPE Gewebeproben 5 µm, wohingegen für immunhistochemische Färbungen 2 µm dicke Schnitte verwendet werden. Da nach jeder Änderung der Schnittdicke am Mikrotom mindestens ein Schnitt verworfen werden muss (persönliche Mitteilung Sandra Krüger, Institut für Pathologie Kiel), können keine echten Serienschnitte für einen Vergleich der Immunfärbung mit der MALDI MSI Messung hergestellt werden. In diesem Experiment wurde daher untersucht, inwiefern eine Reduzierung der Schnittdicke auf 2 µm die Spektrenqualität beeinflusst. Dabei wurde erneut ein 30-minütiger sowie 10-minütiger Verdau durchgeführt.

Die Grafiken in Abbildung 23 zeigen, dass mit einer geringeren Schnittdicke intensivere Signale und bessere S/N-Verhältnisse erhalten wurden, während sich die Anzahl der detektierten Peptidsignale nur geringfügig geändert haben. Ähnliche Beobachtungen wurden auch vom Gerätehersteller gemacht, konnten aber bisher nicht erklärt werden (persönliche Mitteilung Alex Muck, Waters). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Dicke des Gewebeschnitts Einfluss auf die Ionenextraktion im Quellenbereich des Massenspektrometers hat. Demzufolge würde die Effizienz der Ionenextraktion mit abnehmender Schnittdicke gesteigert werden. Des Weiteren geht aus Abbildung 23d hervor, dass die Delokalisation für die kürzere Verdauzeit, wie schon im Experiment (f) beobachtet, geringer ausfiel.

In den folgenden Experimenten wurde daher mit 2 μm Schnitten weitergearbeitet. Dies ermöglicht es, die Anfertigung der Schnittpräparate für MALDI MSI Messungen in den Routineablauf der immunhistochemischen Untersuchung zu integrieren.

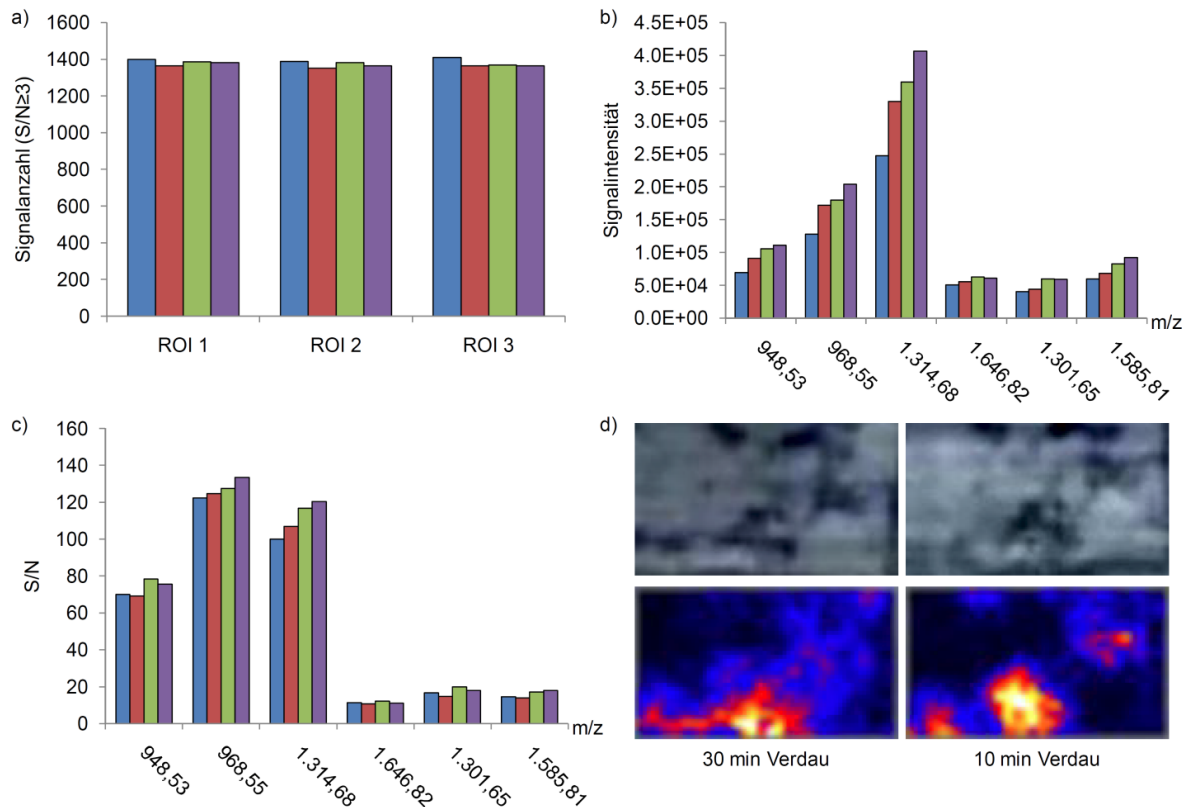


Abbildung 23: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoA1-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Schnittdicken und Inkubationszeiten getestet: 5 μm /30 min (■), 5 μm /10 min (■), 2 μm /30 min (■) und 2 μm /10 min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen für den 10-minütigen Verdau ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einer Verdauzeit von 30 min und 10 min anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die 2 μm -dicken Schnitte dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

(h) Trypsinkonzentration

In diesem Experiment wurde der Einfluss der aufgetragenen Menge an Trypsin auf die Spektrenqualität untersucht. Dabei wurde entweder die Konzentration des Enzyms oder die Flussrate bei der Auftragung um die Hälfte reduziert. Für beide Varianten wird

demnach die Menge an Trypsin halbiert. Es wurden hier ebenfalls ein 30-minütiger und 10-minütiger Verdau durchgeführt.

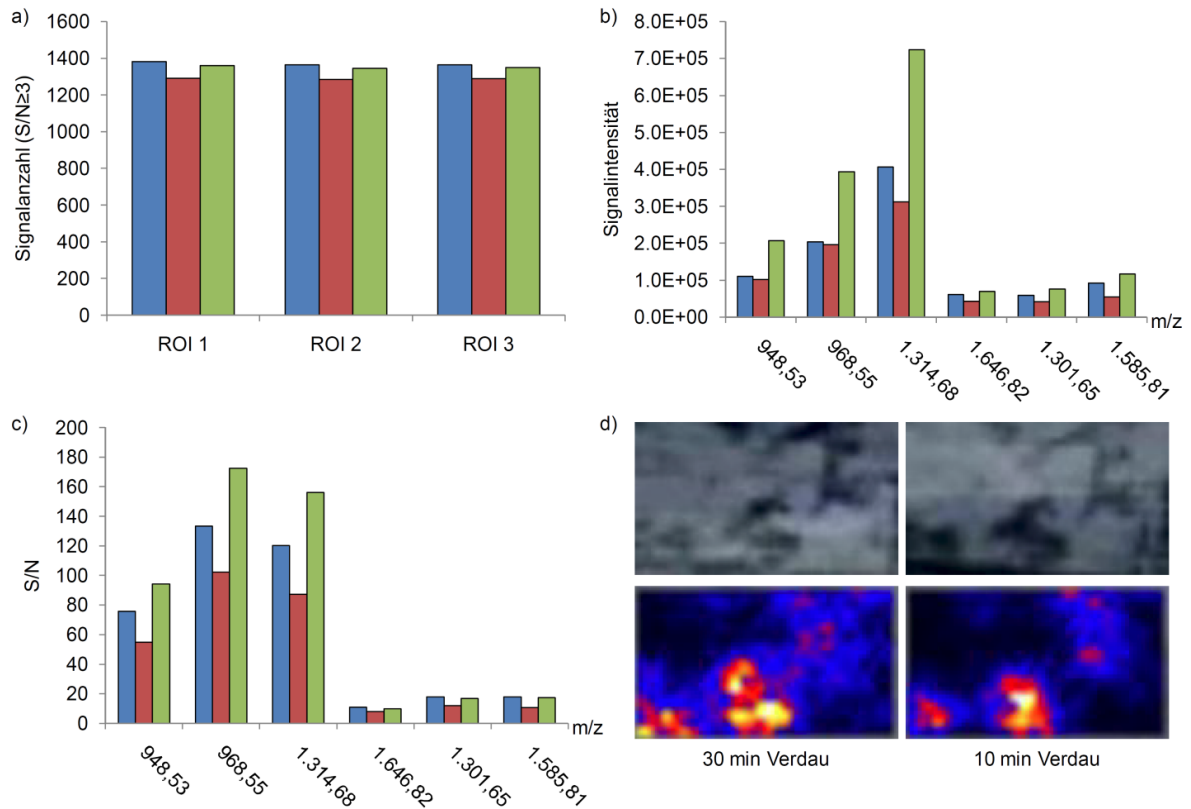


Abbildung 24: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoA1-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Trypsinkonzentrationen und Flussraten für die Trypsinauftragung getestet: 20 µg/ml mit 20 µl/min (■), 20 µg/ml mit 10 µl/min (■) und 10 µg/ml mit 20 µl/min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen für den 10-minütigen Verdau ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einer Verdauzeit von 30 min und 10 min anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für 10 µg/ml Trypsin mit der Flussrate 20 µl/min dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

Die Grafiken in Abbildung 24 zeigen für den 10-minütigen Verdau, dass eine niedrigere Flussrate zu einer Verschlechterung in allen drei Qualitätsmerkmalen führte. Für die geringere Konzentration in der Lösung lässt sich feststellen, dass die Signalanzahl etwas abgenommen hat, dafür aber die Signalintensitäten und S/N -Verhältnisse verbessert wurden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für den 30-minütigen

Verdau gemacht werden (Anhang 9.1, Abbildung A2). Des Weiteren war das Ausmaß der Delokalisation, wie schon in den Experimenten (f) und (g), für die kürzere Verdauzeit geringer (Abbildung 24d).

Für die folgenden Experimente wurde aufgrund dieser Beobachtungen die Trypsinkonzentration von 20 µg/ml auf 10 µg/ml verringert. Zudem wurde die Verdauzeit von 10 min übernommen.

(i) Hitze-induzierte Antigendemaskierung (HIAR) II

MALDI MSI Messungen mit der bisherigen Probenvorbereitung haben gezeigt, dass die Peptide am Geweberand schwimmen. Eine Vermutung war, dass die HIAR-Behandlung zu einer Veränderung der Objektträgeroberfläche führt, die eine Migration der Analyten am Geweberand begünstigt. Da die Oberflächenbeschaffenheit einen Einfluss auf die Kristallisation der Matrix haben kann, würde dies auch das in Experiment (e) beschriebene Phänomen der geringeren Intensität des Matrixcluster-Signals bei 861,072 m/z erklären. Aufgrund dessen wurde ein ebenfalls am Institut für Pathologie etabliertes Protokoll mit milderer Bedingungen (100 °C für 15 min) getestet.

Abbildung 25a zeigt, dass bei härteren Bedingungen (125 °C für 1 min) mehr Peptide detektiert wurden. Während für die VTN-Peptide die Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse abgenommen haben, sind diese für die ApoE-Peptide sowie das potentielle ApoAI-Peptid bei 1.585,81 m/z angestiegen (Abbildung 25b,c). Für das zweite potentielle ApoAI-Peptid bei 1.301,65 m/z nahm hingegen die Signalintensität etwas ab und das S/N-Verhältnis zu. Die höhere Anzahl an Peptiden kann, ähnlich zum Experiment (e), darauf zurückgeführt werden, dass mehr Methylenbrückenbindungen gespalten wurden und somit die Effizienz des enzymatischen Verdauens erhöht wurde. Die damit einhergehenden vermehrten Konkurrenzreaktionen während des Ionisationsprozesses können die Ionisation einiger Peptide gegenüber anderen begünstigen und würden somit das unterschiedliche Verhalten der sechs Peptide im Bezug auf die Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse erklären. Des Weiteren kann der Abbildung 25d entnommen werden, dass das Ausmaß der Delokalisation durch das mildere HIAR-Protokoll verringert werden konnte. Folglich wurde dieses Protokoll für die Probenvorbereitung übernommen.

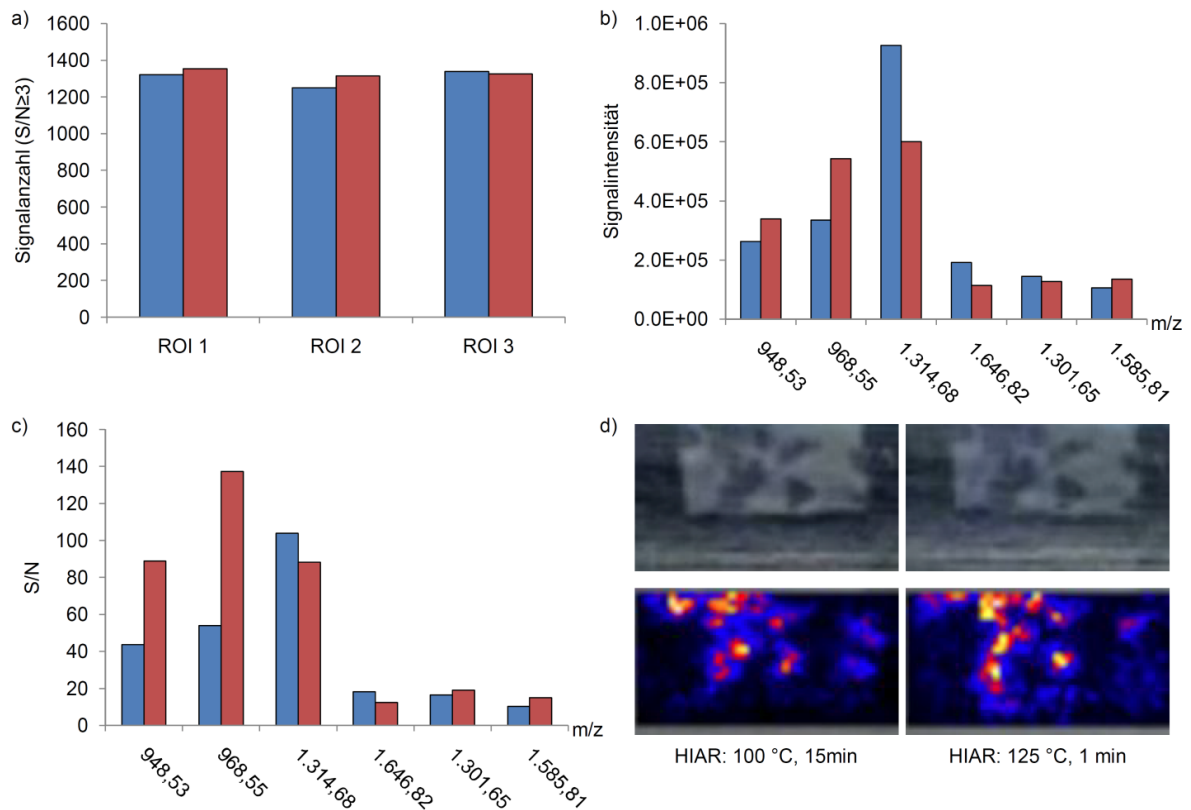


Abbildung 25: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Probenvorbereitung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Protokollen für die Hitze-induzierter Antigen-demaskierung (HIAR): 100 °C für 15 min (■) und 125 °C für 1 min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die zwei unterschiedlichen HIAR-Protokolle dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

(j) - (o) Reduzierung der Delokalisation und Optimierung der Spektrenqualität

In diesen Experimenten wurde in erster Linie versucht, die Delokalisation der Analyten auf ein Minimum zu reduzieren. Die Ergebnisse werden im folgenden Text zusammengefasst und nur für die Änderungen der Probenvorbereitung dargestellt, die einen entscheidenden Einfluss auf die Messung hatten. Die anderen Ergebnisse können im Anhang 9.1 den Abbildung A3, A4, A5, A6 entnommen werden.

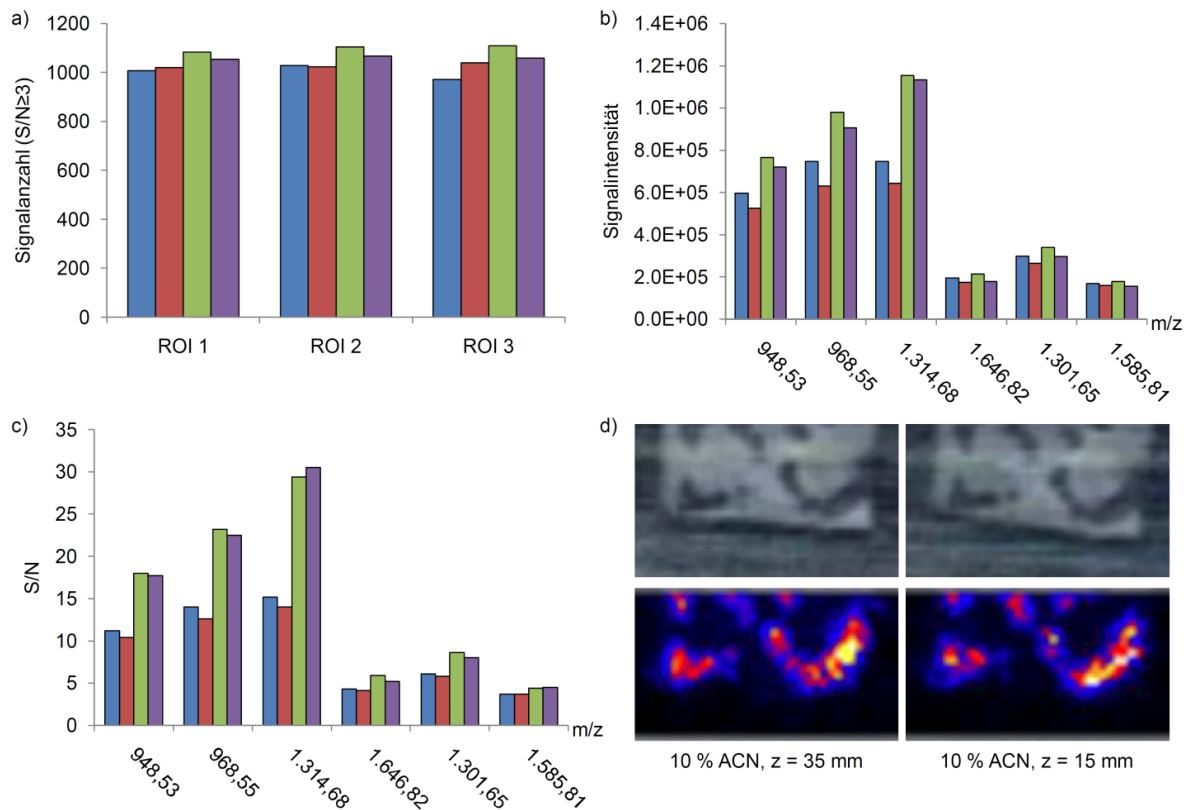


Abbildung 26: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Trypsinlösungen und Offsets der z-Position für die Trypsinauftragung getestet: wässrige Lösung mit $z = 35$ mm (■) und $z = 15$ mm (■), 10 % ACN mit $z = 35$ mm (■) und $z = 15$ mm (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einem Offset der z-Position mit $z = 35$ mm und $z = 15$ mm anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die Lösung mit 10 % ACN dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

In den Experimenten (j) und (m) konnte durch eine Verringerung der Flussrate bei der Matrixauftragung die Delokalisation reduziert werden. Im Allgemeinen haben dabei die Peptidanzahl, Signalintensitäten und S/N -Verhältnisse abgenommen. Ein analoges Verhalten konnte auch bei der Vergrößerung des Abstandes zwischen Probe und Sprühkopf im Experiment (k) beobachtet werden. Diese Tendenz kann darauf zurückgeführt werden, dass die Gewebeoberfläche während der Auftragung in beiden Fällen schneller trocknet, wodurch einerseits das Risiko einer Migration minimiert und

andererseits die Extraktion der Peptide verringert wird. Eine Änderung des Abstandes bei der Trypsinauftragung in Experiment (l) hatte hingegen weder auf die Delokalisation

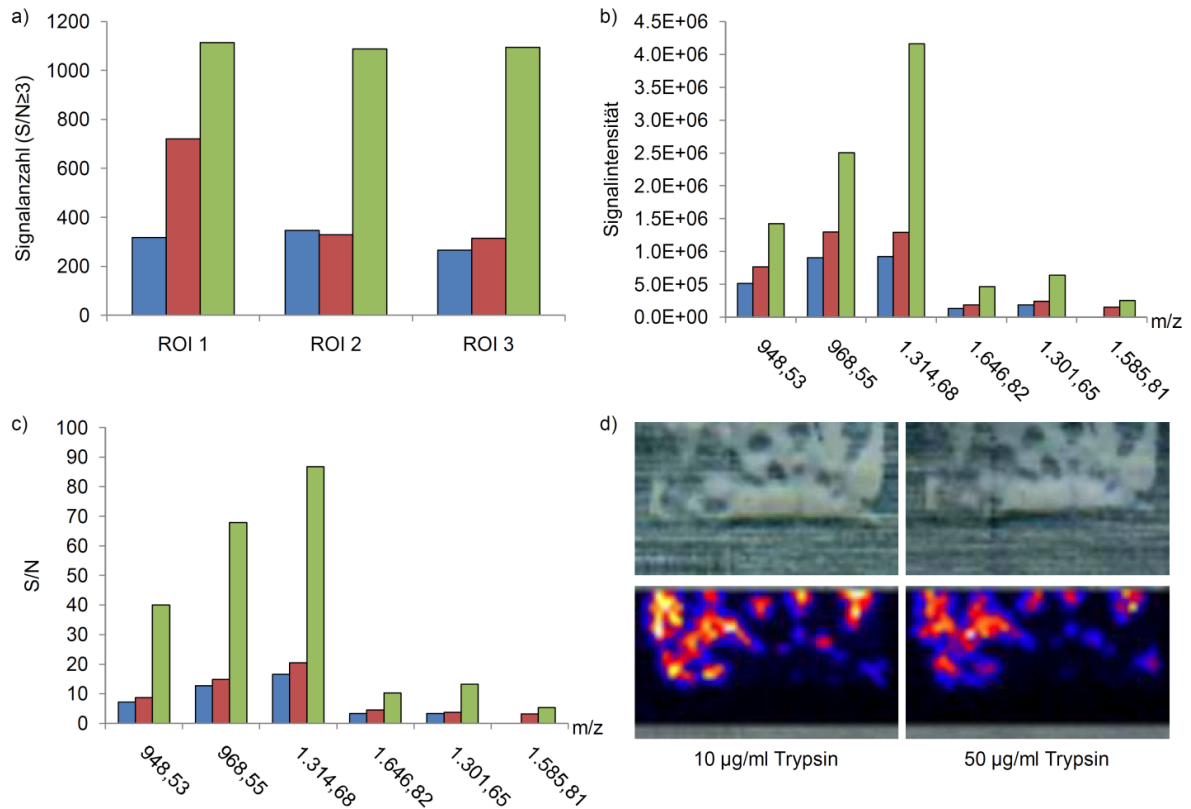


Abbildung 27: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoA1-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Trypsinkonzentration sowie Flussraten für die Matrixauftragung getestet: 10 µg/ml mit 5/7,5/10 µl/min (■), 10 µg/ml mit 5/10/15 µl/min (■) und 50 µg/ml mit 5/10/15 µl/min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation für die Trypsinkonzentrationen von 10 µg/ml und 50 µg/ml anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen mit der Flussrate 5/10/15 µl/min für die Matrixauftragung dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

noch die Spektrenqualität einen großen Einfluss (Abbildung 26). Im selben Versuch konnte gezeigt werden, dass bei einer Enzymlösung mit 10 % ACN insbesondere die Signalintensitäten und S/N -Verhältnisse der Peptidmassen 948,53 m/z, 968,55 m/z und 1.314,68 m/z verbessert wurden. In Experiment (n) wurde der TFA-Anteil in der Matrixlösung von 0,1 % auf 0,5 % erhöht und hatte eine leichte Verbesserung der

Spektrqualität zur Folge. Eine Erhöhung der Trypsinkonzentration von 10 µg/ml auf 50 µg/ml in Experiment (o) führte hingegen zu einer drastischen Zunahme der Signalanzahl, Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse (Abbildung 27a-c). Bei der bisher eingestellten Flussrate (5/7,5/10 ml/min) für die Matrixauftragung kam es häufig vor, dass die Matrix an der Nadelspitze des Sprühkopfes während der Auftragung der letzteren Schichten auskristallisierte. Da dies die Eigenschaften des Sprays beeinflussen könnte, wurden die Kristalle nach jeder Schicht von der Nadelspitze entfernt. Durch eine Erhöhung der Flussrate (5/10/15 ml/min) konnte dieses Problem behoben werden und gleichzeitig die Spektrqualität verbessert werden. Bemerkenswert ist, dass trotz einer Verdauzeit von 60 min die Migration der Analyten sehr gering ausgeprägt war (Abbildung 27d). Daraus lässt sich ableiten, dass die Dauer der Inkubation entgegen der bisherigen Annahme in den Experimenten (f), (g) und (h) keinen allzu großen Einfluss auf die Delokalisation hat. Vielmehr scheint die Feuchtigkeit der Gewebeoberfläche bei der Auftragung der Enzym- und Matrixlösung entscheidend zu sein. Des Weiteren ergab das Experiment (m), dass durch eine längere Verdauzeit die Spektrqualität gesteigert werden kann. Daher wurde für den enzymatischen Verdau der folgenden Experimente wieder die ursprüngliche Inkubationsdauer von 2 h gewählt.

(p) Test des neuen Sprühkopfes mit unterschiedlicher Matrixauftragung

Eine Betrachtung der Matrixschicht unter dem Mikroskop offenbarte, dass bei der vorherigen Probenvorbereitung die Probe nicht gleichmäßig von der Matrix bedeckt wurde (Abbildung 28a). Experiment (f) hat gezeigt, dass die Effizienz der Ionisation mit zunehmender Matrixkonzentration steigt. Demnach ist die Ionisation in den Bereichen mit höherem Matrixanteil effizienter als für die mit geringerem Anteil, wodurch die Bildqualität der MALDI MSI Messungen beeinträchtigt werden kann. Betrachtet man die Größe dieser Bereiche, sollte sich dieser Effekt insbesondere bei Messungen mit dem kleineren Laserfokus (ca. 60 µm) bemerkbar machen. In Hinblick darauf, dass zukünftig auch Peptidbilder mit höherer Auflösung aufgenommen werden sollen, wurde an dieser Stelle eine neue Generation des Sprühkopfes (siehe Kapitel 5.1.3) getestet. Diese zeichnet sich durch die Erzeugung eines feineren Sprays mit sehr geringer Tröpfchengröße aus, wodurch kleinere Matrixkristalle sowie eine gleichmäßigere Auftragung der

Enzym- und Matrixlösung ermöglicht werden (persönliche Mitteilung Dr. Günes Barka, SunChrom). Aufgrund der kleineren Tröpfchengröße (Größe wird vom Hersteller nicht angegeben) verdunstet das Lösungsmittel auf dem Weg vom Sprühkopf zur Probe deutlich schneller, so dass hier das Sprühprotokoll zunächst angepasst werden musste. In Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Sprühprotokoll (persönliche Mitteilung Dr. Günes Barka, SunChrom) wurde für die Auftragung der Trypsinlösung der *Offset* für die z-Position von 20 mm auf 30 mm und für die Matrixauftragung von 15 mm auf 25 mm erhöht. Bei letzterer wurde ebenfalls die Flussrate von 5/10/15 ml/min auf 10/20/30/50 μ l/min erhöht. Zudem wurden statt der bisher 14 Schichten nur noch 8 Schichten aufgetragen und die CHCA-Konzentration von 7,5 mg/ml auf 5 mg/ml verringert. Bei der geringeren Matrixkonzentration wurde analog zu den Arbeiten von Djidja *et al.*⁸⁸ der TFA-Anteil auf 0,2 % reduziert. Wie Abbildung 28b zu entnehmen ist, wurde mit dem neuen Sprühkopf eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der Matrix auf der Probe erhalten.

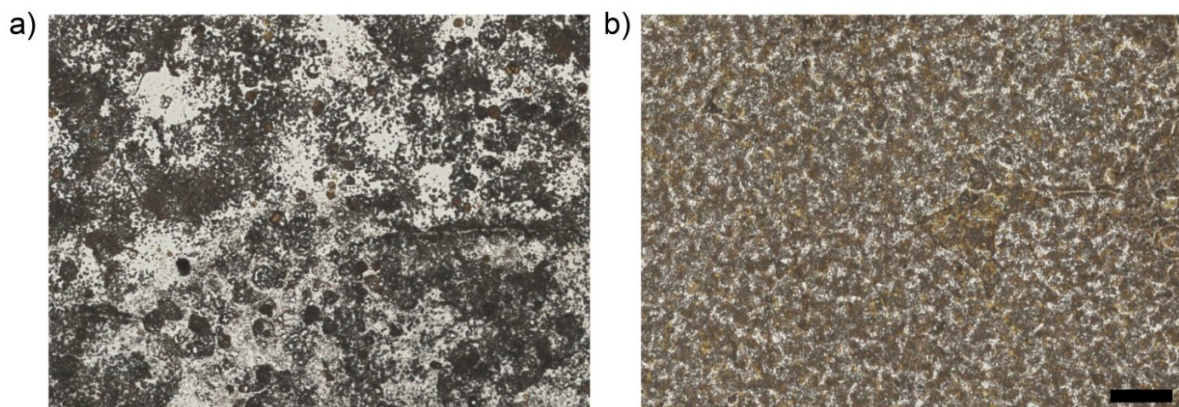


Abbildung 28: Vergleich der Matrixschicht nach der Auftragung mit a) der bisherigen und b) der neuen Generation des Sprühkopfes. Skalierung: 100 μ m.

Mit diesen Einstellungen des Sprühroboters konnte jedoch das potentielle ApoA1-Peptid bei 1.585,81 m/z nicht mehr detektiert werden (Abbildung 29b,c). Eine Vermutung war, dass die Peptidextraktion während der Matrixauftragung unzureichend gewesen ist. Daher wurde in einer Vergleichsmessung die Flussrate auf 20/30/40/60 μ l/min erhöht. Aus den Grafiken in Abbildung 29 geht hervor, dass die Erhöhung der Flussrate zu einer Verbesserung in allen drei Qualitätsmerkmalen der MS1-Spektren führte und dass

die Peptidmasse 1.585,81 m/z bei diesen Einstellungen wieder detektiert werden konnte. Des Weiteren zeigt Abbildung 29d, dass für beide Probenvorbereitungen die Verteilung der Amyloidablagerungen durch die Peptidbilder sehr gut wiedergegeben wurde.

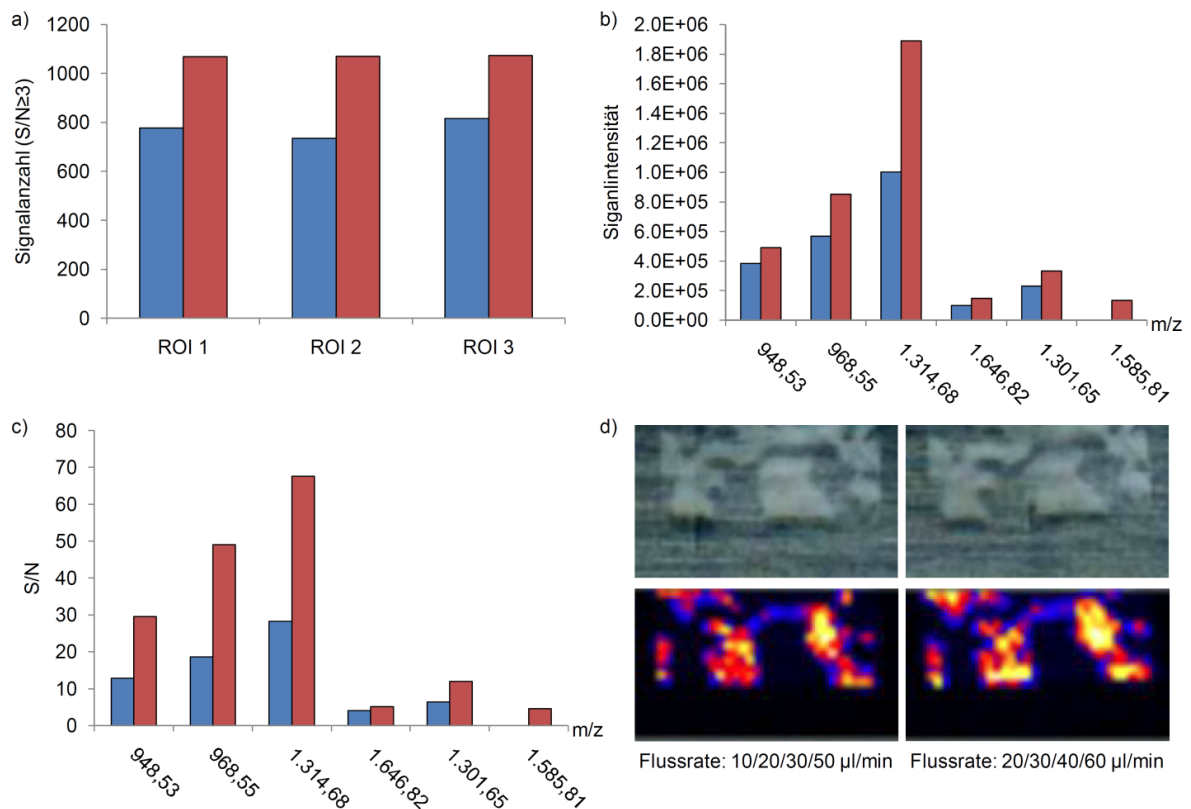


Abbildung 29: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Matrixauftragung erfolgte mit den Flussraten 10/20/30/50 µl/min (■) und 20/30/40/60 µl/min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die unterschiedlichen Flussraten bei der Matrixauftragung dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ab diesem Zeitpunkt mit dem neuen Sprühkopf weiter gearbeitet und die höhere Flussrate für die Matrixauftragung übernommen. Ferner wurde für die Rekalibrierung ein anderes Matrixcluster-Signal (825,101 m/z) verwendet, da das Signal bei 823,106 m/z bei der Anwendung dieser Sprühkopf-

generation eine sehr geringe Intensität besaß und teilweise gar nicht detektiert werden konnte.

(q) Hitze-induzierte Antigendemaskierung (HIAR) III

Die Ergebnisse in Experiment (i) führten zur der Annahme, dass bei dem HIAR-Protokoll mit 100 °C über 15 min die Quervernetzung weniger reduziert wurde als bei dem HIAR-Protokoll mit 125 °C über 1 min und somit die Effizienz des enzymatischen Verdau beeinträchtigt wurde. Außer der Temperatur könnte auch die Dauer der HIAR-Behandlung ausschlaggebend für die hydrolytische Spaltung der Methylenbrückenbindungen sein. Daher wurde in diesem Experiment der Einfluss einer 30-minütigen HIAR-Behandlung auf die Messergebnisse untersucht.

Abbildung 30 zeigt, dass bei einer längeren HIAR-Behandlung die Anzahl der detektierten Peptidsignale sowie die Signalintensitäten und S/N-Verhältnisse zugenommen haben. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Dauer der HIAR-Behandlung auch einen Faktor darstellt, über den die Effizienz der hydrolytischen Spaltung reguliert werden kann. Da hier für die sechs Peptide ein ähnliches Verhalten beobachtet werden konnte, lassen sich die Beobachtungen in Experiment (i) nicht allein über vermehrte Konkurrenzreaktionen während des Ionisationsprozesses erklären. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei höheren Temperaturen einige Methylenbrückenbindungen gegenüber anderen bevorzugt gespalten werden. Des Weiteren kann aus Abbildung 30d entnommen werden, dass das Verteilungsmuster der Amyloidablagerungen in den Peptidbildern sehr gut erhalten geblieben ist und es im Gegensatz zu Experiment (i) zu keiner Migration der Analyten am Geweberand gekommen ist.

Für die Probenvorbereitungsmethode B wurde daher die 30-minütige HIAR-Behandlung übernommen. Zudem wurde die Entparaffinierung von 2 x 10 min auf 2 x 15 min verlängert. Der Hintergrund ist, dass viele der Proben des Amyloid Registers Kiel von anderen Instituten stammen, die teilweise andere Paraffingemische für die Einbettung verwenden. Diese können unter Umständen unterschiedliche Löslichkeiten in Xylol besitzen.

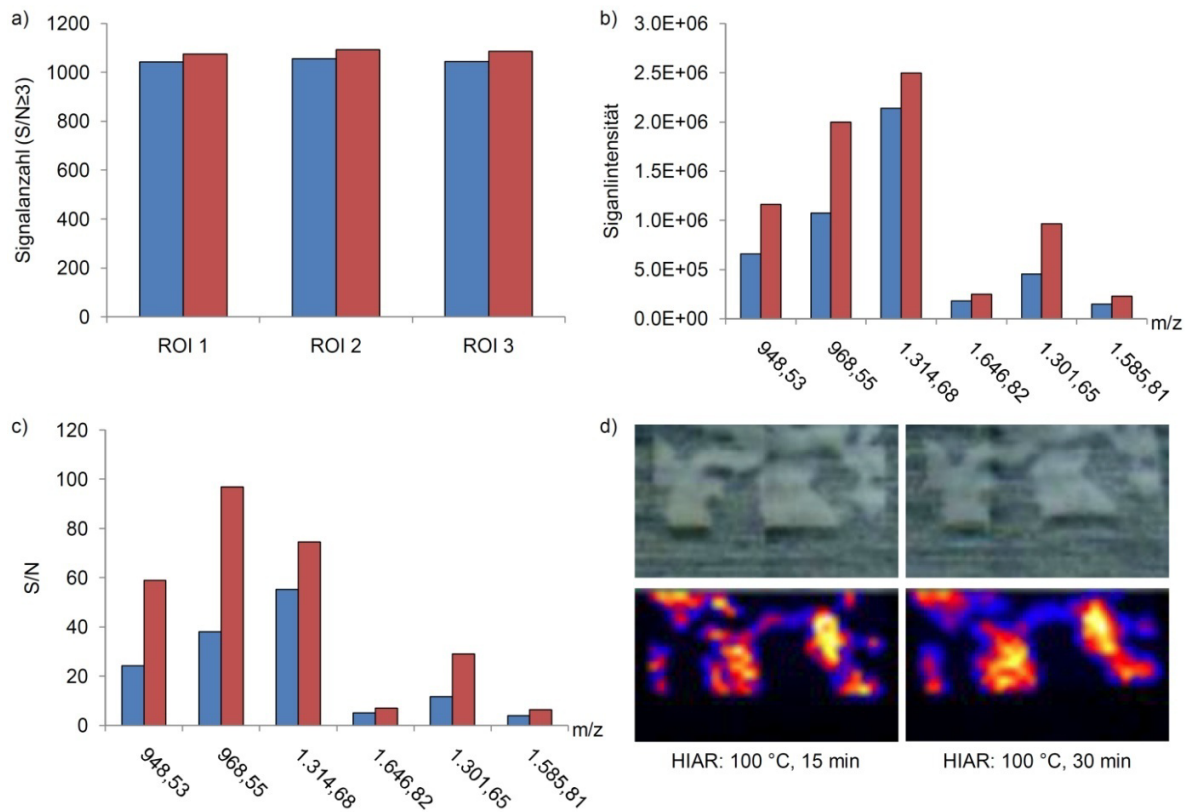


Abbildung 30: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Probenvorbereitung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Protokollen für die Hitze-induzierte Antigen-demaskierung (HIAR): 100 °C für 15 min (■) und 100 °C für 30 min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die zwei unterschiedlichen HIAR-Protokolle dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

6.3 Identifizierung von Vitronectin als allgemeine Komponente von Amyloidern mittels MALDI MSI

Wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben, wurden für die Amyloidablagerungen des Lebergewebes mit hereditärer AApoAI-Amyloidose in den MS1-Spektren der MSIP Messungen die vier Peptidmassen 1.158,58 m/z, 1.314,68 m/z, 1.422,66 m/z und 1.646,82 m/z mit hohen Signalintensitäten detektiert. Um festzustellen, ob diese Peptide tatsächlich ein Bestandteil der Amyloidablagerungen sind, wurde ein kompletter Gewebeschnitt (präpariert nach Methode A, Kapitel 5.1.3) mit MALDI MSI analysiert. Die erhaltenen Peptidbilder wurden anschließend mit der ApoAI-Immunfärbung eines Serienschnitts verglichen (Abbildung 31a-d). Wie am Beispiel der Peptidmassen 1.314,68 m/z, 1.422,66 m/z und 1.646,82 m/z gezeigt, konnten für die Peptide lokale Intensitätsmaxima beobachtet werden, die auf eine für Amyloidplaques charakteristische Proteinanreicherung hindeuten. Der Vergleich mit der immunhistochemischen Färbung offenbarte, dass die Intensitätsmaxima und die positiv gefärbten Amyloidareale das gleiche Verteilungsmuster besitzen. Diese Beobachtung impliziert einerseits die Kolo-kalisation der Peptide und andererseits deren spezifische Anreicherung in den AApoAI-Amyloidablagerungen.

Da keine der Peptidmassen einem theoretischen tryptischen Peptid des ApoAI-Proteins entspricht, stammen die m/z-Werte folglich entweder von Peptiden mit posttranslationalen Modifikationen bzw. Mutationen in der Aminosäuresequenz oder von Peptiden anderer Proteine. Um die Peptidmassen zu identifizieren, wurden direkt-MS/MS Messungen in den Amyloidablagerungen durchgeführt. Über eine Datenbanksuche mit den Suchalgorithmen MASCOT und SequestHT wurden die Peptide anhand ihrer charakteristischen MS2-Spektren (Abbildung 31i) als tryptische Peptide des Glykoproteins Vitronectin mit einer FDR <1 % identifiziert (Tabelle 3). Das Ergebnis wurde anschließend an einem Serienschnitt durch immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen VTN bestätigt. Wie in Abbildung 31e zu sehen ist, besitzen die positiv gefärbten Areale das gleiche Verteilungsmuster wie die Intensitätsmaxima der Peptidmassen (Abbildung 31b-d). Anhand dieser Resultate konnte gezeigt werden, dass Vitronectin in den AApoAI-Amyloidablagerungen spezifisch angereichert ist. Dies

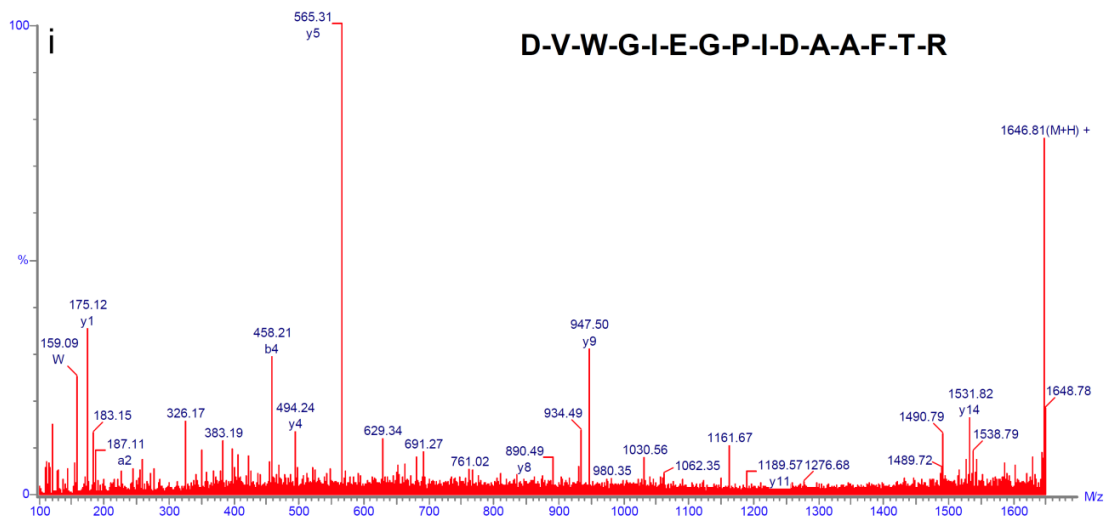
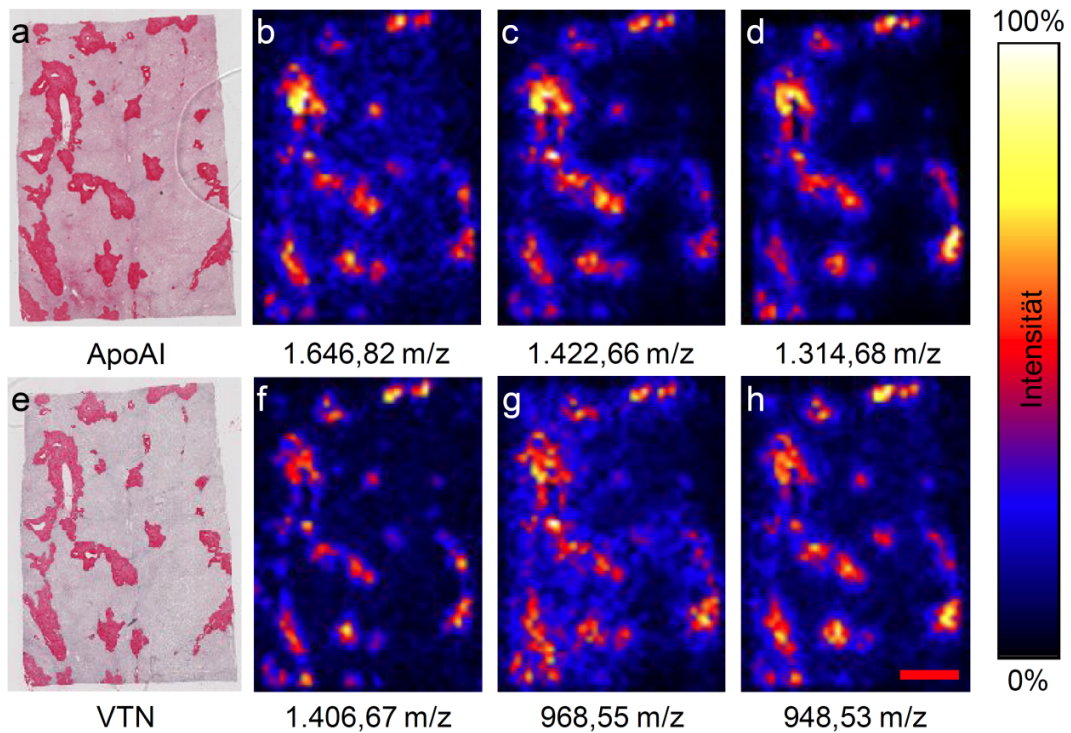


Abbildung 31: Vergleich der Immunfärbungen mit den Peptidbildern der MALDI MSI Messung des AApoAI-Amyloidfalls. Die (a) ApoAI- und (e) VTN-Immunfärbung zeigen ein identisches Färbemuster, wobei die positiv gefärbten Areale den Amyloidablagerungen entsprechen. Die Bilder der MALDI MSI Messung zeigen die Verteilung der tryptischen Peptide von VTN (b-d), ApoE (f-g) und SAP (h) im Gewebeschnitt. Für alle Peptidmassen wurden hohe Signalintensitäten in den Amyloidablagerungen detektiert. (i) MS2-Spektrum am Beispiel des tryptischen VTN-Peptids bei 1.646,82 m/z. Auflösung der Peptidbilder: 200 μ m. Skalierung: 2 mm. Die Abbildung wurde von Winter et al.¹⁵⁰ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

wird insbesondere durch das identische Färbemuster der beiden immunhistochemischen Färbungen verdeutlicht (Abbildung 31a,e). Desweiteren wurden mittels direkt-MS/MS Messungen tryptische Peptide von ApoE und SAP in den Amyloidablagerungen identifiziert (Tabelle 3). Beide Proteine sind Bestandteile des Serums und bekannt dafür, dass sie in Amyloiden spezifisch angereichert werden.^{151, 152} Dementsprechend konnten in der MALDI MSI Messung für die Peptidmassen 948,53 m/z, 968,55 m/z (beide ApoE) und 1.406,67 m/z (SAP) Intensitätsmaxima mit einem Verteilungsmuster ähnlich dem der VTN-Peptide sowie der ApoAI- und VTN-Immunfärbung beobachtet werden (Abbildung 31e-h).

Tabelle 3: Liste der identifizierten Peptidmassen mittels MALDI MS/MS (direkt-MS/MS) auf dem Gewebe einer amyloidhaltigen Leber mit AApoAI-Amyloidose. Die Tabelle wurde von Winter et al.¹⁵⁰ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

Protein	Masse (Da)	detektiertes Peptid (m/z)	Abweichung (ppm)	Aminosäuresequenz	Position	FDR	
						Mascot	Sequest
Vitronectin (P04004)	54271	1158,5768	-1,87	VDTVDPYPR	454-563	<0,01	>0,05
		1314,6772	0,63	RVDTVDPYPR	453-463	<0,01	>0,05
		1422,6583	3,38	FEDGVLPDYPR	230-241	<0,01	>0,05
		1646,8030	2,67	DVWGIEGPIDAAFTR	198-212	<0,01	<0,01
Apolipoprotein E (P02649)	36132	948,5261	-0,04	LAVYQAGAR	177-185	<0,01	>0,05
		968,5528	0,46	LGPLVEQGR	199-207	<0,01	>0,05
Serum Amyloid P-Komponente (P02743)	25371	1406,6667	-2,28	VFVFPFR	27-32	<0,01	>0,05

Um zu überprüfen, ob Vitronectin auch in anderen Amyloidtypen angereichert wird, wurden drei weitere Amyloidfälle mit MALDI MSI analysiert: eine AL λ -Amyloidose (Gewebe: Herz; Alter: 51 Jahre; Geschlecht: männlich), eine hereditäre ATTR-Amyloidose (Herz; 62 Jahre; weiblich) und eine AInS-Amyloidose (subkutanes Fettgewebe der Bauchhaut; 38 Jahre; weiblich). Der Vergleich der MALDI MSI Messungen mit den immunhistochemischen Färbungen ergab, dass für alle drei Amyloidtypen die Peptidmassen 1.314,68 m/z, 1.422,66 m/z und 1.646,82 m/z ebenfalls mit höheren Intensitäten in den Amyloidablagerungen detektiert wurden (Anhang 9.2, Abbildung A7). Die Identifizierung der Peptide und die anschließende Validierung erfolgten analog zum AApoAI-Amyloid-

fall und zeigten, dass auch bei diesen Amyloidtypen Vitronectin in den Ablagerungen angereichert vorliegt (Anhang 9.2, Abbildung A8, Tabelle A1).

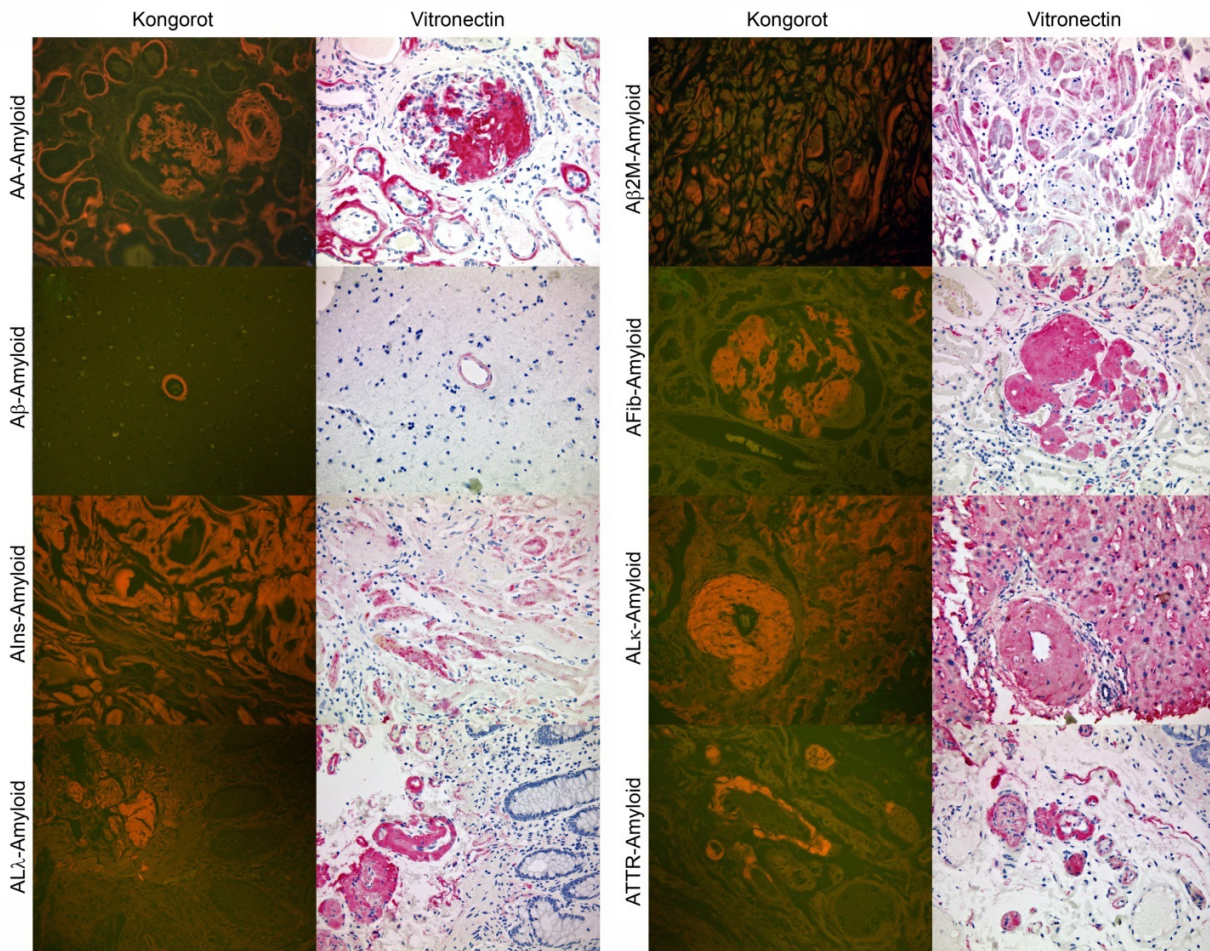


Abbildung 32: Vergleich der Kongorotfärbung mit der Vitronectin-Immunfärbung für verschiedene Amyloidtypen: AA- und AFib-Amyloid (Niere), ALλ- und ATTR-Amyloid (Dickdarm), Aβ-Amyloid (Gehirn), Alns-Amyloid (subkutanes Fettgewebe), Aβ2M-Amyloid (Karpaltunnel Ligament) und ALk-Amyloid (Leber). Die Kongorot-Färbung wurde mit der Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht, so dass die positiv gefärbten Amyloidablagerungen in Orange dargestellt werden. Der Alns-Amyloidfall demonstriert, dass VTN nicht immer im gesamten Amyloid vorliegt. Skalierung: 80 µm. Die Abbildung wurde von Winter et al.¹⁵⁰ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

Die Ergebnisse der MALDI MSI Experimente führten zu der Hypothese, dass Vitronectin ein genereller Bestandteil von Amyloidablagerungen ist. Daraufhin wurde ein Validierungskollektiv von 175 verschiedenen Amyloidfällen immunhistochemisch auf das Vorkommen und die histoanatomische Verteilung von Vitronectin untersucht. Das

Kollektiv bestand aus 107 (61 %) männlichen und 68 (39 %) weiblichen Patienten im Alter von 23 bis 94 Jahren, neun Amyloidtypen sowie 22 verschiedenen Gewebearten. Für 170 (98 %) Fälle konnte in den Amyloidablagerungen eine positive Färbung auf Vitronectin mit variablem Flächenanteil beobachtet werden (Tabelle 4). Zur Bestimmung des Flächenanteils, wurde die Kongorotfärbung fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und mit der entsprechenden VTN-Immunfärbung verglichen (Abbildung 32). Anschließend wurden die Fälle der jeweiligen Amyloidtypen bezüglich des prozentualen Flächenanteils in vier Gruppen unterteilt: 1) 0 %, 2) bis 10 %, 3) 11-90 % und 4) mehr als 90 % (Tabelle 4). Während die Flächenabdeckung für die AFib- und AApoAI-Amyloidfälle mindestens 90 % betrug, wurde dieser Grad der Flächenabdeckung bei den anderen Amyloidtypen weniger häufig beobachtet: AA (85 % der Fälle), AL κ (58 %), ATTR (54 %), A β (33 %), AL λ (29 %), A β 2M (0 %) und AIns (0 %). Daraus ließe sich für die Amyloidtypen eine Tendenz ableiten, bei der einige Amyloidtypen ein höheres Potential besitzen, VTN einzulagern als andere. Der Grund dafür könnten die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der verschiedenen Vorläuferproteine sein, von denen die Amyloide abstammen. Da der Flächenanteil auch für einen bestimmten Amyloidtyp variierte, scheint die Einlagerung des VTN von weiteren Faktoren abzuhängen. Eine wahrscheinliche Einflussgröße stellt die extrazelluläre Matrix (EZM) dar, für die bereits eine bislang noch ungeklärte Funktion in der Amyloidogenese postuliert wurde.^{9, 36, 153} In Abhängigkeit der histoanatomischen Lokalisation ändert sich die Zusammensetzung der EZM, so dass die Amyloide unterschiedlichen extrazellulären Umgebungen ausgesetzt sind, welche wiederum die Einlagerung des Vitronectins begünstigen oder erschweren könnten. Die genauen Ursachen für die unterschiedlichen VTN-Anteile wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Unabhängig davon zeigten die Ergebnisse der Immunfärbung, dass Vitronectin ein allgemeiner Bestandteil von Amyloidablagerungen ist. Dadurch, dass für die Validierung eine Kohorte mit der bisher größten Diversität bezüglich Gewebeart und Amyloidtyp untersucht wurde, konnten die Beobachtungen anderer Forschungsgruppen nicht nur bestätigt sondern auch erweitert werden: A β -Amyloid im Gehirn (Patienten: 15)¹⁵⁴, AL-Amyloid in der Neuropathie (3)¹⁵⁵ sowie AA- und AL-Amyloid in der Niere (20 und 6).¹⁵⁶

Tabelle 4: Validierungskollektiv der immunhistochemischen Untersuchung von Amyloid auf Vitronectin. Das Validierungskollektiv umfasste 175 Amyloidfälle, die mit anti-Vitronectin gefärbt wurden. Für die verschiedenen Amyloidtypen sind die Anzahl, das Alter und das Geschlecht der Patienten angegeben. Eine positive Färbung in den Amyloidablagerungen wurde je nach Amyloidtyp in 89 % bis 100 % der Fälle beobachtet. Für jeden Amyloidfall wurde der prozentuale Flächenanteil des Vitronectins in den Amyloidablagerungen bestimmt und die Proben daraufhin in die vier Kategorien 0 %, ≤10 %, 11-90 % und >90 % unterteilt. Die Tabelle wurde von Winter *et al.*¹⁵⁰ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

	Anzahl der Patienten	Altersdurchschnitt [Spanne]	männlich/ weiblich	Anzahl der Patienten* (%)	Vitronectin-Immunfärbung			
					Immuno-Score (n, %)			
					0%	≤10%	11-90%	>90%
AA-Amyloid	20	58 [23-86]	12/8	20 (100)	0	1 (5)	2 (10)	17 (85)
AApoAI-Amyloid	1	68	0/1	1 (100)	0	0	0	1 (100)
Aβ2M-Amyloid	8	62 [54-75]	5/3	8 (100)	0	4 (50)	4 (50)	0
Aβ-Amyloid	9	67 [39-80]	5/4	8 (89)	1 (11)	3 (33)	2 (22)	3 (33)
AFib-Amyloid	9	57 [48-75]	8/1	9 (100)	0	0	0	9 (100)
AIns-Amyloid	11	58 [35-82]	7/4	11 (100)	0	9 (82)	2 (18)	0
ALκ-Amyloid	40	69 [36-86]	19/21	39 (98)	1 (2)	8 (20)	8 (20)	23 (58)
ALλ-Amyloid	38	66 [38-86]	26/12	36 (95)	2 (5)	11 (29)	14 (37)	11 (29)
ATTR-Amyloid	39	76 [55-94]	25/14	38 (97)	1 (3)	2 (5)	15 (38)	21 (54)

Vitronectin selbst ist ein multifunktionales Glykoprotein, das in den Zellen der Leber¹⁵⁷,¹⁵⁸, Niere¹⁵⁹⁻¹⁶¹, Gefäßmuskeln¹⁶² und des Gehirns¹⁶³ exprimiert wird. Die molekulare Masse beträgt ungefähr 75 kDa wovon etwa 54 kDa die Aminosäuresequenz ausmachen. Im Blut und in der extrazellulären Matrix kommt es entweder als ein intaktes Polypeptid vor oder in Form von zwei Polypeptidketten (65 kDa und 10 kDa), die über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden sind.^{164, 165} Die Multifunktionalität des Vitronectins liegt in dessen Primärstruktur begründet, die über mehrere Bindungsstellen für andere Makromoleküle verfügt.^{165, 166} Durch Wechselwirkungen zwischen der Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz und spezifischen Integrinrezeptoren, ist das Protein in der Lage, biologische Prozesse wie die Adhäsion, Verteilung und Migration von Zellen zu beeinflussen.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Desweiteren ermöglichen die Kollagenbindungsdomäne und polykationische Heparinbindungsdomäne die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix.¹⁷⁰⁻¹⁷² Da bereits bekannt ist, dass Amyloidablagerungen neben den Amyloidfibrillen auch Komponenten der EZM beinhalten, könnte Vitronectin eine weitere EZM-Komponente darstellen, die eine wichtige Funktion in der Amyloidogenese einnimmt. Bronfman *et al.*¹⁷³ untersuchten in ihren Arbeiten den Einfluss der EZM auf die

Expression des Amyloid-Vorläuferproteins und dessen Prozessierung zum amyloiden Derivat in Fibroblasten. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer extrazellulären Anwesenheit von VTN die Konzentration beider Spezies in den Zellen ansteigt. Demnach würde eine extrazelluläre Akkumulation des Glykoproteins der Anreicherung von Amyloidfibrillen vorangehen. Desweiteren wurde mittels *in vitro* Experimenten gezeigt, dass VTN ebenfalls in der Lage ist, fibrilläre Strukturen auszubilden.¹⁷⁴ Diese könnten als eine Art Nidus wirken, der die Amyloidakkumulation initialisiert und/oder beschleunigt. Ein ähnliches Verhalten wurde, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, für Amyloidfibrillen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet.^{7, 8} Diese Beobachtungen lassen aber ebenso Rückschlüsse auf einen Mechanismus mit umgekehrtem Verlauf zu, bei dem die Amyloidfibrillen als Nidus für die Akkumulation des Vitronectins wirken. Demnach würde VTN erst nach der Ausbildung von ersten Amyloidfibrillen in das Amyloid eingelagert und könnte erklären, weshalb nicht in allen Fällen eine positive Immunfärbung detektiert wurde. Um eine Aussage treffen zu können, ob und inwiefern VTN tatsächlich einen Einfluss auf die Amyloidogenese hat, müssen in weiterführenden Untersuchungen zunächst folgende grundlegende Fragen beantwortet werden:

- (1) Was wird zuerst akkumuliert; die Amyloidfibrillen oder das Vitronectin?
- (2) Wie beeinflussen der Amyloidtyp und die Zusammensetzung der EZM die Akkumulation des Vitronectins in den Amyloidablagerungen?
- (3) Existieren Bindungsstellen in der Primärstruktur des Vitronectins, die eine Wechselwirkung mit Amyloidpeptiden/-proteinen ermöglichen?

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Vitronectin einen allgemeinen Bestandteil von Amyloidablagerungen mit variablem Anteil darstellt. MALDI MSI wurde hier erstmals verwendet, um die spezifische Anreicherung des Glykoproteins Vitronectin in Amyloidablagerungen von vier verschiedenen Amyloidosen (AApoAI, AInS, AL λ , ATTR) nachzuweisen. Des Weiteren konnte am Beispiel der AApoAI-Amyloidose durch das Aufzeigen der Kolo-kalisation und spezifischen Anreicherung tryptischer Peptide von VTN, ApoE und SAP in Amyloidablagerungen das Potential von MALDI MSI für die Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Amyloiden demonstriert werden.¹⁵⁰

6.4 Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen mittels MALDI-IMS MSI in FFPE Gewebeschnitten

Die Ergebnisse in Kapitel 6.3 haben gezeigt, dass die Amyloide neben den amyloid-assoziierten Proteinen ApoE und SAP auch VTN enthalten. Dabei wurden in einer Leberprobe mit hereditärer AApoAI-Amyloidose tryptische Peptide dieser drei Proteine in den Amyloidablagerungen mittels MALDI MSI Messungen detektiert und identifiziert. Des Weiteren wurden in einer zeitgleich erschienenen Arbeit von Casadonte *et al.*¹⁷⁵ in FFPE Nierenbiopsien mit AL κ - und AA-Amyloidosen ebenfalls Peptide der Proteine ApoE, SAP und VTN im Amyloid nachgewiesen. Dies führte zu der Hypothese, dass Amyloidablagerungen anhand einer bestimmten Massensignatur ohne vorherige Kongorotfärbung mittels MALDI MSI identifiziert werden können. Ein wichtiges Kriterium für die Anwendung einer Massensignatur ist eine hohe Massengenauigkeit für die detektierten m/z-Werte, um eine eindeutige Peptidzuordnung zu gewährleisten. Da die Proteinzusammensetzung in Gewebeproben sehr komplex ist, kann durch spektrale Interferenzen, wie der Überlagerung isobarer Peptide, die Massengenauigkeit in klassischen MALDI MSI Messungen beeinträchtigt werden. Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, ermöglicht die IMS-Technologie durch die zusätzliche Auftrennung der Analyt-Ionen basierend auf deren Mobilitäten in der Gasphase eine Reduzierung der spektralen Interferenzen. Daher wurden in den folgenden Experimenten die MALDI MSI Messungen im IMS-Modus durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob für Amyloide eine charakteristische Massensignatur existiert, wurden zunächst 16 Amyloidfälle (präpariert nach Methode B, Kapitel 5.1.3) mit MALDI-IMS MSI gemessen. Die Proben umfassten die Amyloidtypen AA, A β , AFib, AL λ , ALys und ATTR sowie Gewebe von den Organen Gehirn, Herz, Leber, Niere und Milz. Die Auswertung der prozessierten Daten ergab, dass für alle Proben tryptische Peptide von ApoE, SAP und VTN mit Abweichungen < 35 ppm detektiert wurden (Anhang 9.3, Tabelle A2). Dabei handelte es sich um Peptide, die entweder bereits identifiziert wurden^{150, 175} oder über einen *in silico* Verdau (PeptideMass, www.expasy.org) berechnet wurden. Die erhaltenen Peptidbilder wurden, analog zu Kapitel 6.3, für jeden Amyloidfall mit der immunhistochemischen Färbung des jeweiligen Amyloidtyps ver-

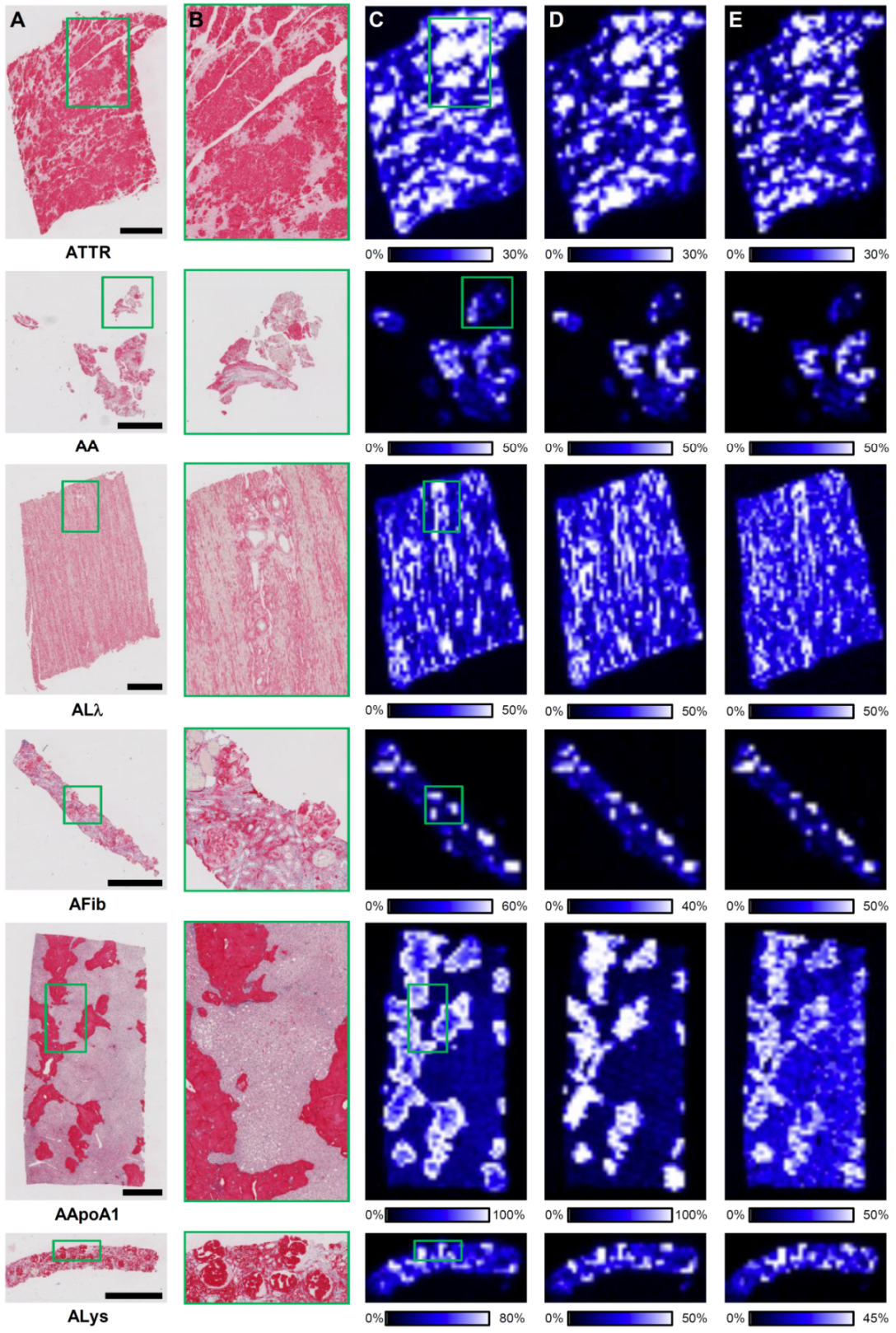


Abbildung 33: Vergleich der Immunfärbungen mit den Peptidbildern der MALDI MSI Messung für sechs Amyloidtypen. In jeder Reihe ist die Immunfärbung (A), ein vergrößerter Ausschnitt (B) sowie die Bilder der Peptidmassen 968,55 m/z (C), 1.314,68 m/z (D) und 1.811,89 m/z (E) des jeweiligen Amyloidfalls dargestellt. Für die Peptidmassen werden Intensitätsmaxima in den gleichen Arealen des Gewebes beobachtet, in denen auch die Immunfärbung positiv war. Zur Verdeutlichung der Kolo-kalisation und spezifischen Anreicherung der Peptide in den Amyloidablagerungen, wurden charakteristische Bereiche der Gewebeschnitte für die Immunfärbung vergrößert (grünes Rechteck). Amyloidfälle: ATTR-, AA-, AL λ -Amyloidose in Herzgewebe; AFib-, ALys-Amyloidose in der Niere; AApoAI-Amyloidose in der Leber. Auflösung der Peptidbilder: 200 μ m. Skalierung: 2 mm. Die Abbildung wurde von Winter et al.¹⁷⁶ übernommen.

glichen. In Abbildung 33 ist am Beispiel der Peptidmassen 968,55 m/z (ApoE), 1.314,68 m/z (VTN) und 1.811,89 m/z (SAP) gezeigt, dass für die m/z-Werte Intensitätsmaxima in den gleichen Arealen des Gewebes beobachtet werden konnten, in denen auch die jeweilige Immunfärbung positiv war. Diese Beobachtungen demonstrieren zum einen die Kolo-kalisation der Peptide und zum anderen deren spezifische Anreicherung in den Amyloidablagerungen. Die Ergebnisse wurden anschließend durch Kongorotfärbung und polarisationsmikroskopische Untersuchung der mit MALDI-IMS MSI analysierten Gewebeschnitten validiert. Zur Entfernung der Matrixschicht wurden die Proben für 1 min mit 80 % EtOH gewaschen. Des Weiteren wurden Peptidmassen der amyloidogenen Proteine ApoAI (*in silico* Verdau), SAA (identifiziert¹⁷⁵) und TTR (identifiziert¹⁷⁷) in den entsprechenden Amyloidfällen mit Abweichungen < 25 ppm detektiert (Anhang 9.3, Tabelle A2). Daraufhin wurde eine Liste mit 19 Peptiden der sechs Proteine zusammengestellt. Um die Identität der Peptide zu bestätigen, wurden direkt-MS/MS Messungen in den Amyloidablagerungen von drei verschiedenen Amyloidfällen mit AA-, AApoAI- (beide Leber) und ATTR-Amyloidose (Herz) durchgeführt. Über eine Datenbanksuche, analog zu Kapitel 6.3, wurden alle Peptide in mindestens einem der drei Amyloidfälle mit einer FDR <1 % identifiziert (Anhang 9.3, Tabelle A3).

Daraufhin wurde basierend auf den Daten der MALDI-IMS MSI Messungen ein Peptidfilter (MDIC-Filter) für die 19 Peptide entwickelt (Abbildung 34). Dabei wurden die folgenden drei Parameter verwendet: 1) Massengenauigkeit (*mass accuracy* = M), 2) Driftzeit (*drift time* = D) und 3) einem Korrelationskoeffizienten für die Peptidbilder (*image correlation coefficient* = IC). Die Referenzmassen wurden über einen *in silico* Verdau der sechs Proteine mit der Software PeptideMass (www.expasy.org) berechnet.

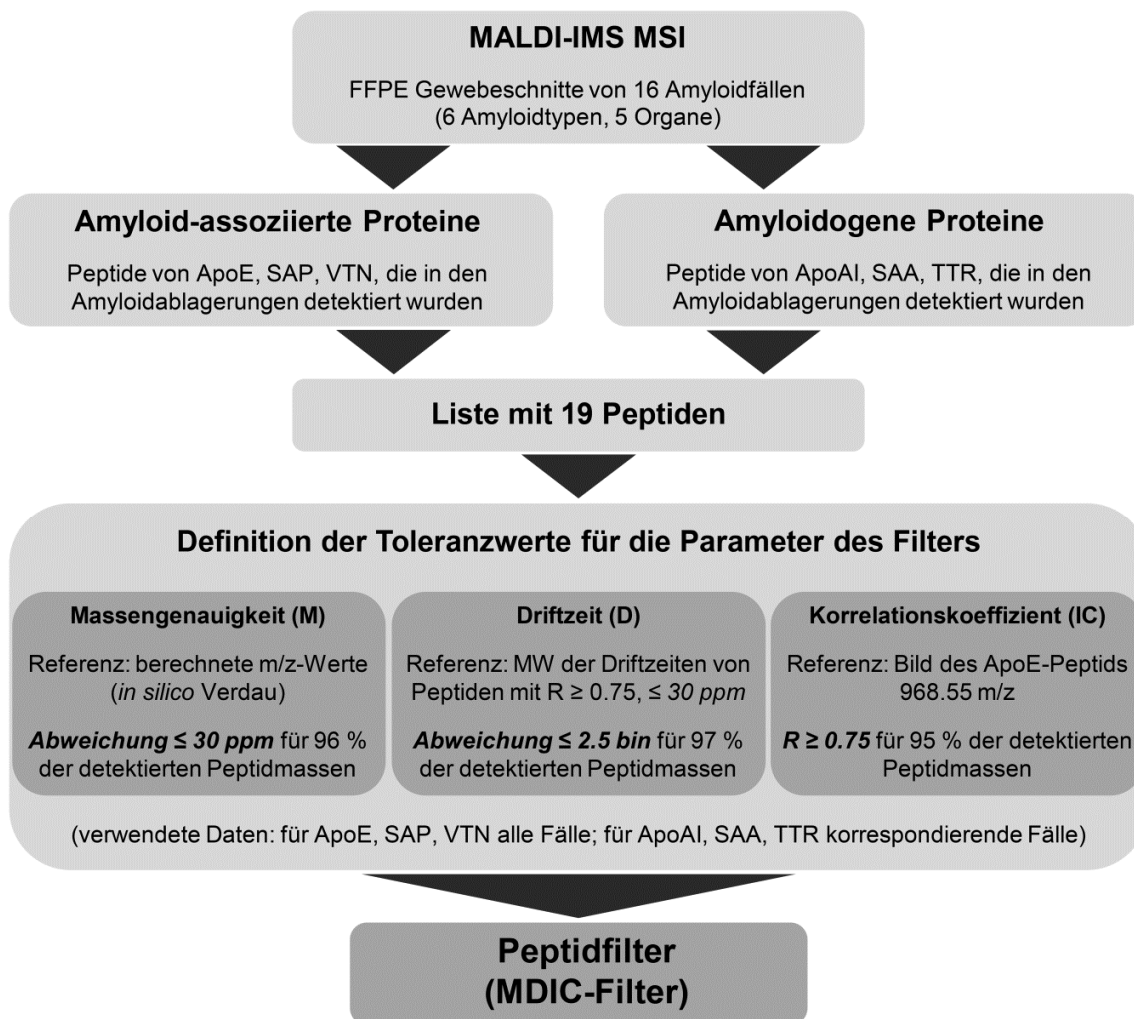


Abbildung 34: Entwicklung des Peptidfilters (MDIC-Filter) für die Detektion und Identifizierung von Peptiden in Amyloidablagerungen. MW = Mittelwert. Die Abbildung wurde von Winter et al.¹⁷⁶ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

Für 96 % (201 von 210) der detektierten Peptidmassen war die Abweichung geringer als 30 ppm. Daher wurde dieser Wert als Toleranz für den Parameter M definiert. Das Peptidbild von 968,55 m/z (ApoE) wurde als Referenzbild für die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten verwendet, da durch diese Peptidmasse die Verteilung der Amyloidablagerungen in allen Fällen am besten und mit hohen Signalintensitäten wiedergegeben wurde. Dies resultierte in einem Pearson Korrelationskoeffizienten mit $R \geq 0,75$ für 95 % (199 von 210) der detektierten Peptidmassen. Aufgrund dessen wurde dieser Wert als untere Grenze für den Parameter IC definiert. Als Referenz für die Driftzeiten wurden für die jeweilige Peptidmasse die Driftzeiten der Proben gemittelt, in

denen die Peptidmasse die Kriterien der Massengenauigkeit und des Korrelationskoeffizienten erfüllt hat. Bei einem Vergleich dieser Mittelwerte mit den gemessenen Driftzeiten betrug die Abweichung für 97 % (203 von 210) der detektierten Peptidmassen weniger als 2,5 bin. Folglich wurde dieser Wert als Toleranz für den Parameter D definiert. Die verwendeten Referenzwerte für die Peptidmassen und Driftzeiten befinden sich im Anhang 9.3 in Tabelle A4.

Anschließend wurde der MDIC-Filter auf die prozessierten Daten der MALDI-IMS MSI Messungen angewendet. In Tabelle 5 ist dargestellt, welche der 19 Peptide für die 16 Amyloidfälle nachgewiesen wurden. Die Peptidmassen der allgemeinen Komponenten wurden dabei in mindestens 14 der 16 Amyloidfälle (88 %) detektiert mit Ausnahme von 948,53 m/z (56 %, ApoE), 1.156,60 m/z (38 %, SAP), 1.422,65 m/z, 1.503,84 m/z und 1.646,82 m/z (69 %, 75 % und 69 %, VTN). Des Weiteren kann aus Tabelle 5 entnommen werden, dass die Peptide von ApoAI und SAA auch in Amyloidfällen wiedergefunden wurden, in denen sie nicht das verursachende Protein darstellen. Im Gegensatz dazu wurde die Peptidmasse 1.366,76 m/z (TTR) ausschließlich in den ATTR-Amyloidosen detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine variable Kombination der Peptide von ApoE, SAP und VTN als universelle Massensignatur für Amyloidablagerungen angenommen, während die Peptide von ApoAI, SAA und TTR als zusätzliche Indikatoren verwendet werden können. Des Weiteren scheint es möglich zu sein, AL λ - und ATTR-Amyloidosen in Herzgewebe anhand des Vorkommens der Peptidmasse 1.366,76 m/z (TTR) zu unterscheiden.

Zur Validierung wurden daher 97 Herzproben bestehend aus 32 AL λ -Amyloidosen, 34 ATTR-Amyloidosen sowie 31 Negativkontrollen mit MALDI-IMS MSI analysiert. Nach Anwendung des Peptidfilters auf die prozessierten Daten wurden in 62 der 66 Amyloidfälle Peptide der Massensignatur nachgewiesen, aber in keiner der 31 Kontrollproben. Daraus ergeben sich eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 100 % für die Differenzierung amyloidhaltiger von nicht-amyloidhaltigen Proben. Das Ergebnis wurde durch Kongorotfärbung der gemessenen Gewebeschnitte und Polarisationsmikroskopie verifiziert. Alle Amyloidfälle wurden dabei positiv und alle Kontrollproben negativ auf Amyloid getestet. Des Weiteren konnte auch hier festgestellt werden, dass die Kombination der Peptide für jeden Amyloidfall variiert und bestätigt somit die Existenz

Tabelle 5: Detektionshäufigkeiten der 19 Peptide in 16 verschiedenen Amyloidfällen mittels MDIC-Filter. Für jeden Fall ist dargestellt welche Peptide der Amyloid-assoziierten (ApoE, SAP, VTN) und amyloidogenen (ApoAI, SAA, TTR) Proteine detektiert (grün) und welche nicht detektiert wurden (rot). Die Peptide von ApoAI und SAA wurden auch in Fällen detektiert, in denen sie nicht das verursachende Protein darstellen (gelb). Die Detektionshäufigkeit wurde über n_D/n_A berechnet: n_D = Anzahl der untersuchten Amyloidfälle, in denen das Peptid detektiert wurde, n_A = Anzahl der Amyloidfälle. Amyloidfälle: AA-, AApoAI-, AFib-, ALys-, ATTR- oder AL λ -Amyloidose in den Organen Gehirn (G), Herz (H), Leber (L), Milz (M) und Niere (N). Die Tabelle wurde von Winter et al.¹⁷⁶ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

m/z	Amyloid																n_D/n_A (%)		
	AA					AApoAI		AFib	ALys	ATTR			AL λ						
ApoE	948.53	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	grün	9/16 (56)
	968.55	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	16/16 (100)
	1497.80	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	14/16 (88)
SAP	764.45	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	rot	rot	14/16 (88)
	1156.60	rot	grün	grün	rot	rot	grün	rot	rot	grün	grün	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	6/16 (38)
	1406.67	grün	grün	grün	grün	grün	rot	rot	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	14/16 (88)
	1811.89	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	grün	15/16(94)
VTN	887.51	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	16/16(100)
	1314.68	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	grün	15/16(94)
	1422.65	grün	grün	grün	rot	grün	grün	rot	grün	grün	rot	grün	grün	grün	rot	grün	rot	grün	11/16(69)
	1503.84	grün	rot	grün	grün	grün	grün	grün	rot	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	grün	12/16 (75)
	1646.82	rot	grün	grün	grün	rot	rot	grün	rot	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	grün	11/16 (69)
	1666.78	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	grün	rot	15/16(94)
ApoAI	781.43	rot	rot	gelb	rot	gelb	grün	grün	rot	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	12/16 (75)
	1031.52	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	grün	grün	gelb	gelb	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	gelb	10/16(63)
	1301.65	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	grün	grün	rot	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	rot	gelb	gelb	14/16 (88)
SAA	1612.82	grün	grün	grün	grün	grün	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	10/16 (63)
	1670.79	grün	grün	grün	grün	grün	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	9/16 (56)
TTR	1366.76	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	3/16 (19)
Organ		L	H	N	M	N	L	L	N	N	H	H	H	H	H	H	H	G	

einer variablen Massensignatur für Amyloide. In Tabelle 6 sind die Detektionshäufigkeiten der 19 Peptide für die 66 Amyloidfälle dargestellt. Denen kann bereits entnommen werden, dass das TTR-Peptid nicht ausschließlich im ATTR-Amyloid detektiert

wurde. Die Unterteilung der Detektionshäufigkeiten bezüglich der beiden Amyloidtypen zeigte, dass das TTR-Peptid ebenfalls in 10 (31 %) AL λ -Amyloidosen nachgewiesen wurde. Demnach ist eine Differenzierung anhand des Vorkommens dieses Peptides nicht möglich. Es wurde jedoch mit 26 (76 %) Fällen mehr als doppelt so oft im ATTR-Amyloid detektiert. Des Weiteren waren auch die Detektionshäufigkeiten der Peptidmassen 764,45 m/z, 1.156,60 m/z und 1811,89 m/z (alle SAP) deutlich höher in den ATTR-Amyloidfällen, wohingegen die Peptidmassen 948,53 m/z (ApoE) und 1.031,52 m/z (ApoAI) häufiger in den AL λ -Amyloidfällen nachgewiesen wurden. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die beiden Amyloidtypen über die Signalintensitäten dieser Peptide unterschieden werden könnten. Daraufhin wurden für alle Proben die aufsummierten MS1-Spektren der Bereiche, die eine hohe Signalintensität in dem Peptidbild von 968,55 m/z zeigten zur statistischen Analyse exportiert. Ein Mann-Whitney U Test resultierte in signifikant höheren Signalintensitäten ($p < 0,001$) für die Peptidmassen 1.366,76 m/z (TTR), 1.422,65 m/z (VTN) sowie 764,45 m/z, 1.156,60 m/z, 1.406,67 m/z und 1.811,89 m/z (alle SAP) in den ATTR-Amyloidfällen. Infolgedessen wurden diese Peptide genutzt, um ein Klassifizierungsmodell basierend auf einem SVM Algorithmus zu erstellen. Eine Kreuzvalidierung des Modells zeigte, dass ATTR- und AL λ -Amyloid mit einer Sensitivität von 91,2 % (positiv ATTR: 31, falsch-positiv ATTR: 3) und einer Spezifität von 93,8 % (positiv AL λ : 30, falsch-positiv AL λ : 2) voneinander unterschieden werden konnten. Daraus ergeben sich für ATTR- und AL λ -Amyloid die prädiktiven Werte 93,9 % bzw. 90,9 %.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass mit dem hier verwendeten Verfahren Amyloidablagerungen in FFPE Gewebeschnitten mittels MALDI-IMS MSI sowohl identifiziert als auch klassifiziert werden konnten. Durch Kombination der Eigenschaften von MALDI MSI und IMS wurde zunächst eine Filtermethode für die Detektion und Identifizierung tryptischer Peptide in Amyloidablagerungen entwickelt. Der Grund dafür ist, dass bei den MALDI-IMS MSI Messungen für die Peptidmassen relativ hohe Abweichungen erhalten wurden (Anhang 9.3, Tabelle A2). Dadurch wäre eine Identifizierung der Peptide anhand ihrer Massen mit einer großen Unsicherheit behaftet und müsste durch direkt-MS/MS Messungen ergänzt werden. Die Identifizierung über direkt-MS/MS setzt

Tabelle 6: Detektionshäufigkeiten der 19 Peptide in den Amyloidfällen des Validierungskollektivs mittels MDIC-Filter und die p-Werte der Signalintensitäten. Der MDIC-Filter wurde auf die prozessierten MSI Daten angewendet: n_D = Anzahl der untersuchten Fälle, in denen das Peptid detektiert wurde; n_A = Anzahl der Amyloidfälle; $n_{AL\lambda}$ = Anzahl der Fälle mit AL λ -Amyloidose; n_{ATTR} = Anzahl der Fälle mit ATTR-Amyloidose. Die p-Werte der Signalintensitäten wurden anhand der exportierten spektralen Daten aller Amyloidfälle mittels Mann-Whitney U Test ermittelt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ mit Bonferroni Korrektur verwendet. Die Tabelle wurde von Winter et al.¹⁷⁶ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

Protein	m/z	Amyloid		AL λ -Amyloid		ATTR-Amyloid		AL λ vs ATTR p-Werte
		n_D/n_A	[%]	$n_D/n_{AL\lambda}$	[%]	n_D/n_{ATTR}	[%]	
ApoE	948.53	22/66	33	16/32	50	6/34	18	0.396
	968.55	62/66	94	31/32	97	31/34	91	0.562
	1497.80	48/66	73	23/32	72	25/34	74	0.448
SAP	764.45	29/66	44	8/32	25	21/34	62	<0.001 ^{a)}
	1156.60	11/66	17	0/32	0	11/34	32	<0.001 ^{a)}
	1406.67	60/66	91	30/32	94	30/34	88	<0.001 ^{a)}
	1811.89	51/66	77	20/32	63	31/34	91	<0.001 ^{a)}
VTN	887.51	29/66	44	12/32	38	17/34	50	0.203
	1314.68	56/66	85	27/32	84	29/34	85	0.503
	1422.65	56/66	85	29/32	91	27/34	79	<0.001 ^{a)}
	1503.84	17/66	26	10/32	31	7/34	21	0.633
	1646.82	36/66	55	18/32	56	18/34	53	0.114
	1666.78	37/66	56	20/32	63	17/34	50	0.944
ApoAI	781.43	53/66	80	28/32	88	25/34	74	0.688
	1031.52	42/66	64	25/32	78	17/34	50	0.967
	1301.65	60/66	91	30/32	94	30/34	88	0.853
SAA	1612.82	10/66	15	4/32	13	6/34	18	0.146
	1670.79	11/66	17	6/32	19	5/34	15	0.843
TTR	1366.76	36/66	55	10/32	31	26/34	76	<0.001 ^{a)}

a) signifikante Unterschiede für die Signalintensität

jedoch eine gute Qualität der Fragmentspektren voraus, die in erster Linie durch die Signalintensität der Vorläufer-Ionen bestimmt wird. Die Signalintensität hängt wiederum von der Konzentration des zugehörigen Proteins im Gewebe des gemessenen Areals ab. Zudem kann es aufgrund der Komplexität von Gewebeproben zur Unterdrückung der Vorläufer-Ionen kommen, so dass deren Signalintensitäten trotz einer hohen lokalen Konzentration zu gering sind. Direkt-MS/MS Messungen sind daher auf Peptide abundanter Proteine oder Peptide mit hoher Ionisationseffizienz limitiert. Des Weiteren kann softwarebedingt pro Messung nur eine Vorläufer-Ionenmasse ausgewählt werden. Dadurch ist diese Methode sehr zeitaufwändig sowie mit einem hohen Verbrauch an Probenmaterial verbunden und kann somit nicht effizient in klinischen Routineunter-

suchen eingesetzt werden. Stattdessen wurden hier die Driftzeit und der Korrelationskoeffizient als zusätzliche Parameter verwendet, um die Peptide eindeutig zu identifizieren. Aufgrund dessen, dass jedes Peptid eine individuelle Größe und dreidimensionale Struktur besitzt, werden durch die IMS spezifische Driftzeiten erhalten. Dies ermöglicht es, isobare Verbindungen voneinander zu unterscheiden. Des Weiteren sind im Fall einer Amyloidose die Peptide amyloidogener und amyloid-assoziiierter Proteine in den Amyloidablagerungen kolokalisiert und spezifisch angereichert. Für die Peptidmassen werden daher Bilder mit ähnlichen Verteilungsmustern erhalten (Abbildung 33). Dementsprechend werden für die jeweiligen Peptidbilder hohe positive Pearson Korrelationskoeffizienten berechnet (HDI Software). Die Einführung eines Korrelationskoeffizienten bringt zudem einige wesentliche Vorteile mit sich. Bisher wurden Peptidbilder manuell miteinander verglichen, um eine Kolokalisation der Peptide auszumachen. Dabei wird häufig der Kontrast für jedes Peptidbild individuell angepasst, damit charakteristische Verteilungsmuster in der Gewebeprobe sichtbar werden (Abbildung 33).¹⁷⁵ Da in einer Messung mehrere tausend (hier 3.000) Bilder generiert werden, ist ein manueller Vergleich sehr zeitaufwändig. Des Weiteren basiert die Entscheidung, ob Peptide kolokalisiert vorliegen oder nicht, auf der Wahrnehmung des Anwenders und ist daher weder reproduzierbar noch eindeutig nachvollziehbar. Bei der Ermittlung der Korrelationskoeffizienten werden die Peptidbilder nach einem bestimmten Softwarealgorithmus miteinander verglichen. Dadurch kann bereits nach wenigen Sekunden eine Aussage getroffen werden, ob und inwiefern Peptide kolokalisiert vorliegen. Die Quantifizierung der Kolokalisation ermöglicht eine objektive Entscheidung basierend auf einer berechneten Größe. Dadurch können die Ergebnisse unabhängig vom Anwender reproduziert und auch eindeutig nachvollzogen werden. Zusammengefasst verwendet der MDIC-Filter insgesamt drei Parameter zur Charakterisierung der Peptide und stellt somit eine zuverlässige Methode für die Detektion und Identifikation von Peptiden in Amyloidablagerungen dar.

Durch die Anwendung des Peptidfilters auf die prozessierten MALDI-IMS MSI Daten wurde eine universelle Massensignatur mit einer variablen Zusammensetzung tryptischer Peptide der Proteine ApoE, SAP, VTN, ApoAI, SAA und TTR gefunden. Die Variabilität könnte auf die Proteinzusammensetzung der Amyloidablagerungen zurück-

zuföhren sein. Wie in Kapitel 6.3 bereits für das Vitronectin diskutiert wurde, könnte diese in Abhängigkeit vom Amyloidtyp und/oder der histoanatomischen Lokalisation variieren. In einer Studie von Röcken *et al.*¹⁷⁸ wurde für AA-Amyloidosen gezeigt, dass die Proteasen Cathepsin K und Cathepsin L in den Amyloidablagerungen spezifisch angereichert vorliegen und könnten demnach auch in den anderen Amyloidtypen vorkommen. Diese und bisher nicht nachgewiesene Proteasen könnten die Proteine in den Amyloidablagerungen partiell oder vollständig abbauen und würden somit letztendlich auch die Proteinzusammensetzung beeinflussen. Des Weiteren kommt es aufgrund der Komplexität von Gewebeproben in MALDI MSI zu Unterdrückungseffekten während des Ionisationsprozesses. Eine veränderte Proteinzusammensetzung würde demnach auch andere Unterdrückungseffekte zur Folge haben, so dass Peptide, die in einer Probe detektiert wurden für eine andere nicht mehr detektiert werden können. Die genaue Ursache wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht. Unabhängig davon konnten anhand dieser Massensignatur Amyloidablagerungen mit hoher Sensitivität und Spezifität identifiziert werden. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass der Filter nur angewendet werden kann, wenn die Peptidmasse 968,55 m/z von ApoE mit einer Massenabweichung ≤ 30 ppm sowie einer Driftzeitabweichung ≤ 2.5 bin detektiert wird. Dies ist auch der Grund, warum in allen Kontrollproben und vier Amyloidfällen (1 AL λ , 3 ATTR) des Validierungskollektivs keines dieser Peptide nachgewiesen wurde. Da zudem die Verteilung der Amyloidablagerungen im Gewebe durch das Peptidbild von 968,55 m/z am besten wiedergegeben wurde, kann das ApoE-Peptid als Kongorotäquivalent in MALDI MSI Analysen angenommen werden.

Ferner wurden die Peptide von TTR und SAP häufiger in den ATTR-Amyloidosen nachgewiesen als in den AL λ -Amyloidosen und besaßen auch signifikant höhere Signalintensitäten für das ATTR-Amyloid. Bemerkenswert ist, dass die Resultate der SAP-Peptide gut mit den Beobachtungen in der IHC übereinstimmen, da die SAP-Immunfärbung in AL-Amyloidosen häufig schwach und unregelmäßig ist (unveröffentlichte Beobachtungen, C. Röcken). Die geringeren Signalintensitäten sind demnach ein weiterer Indiz dafür, dass Amyloidosen nicht nur charakteristische Verteilungsmuster bezüglich des Amyloidtyps und der histoanatomischen Verteilung besitzen¹⁷⁹, sondern sich auch in der Zusammensetzung der Amyloid-assoziierten Proteine unterschei-

den.^{150, 180} Des Weiteren konnte damit gezeigt werden, dass durch die Anwendung des Peptidfilters auch potentielle Biomarker der unterschiedlichen Amyloidtypen ausgemacht werden können, die jedoch durch statistische Auswertung der Signalintensitäten abgesichert werden müssen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte so ein SVM Model erstellt werden, mit dem die zwei am häufigsten diagnostizierten Amyloidosen im Herzen¹⁸¹ mit hoher Sensitivität und Spezifität voneinander unterschieden und klassifiziert werden können.

6.5 Bedeutung für die Diagnostik

Für die gewebebasierte Diagnose von Amyloidosen werden in der klinischen Routine FFPE Gewebeschnitte mit Kongorot gefärbt und polarisationsmikroskopisch untersucht. Nach positivem Befund ist es entscheidend, das verursachende Protein eindeutig zu identifizieren, da zum einen die Prognose der Patienten davon abhängt und zum anderen so entsprechende therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden können. Die bisher am häufigsten verwendete Methode zur Klassifizierung von Amyloidosen ist die immunhistochemische Färbung. Diese birgt jedoch, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, einige Probleme bezüglich der Sensitivität und Spezifität. Aufgrund dessen wurden mehrere alternative analytische Verfahren entwickelt, um die Diagnostik zu unterstützen. Dabei hat sich die Massenspektrometrie in den letzten Jahren als besonders vielversprechend erwiesen.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Kopplung von Laser-Mikrodissektion (LMD) mit der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) eine sehr zuverlässige Methode zur Klassifizierung von Amyloidosen in FFPE Gewebe darstellt (Abbildung 35a).^{57, 64-68} Areale des Gewebeschnitts, die eine positive Kongorotfärbung zeigen, werden mit einem Laser ausgeschnitten und anschließend durch Extraktion und einem tryptischen Verdau für die Analyse vorbereitet. Im Gegensatz zu einer Extraktion direkt vom Gewebe werden so Kontaminationen durch amyloidogene Serum-Proteine des angrenzenden nicht-amyloidhaltigen Gewebes verhindert. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der Spektrenqualität und ermöglichte die Klassifizierung diverser Amyloidosen mit hoher Sensitivität und Spezifität.^{37, 68} Ferner konnte für Amyloidosen in Nierenbiopsien gezeigt werden, dass die Diagnose auch anhand der Detektion von SAP erfolgen könnte.⁶⁷ Dennoch wird die Kongorotfärbung als Orientierungshilfe für die LMD benötigt, um "reine" Amyloidproben für die Analyse zu erhalten. Ein wesentlicher Nachteil von LC-MS/MS ist der Verlust der räumlichen Information. Daher ist es ohne zusätzliche Analysen von Kontrollproben nicht möglich festzustellen, ob identifizierte Peptide und Proteine spezifisch in den Amyloidablagerungen angereichert sind.

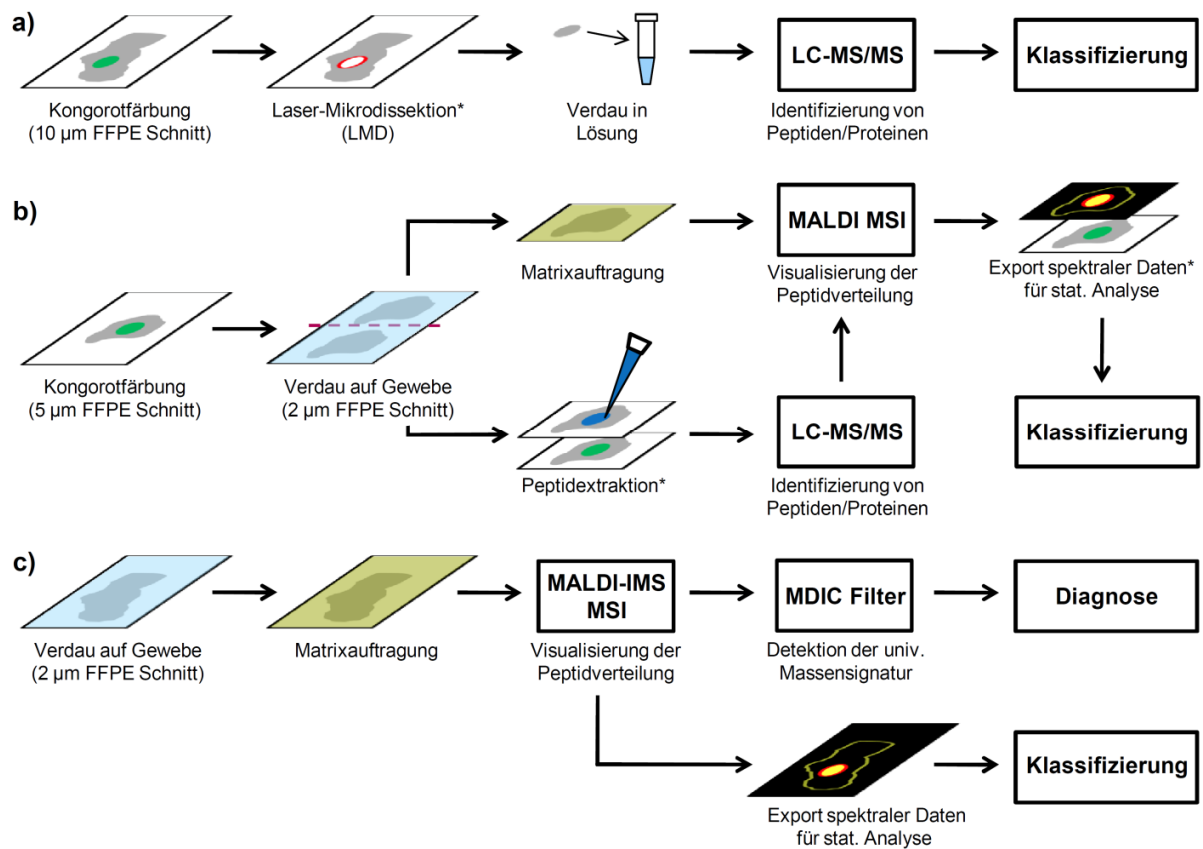


Abbildung 35: Vergleich der massenspektrometrischen Verfahren zur Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen. a) Kongorotfärbung und LMD-LC-MS/MS Analyse, b) Kongorotfärbung und parallele Analyse von zwei Serienschritten mit LC-MS/MS und MALDI MSI, c) MALDI-IMS MSI Analyse unabhängig von der Kongorotfärbung. *Arbeitsschritte, die auf die Kongorotfärbung angewiesen sind. Die Abbildung wurde von Winter et al.¹⁷⁶ übernommen und ins Deutsche übersetzt.

In den Arbeiten von Casadonte *et al.*¹⁷⁵ wurden die LC-MS/MS und MALDI MSI Messungen zweier Serienschritte miteinander kombiniert (Abbildung 35b). Dadurch konnten einerseits Peptide Amyloid-assoziiertes und amyloidogener Proteine identifiziert und andererseits deren Verteilung im Gewebe dargestellt werden. Durch einen Vergleich der Peptidbilder mit der Kongorotfärbung eines weiteren Serienschrittes, konnten die Proteine den Amyloidablagerungen eindeutig zugeordnet werden. Dieser Gewebeschritt diente auch als Orientierungshilfe, um die Peptide nach einem tryptischen Verdau des Gewebes aus dem Amyloid für die LC-MS/MS Analyse zu extrahieren. Des Weiteren wurde hier erstmals anhand von FFPE Nierenbiopsien mit AA- und AL κ -Amyloidosen demonstriert, dass MALDI MSI zur Klassifizierung genutzt werden kann. Dazu

wurden die spektralen Daten der Regionen, die positiv auf Kongorot getestet wurden, aus den Peptidbildern exportiert, um ein SVM-Klassifizierungsmodell zu erstellen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden MALDI MSI und IMS für die Analyse von amyloidhaltigen FFPE Gewebeschnitten miteinander gekoppelt (Abbildung 35c). Durch die Kombination der Eigenschaften beider Technologien wurde ein Peptidfilter entwickelt, der ein analytisches Verfahren für die Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen unabhängig von der Kongorotfärbung ermöglicht. Diese Methode hat zudem einige wesentliche Vorteile gegenüber den vorher beschriebenen massenspektrometrischen Verfahren und der Immunhistochemie:

- (1) Durch die Anwendung des MDIC-Filters ist eine *targeted* (=gezielte) Identifizierung tryptischer Peptide in Amyloidablagerungen basierend auf MALDI-IMS MSI Daten möglich. Auf den zeitaufwändigen Schritt der MS/MS Analyse kann daher verzichtet werden.
- (2) Amyloidosen können anhand einer universellen Massensignatur unter Erhalt der Gewebestruktur diagnostiziert werden. Dadurch können die Proben anschließend für die Verifizierung mittels Kongorotfärbung oder für andere ergänzende histochemische Untersuchungen genutzt werden.
- (3) Des Weiteren können so, im Gegensatz zur LMD-LC-MS/MS⁶⁷, die Verteilung der Amyloidablagerungen im Gewebeschnitt direkt über die Peptidmasse 968,55 m/z von ApoE dargestellt werden. Beim Export der spektralen Daten zur statistischen Analyse kann daher ebenfalls auf die Kongorotfärbung eines Serienschnittes verzichtet werden (Abbildung 35b,c).
- (4) Aufgrund dessen, dass für Peptide von Proteinen, die charakteristisch für Amyloidablagerungen sind, ähnliche Bilder erhalten werden wie für das ApoE-Peptid (968,55 m/z), kann der Korrelationskoeffizient für ein Screening der MSI Daten genutzt werden, um neue potentielle Biomarker für Amyloidosen zu entdecken. Nachdem die Peptide mittels MS/MS Analyse eindeutig identifiziert wurden, können sie in die Peptidliste des Filters zur Verbesserung der Diagnose von Amyloidosen aufgenommen werden.

- (5) Ferner könnte sich aus retrospektiven Studien der MSI Daten ergeben, dass es sich bei diesen Peptiden, ähnlich zu den SAP-Peptiden in Kapitel 6.4, um potentielle Marker zur Unterscheidung der Amyloidosen handelt. Dies ermöglicht sowohl die Entwicklung neuer als auch verbesserter SVM Klassifizierungsmodelle. Des Weiteren kann darüber auch die Proteinzusammensetzung von Amyloiden untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die komplexe Pathogenese von Amyloidosen zu erlangen.
- (6) Die Ergebnisse in Kapitel 6.3 haben gezeigt, dass VTN ungleichmäßig in den Amyloidablagerungen verteilt ist. MALDI-IMS MSI Messungen mit höherer lateraler Auflösung könnten eine heterogene Verteilung der Proteinzusammensetzung innerhalb der Amyloidablagerungen sichtbar machen. Dadurch wäre es möglich sogenannte *Tissue Remodeling* (gewebeverändernde) Prozesse während der Akkumulation von Amyloidfibrillen detaillierter zu untersuchen.
- (7) Für die Amyloiddiagnostik wird ein einzelner 2 µm dicker Gewebeschnitt benötigt, wodurch der Probenverbrauch gegenüber den bisherigen massenspektrometrischen Methoden auf ein Fünftel reduziert wird (Abbildung 35). Im Vergleich zur IHC, in der mindestens neun Serienschnitte (2 µm) für die Klassifizierung gefärbt werden müssen⁵¹, wird der Probenverbrauch noch stärker reduziert, wohingegen sich der zeitliche Aufwand mit ca. 8 h lediglich verdoppelt (persönliche Information Sandra Krüger, Institut für Pathologie Kiel).

Zusammenfassend kann MALDI-IMS MSI als unabhängige analytische Methode für die Identifizierung und Klassifizierung von Amyloidosen in FFPE Gewebeschnitten angewendet werden. Die Einführung des MDIC-Peptidfilters ermöglicht ein einfacheres Verfahren zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung von Amyloiden und birgt großes Potential, neue Biomarker für Amyloidosen zu entdecken. Des Weiteren ist bisher wenig bekannt darüber ob und inwiefern die einzelnen Komponenten der Amyloidablagerungen einen Einfluss auf die Ausbildung von Amyloidfibrillen haben. Das hier entwickelte Verfahren könnte dabei helfen, die komplexen Prozesse der Amyloidogenese aufzuklären und würde somit zur Entwicklung neuer Medikamente und therapeutischer Strategien beitragen.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential der bildgebenden Massenspektrometrie als unabhängige analytische Methode für die Amyloiddiagnostik demonstriert. Durch die Implementierung des MDIC-Filters in die Auswertung von MALDI-IMS MSI Messungen wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem AL λ - und ATTR-Amyloidosen in FFPE Herzgewebe mit hoher Sensitivität und Spezifität sowohl identifiziert als auch klassifiziert werden können. Um diese Methode weiter zu validieren, müssen in zukünftigen Studien weitere histoanatomische Lokalisationen, wie beispielsweise der Gastrointestinaltrakt, auf die beiden Amyloidtypen untersucht werden. Des Weiteren kann dadurch gleichzeitig überprüft werden, ob für die beiden Amyloidtypen zudem gewebespezifische Unterschiede in der Proteinzusammensetzung existieren. Für eine detailliertere Untersuchung, die über die bisherigen sechs Proteine (ApoAI, ApoE, SAA, SAP, TTR, VTN) hinausgeht, müsste zunächst die Peptidliste des Filters, wie in Kapitel 6.5 diskutiert, erweitert werden.

Ferner kann die Anwendung dieses Verfahrens künftig auch auf andere Amyloidosen ausgeweitet werden. Dafür müssten mit MALDI-IMS MSI zunächst repräsentative Fälle gemessen werden, um herauszufinden welche Peptide der jeweiligen amyloido-genen Proteine in den Amyloidablagerungen nachgewiesen werden können. Anschließend sollte mittels MS/MS Experimenten eine eindeutige Identifizierung dieser Peptide erfolgen, bevor sie in die Liste des Peptidfilters aufgenommen werden.

Casadonte *et al.*¹⁷⁵ haben in ihren Arbeiten in Nierenbiopsien mit AL κ -Amyloidose tryptische Peptide der κ -Leichtkette des Immunglobulins identifiziert und für die Erstellung eines Klassifizierungsmodells verwendet. Für die λ -Leichtkette des Immunglobulins konnten hingegen in den hier untersuchten Herzproben mit AL λ -Amyloidose keine spezifischen Peptide nachgewiesen werden. Demzufolge könnte es möglich sein, dass sich anhand dieser Peptidmassen ein Klassifizierungsmodell für die beiden AL-Subtypen erstellen lässt. Es ist jedoch zu beachten, dass in beiden Studien sowohl unterschiedliche HIAR-Behandlungen (Temperatur, Inkubationsdauer, Pufferlösung) bei der Probenvorbereitung durchgeführt als auch verschiedene Gewebearten analysiert

wurden. Daher sollte vorher überprüft werden, ob und inwiefern dies eine Auswirkung auf die Peptidsignale der κ -Leichtkette hat.

Eine weitere interessante potentielle Anwendungsmöglichkeit der hier vorgestellten Methode ist die Unterscheidung systemischer von lokalen AL-Amyloidosen. In der Histologie ist dies häufig mit einem hohen Aufwand verbunden und nur durch die Erhebung zusätzlicher klinischer Daten möglich (persönliche Mitteilung C. Röcken). MALDI-IMS MSI könnte auch hier genutzt werden, um Unterschiede in der Protein-zusammensetzung aufzudecken und so letztendlich ein einfacheres Verfahren für die Differenzierung zu ermöglichen.

In den MALDI-IMS MSI Messungen wurde für die Ionenmobilitätstrennung ein fester Wert für die Wellengeschwindigkeit eingestellt. Stattdessen kann für diesen Parameter auch ein Gradient verwendet werden, um die Trennung der Analyten weiter zu optimieren. Eine Änderung der Wellengeschwindigkeit hätte jedoch zur Folge, dass für die Peptide andere Driftzeiten erhalten werden. Die bisherigen Referenzwerte des MDIC-Filters würden daher nicht mehr greifen und müssten erneut ermittelt werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist, statt der Driftzeiten die CCS-Werte zu nutzen. Dafür müsste bei jedem Experiment zusätzlich ein Standard gemessen werden, der Verbindungen mit bekannter CCS enthält, so dass die erhaltenen Driftzeiten der Peptide in CCS-Werte umgerechnet werden können. Im Gegensatz zur Driftzeit stellt die CCS eine unabhängige Messgröße dar, so dass die Wellengeschwindigkeit zukünftig beliebig geändert werden kann.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Tanskanen M.: "Amyloid" — Historical Aspects. Amyloidosis. Edited by Feng D. 1st Edition. London, IntechOpen, 2013. pp. 3-24.
- [2] Sipe J.D., Cohen A.S.: Review: History of the Amyloid Fibril. *J Struct Biol* 2000, 130:88-98.
- [3] Röcken C., Eriksson M.: Amyloid and Amyloidoses. *Pathologe* 2009, 30:182-92.
- [4] Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C.F.: Common Core Structure of Amyloid Fibrils by Synchrotron X-ray Diffraction. *J Mol Biol* 1997, 273:729-39.
- [5] Eanes E.D., Glenner G.G.: X-ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *J Histochem Cytochem* 1968, 16:673-7.
- [6] Sawaya M.R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M.I., Sievers S.A., Apostol M.I., Thompson M.J., Balbirnie M., Wiltzius J.J., McFarlane H.T., Madsen A.O., Riek C., Eisenberg D.: Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 2007, 447:453-7.
- [7] Lundmark K., Westermark G.T., Olsen A., Westermark P.: Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:6098-102.
- [8] Lundmark K., Westermark G.T., Nystrom S., Murphy C.L., Solomon A., Westermark P.: Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:6979-84.
- [9] Merlini G., Bellotti V.: Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N Engl J Med* 2003, 349:583-96.
- [10] Puchtler H., Sweat F., Levine M.: On the Binding of Congo Red by Amyloid. *J Histochem Cytochem* 1962, 10:355-64.
- [11] Howie A.J., Brewer D.B.: Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron* 2009, 40:285-301.
- [12] Howie A.J., Brewer D.B., Howell D., Jones A.P.: Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light. *Lab Invest* 2008, 88:232-42.

- [13] Westermark P., Benson M.D., Buxbaum J.N., Cohen A.S., Frangione B., Ikeda S., Masters C.L., Merlini G., Saraiva M.J., Sipe J.D.: A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid* 2007, 14:179-83.
- [14] Chiti F., Dobson C.M.: Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006, 75:333-66.
- [15] Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S.I., Merlini G., Saraiva M.J., Westermark P.: Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* 2016, 23:209-13.
- [16] Kazatchkine M.D., Husby G., Araki S., Benditt E.P., Benson M.D., Cohen A.S., Frangione B., Glenner G.G., Natvig J.B., Westermark P.: Nomenclature of amyloid and amyloidosis. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. *Bull Who* 1993, 71:105-12.
- [17] Knowles T.P., Vendruscolo M., Dobson C.M.: The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15:384-96.
- [18] Dobson C.M., Karplus M.: The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* 1999, 9:92-101.
- [19] Schultz C.P.: Illuminating folding intermediates. *Nat Struct Biol* 2000, 7:7-10.
- [20] Saraiva M.J.M.: Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Letters* 2001, 498:201-3.
- [21] Verdone G., Corazza A., Viglino P., Pettirossi F., Giorgetti S., Mangione P., Andreola A., Stoppini M., Bellotti V., Esposito G.: The solution structure of human beta2-microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Sci* 2002, 11:487-99.
- [22] Abrahamson M., Grubb A.: Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68 --> Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:1416-20.
- [23] Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C., Terry C.J., Feest T.G., Zalin A.M., Hsuan J.J.:

- Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 1993, 362:553-7.
- [24] Buxbaum J.N., Tagoe C.E.: The genetics of the amyloidoses. *Annu Rev Med* 2000, 51:543-69.
- [25] Comenzo R.L., Wally J., Kica G., Murray J., Ericsson T., Skinner M., Zhang Y.: Clonal immunoglobulin light chain variable region germline gene use in AL amyloidosis: association with dominant amyloid-related organ involvement and survival after stem cell transplantation. *Brit J Haematol* 1999, 106:744-51.
- [26] Hardy J., Selkoe D.J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002, 297:353-6.
- [27] Chayen N.E.: Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Prog Biophys Mol Biol* 2005, 88:329-37.
- [28] Serio T.R.: Nucleated Conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. *Science* 2000, 289:1317-21.
- [29] Morozova-Roche L.A., Zurdo J., Spencer A., Noppe W., Receveur V., Archer D.B., Joniau M., Dobson C.M.: Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. *J Struct Biol* 2000, 130:339-51.
- [30] Jarrett J.T., Lansbury P.T.: Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993, 73:1055-8.
- [31] Naiki H., Hashimoto N., Suzuki S., Kimura H., Nakakuki K., Gejyo F.: Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 2009, 4:223-32.
- [32] Sorby R., Espenes A., Landsverk T., Westermark G.: Rapid induction of experimental AA amyloidosis in mink by intravenous injection of amyloid enhancing factor. *Amyloid* 2008, 15:20-8.
- [33] Solomon A., Richey T., Murphy C.L., Weiss D.T., Wall J.S., Westermark G.T., Westermark P.: Amyloidogenic potential of foie gras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:10998-1001.
- [34] Uversky V.N., Li J., Souillac P., Millett I.S., Doniach S., Jakes R., Goedert M., Fink A.L.: Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate:

- inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem* 2002, 277:11970-8.
- [35] Pedersen J.S., Christensen G., Otzen D.E.: Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J Mol Biol* 2004, 341:575-88.
- [36] Bellotti V., Chiti F.: Amyloidogenesis in its biological environment: challenging a fundamental issue in protein misfolding diseases. *Curr Opin Struct Biol* 2008, 18:771-9.
- [37] Dogan A.: Amyloidosis: Insights from Proteomics. *Annu Rev Pathol* 2017, 12:277-304.
- [38] Hirschfield G.M., Hawkins P.N.: Amyloidosis: new strategies for treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 2003, 35:1608-13.
- [39] Alexandrescu A.T.: Amyloid accomplices and enforcers. *Protein Sci* 2005, 14:1-12.
- [40] Müller D., Roessner A., Röcken C.: Distribution pattern of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and α 2-macroglobulin in cases of generalized AA- and AL amyloidosis. *Virchows Arch* 2000, 437:521-7.
- [41] Relini A., Canale C., De Stefano S., Rolandi R., Giorgetti S., Stoppini M., Rossi A., Fogolari F., Corazza A., Esposito G., Gliozzi A., Bellotti V.: Collagen plays an active role in the aggregation of beta2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis. *J Biol Chem* 2006, 281:16521-9.
- [42] Yamamoto S., Yamaguchi I., Hasegawa K., Tsutsumi S., Goto Y., Gejyo F., Naiki H.: Glycosaminoglycans Enhance the Trifluoroethanol-Induced Extension of 2-Microglobulin-Related Amyloid Fibrils at a Neutral pH. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:126-33.
- [43] Harris D.L., King E., Ramsland P.A., Edmundson A.B.: Binding of nascent collagen by amyloidogenic light chains and amyloid fibrillogenesis in monolayers of human fibrocytes. *J Mol Recognit* 2000, 13:198-212.
- [44] McLaughlin R.W., De Stigter J.K., Sikkink L.A., Baden E.M., Ramirez-Alvarado M.: The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. *Protein Sci* 2006, 15:1710-22.

- [45] Merlini G., Seldin D.C., Gertz M.A.: Amyloidosis: pathogenesis and new therapeutic options. *J Clin Oncol* 2011, 29:1924-33.
- [46] Holmgren G., Steen L., Suhr O., Ericzon B.G., Groth C.G., Andersen O., Wallin B.G., Seymour A., Richardson S., Hawkins P.N., Pepys M.B.: Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 1993, 341:1113-6.
- [47] Gertz M.A., Benson M.D., Dyck P.J., Grogan M., Coelho T., Cruz M., Berk J.L., Plante-Bordeneuve V., Schmidt H.H., Merlini G.: Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2015, 66:2451-66.
- [48] Picken M.M.: Amyloidosis—Where Are We Now and Where Are We Heading? *Arch Pathol Lab Med* 2010, 134:545-51.
- [49] Leung N., Nasr S.H., Sethi S.: How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing. *Blood* 2012, 120:3206-13.
- [50] Linke R.P.: Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch* 2000, 436:439-48.
- [51] Kebbel A., Röcken C.: Immunohistochemical Classification of Amyloid in Surgical Pathology Revisited. *Am J Surg Pathol* 2006, 30:673-83.
- [52] Linke R.P.: On typing amyloidosis using immunohistochemistry. Detailed illustrations, review and a note on mass spectrometry. *Prog Histochem Cytochem* 2012, 47:61-132.
- [53] Linke R.P., Oos R., Wiegel N.M., Nathrath W.B.: Classification of amyloidosis: misdiagnosing by way of incomplete immunohistochemistry and how to prevent it. *Acta Histochem* 2006, 108:197-208.
- [54] Solomon A., Murphy C.L., Westermark P.: Unreliability of Immunohistochemistry for Typing Amyloid Deposits. *Arch Pathol Lab Med* 2008, 132:14-5.
- [55] Picken M.M.: New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007, 16:196-203.
- [56] Picken M.M., Herrera G.A.: The Burden of "Sticky" Amyloid: Typing Challenges. *Arch Pathol Lab Med* 2007, 131:850-1.
- [57] Gilbertson J.A., Theis J.D., Vrana J.A., Lachmann H., Wechalekar A., Whelan C., Hawkins P.N., Dogan A., Gillmore J.D.: A comparison of immunohistochemistry

- and mass spectrometry for determining the amyloid fibril protein from formalin-fixed biopsy tissue. *J Clin Pathol* 2015, 68:314-7.
- [58] Linke R.P.: Amyloid typing using antisera to prototype fibril proteins. A brief note. *Mech Ageing Dev* 1980, 14:187-90.
- [59] Layfield R., Bailey K., Lowe J., Allibone R., Mayer R.J., Landon M.: Extraction and Protein Sequencing of Immunoglobulin Light Chain from Formalin-Fixed Cerebrovascular Amyloid Deposits. *J Pathol* 1996, 180:455-9.
- [60] Westermark P., Benson L., Juul J., Sletten K.: Use of subcutaneous abdominal fat biopsy specimen for detailed typing of amyloid fibril protein-AL by amino acid sequence analysis. *J Clin Pathol* 1989, 42:817-9.
- [61] Stoppini M., Obici L., Lavatelli F., Giorgetti S., Marchese L., Moratti R., Bellotti V., Merlini G.: Proteomics in protein misfolding diseases. *Clin Chem Lab Med* 2009, 47:627-35.
- [62] Brambilla F., Lavatelli F., Di Silvestre D., Valentini V., Rossi R., Palladini G., Obici L., Verga L., Mauri P., Merlini G.: Reliable typing of systemic amyloidoses through proteomic analysis of subcutaneous adipose tissue. *Blood* 2012, 119:1844-7.
- [63] Lavatelli F., Perlman D.H., Spencer B., Prokaeva T., McComb M.E., Theberge R., Connors L.H., Bellotti V., Seldin D.C., Merlini G., Skinner M., Costello C.E.: Amyloidogenic and associated proteins in systemic amyloidosis proteome of adipose tissue. *Mol Cell Proteomics* 2008, 7:1570-83.
- [64] Klein C.J., Vrana J.A., Theis J.D., Dyck P.J., Dyck P.J.B., Spinner R.J., Mauermann M.L., Bergen H.R., 3rd, Zeldenrust S.R., Dogan A.: Mass Spectrometric-Based Proteomic Analysis of Amyloid Neuropathy Type in Nerve Tissue. *Arch Neurol* 2011, 68:195-9.
- [65] Nasr S.H., Said S.M., Valeri A.M., Sethi S., Fidler M.E., Cornell L.D., Gertz M.A., Dispenzieri A., Buadi F.K., Vrana J.A., Theis J.D., Dogan A., Leung N.: The diagnosis and characteristics of renal heavy-chain and heavy/light-chain amyloidosis and their comparison with renal light-chain amyloidosis. *Kidney Int* 2013, 83:463-70.

- [66] Said S.M., Reynolds C., Jimenez R.E., Chen B., Vrana J.A., Theis J.D., Dogan A., Shah S.S.: Amyloidosis of the breast: predominantly AL type and over half have concurrent breast hematologic disorders. *Mod Pathol* 2013, 26:232-8.
- [67] Sethi S., Vrana J.A., Theis J.D., Leung N., Sethi A., Nasr S.H., Fervenza F.C., Cornell L.D., Fidler M.E., Dogan A.: Laser microdissection and mass spectrometry-based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney Int* 2012, 82:226-34.
- [68] Vrana J.A., Gamez J.D., Madden B.J., Theis J.D., Bergen H.R., 3rd, Dogan A.: Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 2009, 114:4957-9.
- [69] Karas M., Hillenkamp F.: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988, 60:2299-301.
- [70] Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.: Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* 1985, 57:2935-9.
- [71] Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S., Whitehouse C.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246:64-71.
- [72] Caprioli R.M., Farmer T.B., Gile J.: Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997, 69:4751-60.
- [73] Stoeckli M., Chaurand P., Hallahan D.E., Caprioli R.M.: Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 2001, 7:493-6.
- [74] Römpf A., Spengler B.: Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem Cell Biol* 2013, 139:759-83.
- [75] Chaurand P., Schwartz S.A., Billheimer D., Xu B.J., Crecelius A., Caprioli R.M.: Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2004, 76:1145-55.
- [76] Jones E.A., Shyti R., van Zeijl R.J., van Heiningen S.H., Ferrari M.D., Deelder A.M., Tolner E.A., van den Maagdenberg A.M., McDonnell L.A.: Imaging mass

- spectrometry to visualize biomolecule distributions in mouse brain tissue following hemispheric cortical spreading depression. *J Proteomics* 2012, 75:5027-35.
- [77] Reyzer M.L., Caprioli R.M.: MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr Opin Chem Biol* 2007, 11:29-35.
- [78] Chen R., Jiang X., Conaway M.C., Mohtashemi I., Hui L., Viner R., Li L.: Mass spectral analysis of neuropeptide expression and distribution in the nervous system of the lobster *Homarus americanus*. *J Proteome Res* 2010, 9:818-32.
- [79] Jackson S.N., Ugarov M., Egan T., Post J.D., Langlais D., Albert Schultz J., Woods A.S.: MALDI-ion mobility-TOFMS imaging of lipids in rat brain tissue. *J Mass Spectrom* 2007, 42:1093-8.
- [80] Stoeckli M., Staab D., Schweitzer A.: Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. *Int J Mass Spectrom* 2007, 260:195-202.
- [81] Schwamborn K., Krieg R., Reska M., Jakse G., Knuechel R., Wellmann A.: Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. *Int J Mol Med* 2007.
- [82] Balluff B., Rauser S., Meding S., Elsner M., Schone C., Feuchtinger A., Schuhmacher C., Novotny A., Jutting U., Maccarrone G., Sarioglu H., Ueffing M., Braselmann H., Zitzelsberger H., Schmid R.M., Hofler H., Ebert M.P., Walch A.: MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. *Am J Pathol* 2011, 179:2720-9.
- [83] Elsner M., Rauser S., Maier S., Schone C., Balluff B., Meding S., Jung G., Nipp M., Sarioglu H., Maccarrone G., Aichler M., Feuchtinger A., Langer R., Jutting U., Feith M., Kuster B., Ueffing M., Zitzelsberger H., Hofler H., Walch A.: MALDI imaging mass spectrometry reveals COX7A2, TAGLN2 and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett's adenocarcinoma. *J Proteomics* 2012, 75:4693-704.
- [84] Kang S., Shim H.S., Lee J.S., Kim D.S., Kim H.Y., Hong S.H., Kim P.S., Yoon J.H., Cho N.H.: Molecular proteomics imaging of tumor interfaces by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2010, 9:1157-64.
- [85] Kang S., Maeng H., Kim B.G., Qing G.M., Choi Y.P., Kim H.Y., Kim P.S., Kim Y., Kim Y.H., Choi Y.D., Cho N.H.: In situ identification and localization of IGHA2 in

- the breast tumor microenvironment by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012, 11:4567-74.
- [86] Meding S., Nitsche U., Balluff B., Elsner M., Rauser S., Schone C., Nipp M., Maak M., Feith M., Ebert M.P., Friess H., Langer R., Hofler H., Zitzelsberger H., Rosenberg R., Walch A.: Tumor classification of six common cancer types based on proteomic profiling by MALDI imaging. *J Proteome Res* 2012, 11:1996-2003.
- [87] Agar N.Y., Malcolm J.G., Mohan V., Yang H.W., Johnson M.D., Tannenbaum A., Agar J.N., Black P.M.: Imaging of meningioma progression by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2010, 82:2621-5.
- [88] Djidja M.C., Claude E., Snel M.F., Francese S., Scriven P., Carolan V., Clench M.R.: Novel molecular tumour classification using MALDI-mass spectrometry imaging of tissue micro-array. *Anal Bioanal Chem* 2010, 397:587-601.
- [89] Kriegsmann M., Casadonte R., Kriegsmann J., Dienemann H., Schirmacher P., Hendrik Kobarg J., Schwamborn K., Stenzinger A., Warth A., Weichert W.: Reliable Entity Subtyping in Non-small Cell Lung Cancer by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry on Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Specimens. *Mol Cell Proteomics* 2016, 15:3081-9.
- [90] Marko-Varga G., Fehniger T.E., Rezeli M., Dome B., Laurell T., Vegvari A.: Drug localization in different lung cancer phenotypes by MALDI mass spectrometry imaging. *J Proteomics* 2011, 74:982-92.
- [91] Vegvari A., Fehniger T.E., Rezeli M., Laurell T., Dome B., Jansson B., Welinder C., Marko-Varga G.: Experimental models to study drug distributions in tissue using MALDI mass spectrometry imaging. *J Proteome Res* 2013, 12:5626-33.
- [92] Vegvari A., Shavkunov A.S., Fehniger T.E., Grabau D., Nimeus E., Marko-Varga G.: Localization of tamoxifen in human breast cancer tumors by MALDI mass spectrometry imaging. *Clin Transl Med* 2016, 5:10.
- [93] Bianga J., Bouslimani A., Bec N., Quenet F., Mounicou S., Szpunar J., Bouyssiére B., Lobinski R., Larroque C.: Complementarity of MALDI and LA ICP mass spectrometry for platinum anticancer imaging in human tumor. *Metallomics* 2014, 6:1382-6.

- [94] Rompp A., Guenther S., Takats Z., Spengler B.: Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space (HR(2) MSI) for reliable investigation of drug compound distributions on the cellular level. *Anal Bioanal Chem* 2011, 401:65-73.
- [95] Buck A., Halbritter S., Spath C., Feuchtinger A., Aichler M., Zitzelsberger H., Janssen K.P., Walch A.: Distribution and quantification of irinotecan and its active metabolite SN-38 in colon cancer murine model systems using MALDI MSI. *Anal Bioanal Chem* 2015, 407:2107-16.
- [96] Stauber J., Lemaire R., Franck J., Bonnel D., Croix D., Day R., Wisztorski M., Fournier I., Salzet M.: MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res* 2008, 7:969-78.
- [97] Rohner T.C., Staab D., Stoeckli M.: MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech Ageing Dev* 2005, 126:177-85.
- [98] Pol J., Strohal M., Havlicek V., Volny M.: Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. *Histochem Cell Biol* 2010, 134:423-43.
- [99] Chughtai K., Heeren R.M.A.: Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis. *Chem Rev* 2010, 110:3237-77.
- [100] Loboda A.V., Krutchinsky A.N., Bromirski M., Ens W., Standing K.G.: A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000, 14:1047-57.
- [101] Pringle S.D., Giles K., Wildgoose J.L., Williams J.P., Slade S.E., Thalassinos K., Bateman R.H., Bowers M.T., Scrivens J.H.: An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. *Int J Mass Spectrom* 2007, 261:1-12.
- [102] Paizs B., Suhai S.: Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev* 2005, 24:508-48.
- [103] Kiss A., Heeren R.M.: Size, weight and position: ion mobility spectrometry and imaging MS combined. *Anal Bioanal Chem* 2011, 399:2623-34.

- [104] Ruotolo B.T., Benesch J.L., Sandercock A.M., Hyung S.J., Robinson C.V.: Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat Protoc* 2008, 3:1139-52.
- [105] Giles K., Pringle S.D., Worthington K.R., Little D., Wildgoose J.L., Bateman R.H.: Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004, 18:2401-14.
- [106] Clemmer D.E., Hudgins R.R., Jarrold M.F.: Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase. *J Am Chem Soc* 1995, 117:10141-2.
- [107] Ruotolo B.T., Giles K., Campuzano I., Sandercock A.M., Bateman R.H., Robinson C.V.: Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science* 2005, 310:1658-61.
- [108] Uetrecht C., Rose R.J., van Duijn E., Lorenzen K., Heck A.J.: Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies. *Chem Soc Rev* 2010, 39:1633-55.
- [109] Jackson S.N., Wang H.Y., Woods A.S., Ugarov M., Egan T., Schultz J.A.: Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion mobility-TOFMS. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005, 16:133-8.
- [110] Ridenour W.B., Kliman M., McLean J.A., Caprioli R.M.: Structural characterization of phospholipids and peptides directly from tissue sections by MALDI traveling-wave ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* 2010, 82:1881-9.
- [111] Dwivedi P., Bendiak B., Clowers B.H., Hill H.H., Jr.: Rapid resolution of carbohydrate isomers by electrospray ionization ambient pressure ion mobility spectrometry-time-of-flight mass spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS). *J Am Soc Mass Spectrom* 2007, 18:1163-75.
- [112] Plasencia M.D., Isailovic D., Merenbloom S.I., Mechref Y., Novotny M.V., Clemmer D.E.: Resolving and assigning N-linked glycan structural isomers from ovalbumin by IMS-MS. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008, 19:1706-15.
- [113] Riba-Garcia I., Giles K., Bateman R.H., Gaskell S.J.: Evidence for structural variants of a- and b-type peptide fragment ions using combined ion mobility/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008, 19:609-13.

- [114] Woods A.S., Ugarov M., Egan T., Koomen J., Gillig K.J., Fuhrer K., Gonin M., Schultz J.A.: Lipid/peptide/nucleotide separation with MALDI-ion mobility-TOF MS. *Anal Chem* 2004, 76:2187-95.
- [115] Fenn L.S., Kliman M., Mahsut A., Zhao S.R., McLean J.A.: Characterizing ion mobility-mass spectrometry conformation space for the analysis of complex biological samples. *Anal Bioanal Chem* 2009, 394:235-44.
- [116] Trim P.J., Henson C.M., Avery J.L., McEwen A., Snel M.F., Claude E., Marshall P.S., West A., Princivale A.P., Clench M.R.: Matrix-assisted laser desorption/ionization-ion mobility separation-mass spectrometry imaging of vinblastine in whole body tissue sections. *Anal Chem* 2008, 80:8628-34.
- [117] Stauber J., MacAleese L., Franck J., Claude E., Snel M., Kaletas B.K., Wiel I.M., Wisztorski M., Fournier I., Heeren R.M.: On-tissue protein identification and imaging by MALDI-ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010, 21:338-47.
- [118] Djidja M.C., Claude E., Snel M.F., Scriven P., Francese S., Carolan V., Clench M.R.: MALDI-ion mobility separation-mass spectrometry imaging of glucose-regulated protein 78 kDa (Grp78) in human formalin-fixed, paraffin-embedded pancreatic adenocarcinoma tissue sections. *J Proteome Res* 2009, 8:4876-84.
- [119] Adler J., Parmryd I.: Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry A* 2010, 77:733-42.
- [120] Pontil M., Verri A.: Properties of Support Vector Machines. *Neural Computation* 1998, 10:955-74.
- [121] Yumlu S., Barany R., Eriksson M., Röcken C.: Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report. *Hum Pathol* 2009, 40:1655-60.
- [122] Gioeva Z., Urban P., Meliss R.R., Haag J., Axmann H.D., Siebert F., Becker K., Radtke H.G., Röcken C.: ATTR amyloid in the carpal tunnel ligament is frequently of wildtype transthyretin origin. *Amyloid* 2013, 20:1-6.

- [123] Schönland S.O., Hegenbart U., Bochtler T., Mangatter A., Hansberg M., Ho A.D., Lohse P., Röcken C.: Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood* 2012, 119:488-93.
- [124] Knochenmuss R.: Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* 2006, 131:966-86.
- [125] Dreisewerd K., Schürenberg M., Karas M., Hillenkamp F.: Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 1995, 141:127-48.
- [126] Westmacott G., Ens W., Hillenkamp F., Dreisewerd K., Schürenberg M.: The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 2002, 221:67-81.
- [127] Yau P.Y., Dominic Chan T.W., Cullis P.G., Colburn A.W., Derrick P.J.: Threshold fluences for production of positive and negative ions in matrix-assisted laser desorption/ionisation using liquid and solid matrices. *Chem Phys Lett* 1993, 202:93-100.
- [128] Demirev P., Westman A., Reimann C.T., Håkansson P., Barofsky D., Sundqvist B.U.R., Cheng Y.D., Seibt W., Siegbahn K.: Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1992, 6:187-91.
- [129] Riahi K., Bolbach G., Brunot A., Breton F., Spiro M., Blais J.-C.: Influence of laser focusing in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994, 8:242-7.
- [130] Dreisewerd K.: The desorption process in MALDI. *Chem Rev* 2003, 103:395-426.
- [131] Cramer R., Dreisewerd K.: UV Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization: Principles, Instrumentation and Applications. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. Edited by Gross M.L., Caprioli R.M. 1st Edition, Elsevier Science, 2007. pp. 646-61.
- [132] Krutchinsky A.N., Chait B.T.: On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002, 13:129-34.
- [133] Tabrizchi M., Rouholahnejad F.: Comparing the effect of pressure and temperature on ion mobilities. *J Phys D: Appl Phys* 2005, 38:857-62.

- [134] Michaelevski I., Kirshenbaum N., Sharon M.: T-wave ion mobility-mass spectrometry: basic experimental procedures for protein complex analysis. *J Vis Exp* 2010.
- [135] McLean J.A., Ruotolo B.T., Gillig K.J., Russell D.H.: Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics. *Int J Mass Spectrom* 2005, 240:301-15.
- [136] Schwamborn K., Caprioli R.M.: MALDI imaging mass spectrometry-painting molecular pictures. *Mol Oncol* 2010, 4:529-38.
- [137] D'Amico F., Skarmoutsou E., Stivala F.: State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods* 2009, 341:1-18.
- [138] Seeley E.H., Caprioli R.M.: Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:18126-31.
- [139] Yamashita S.: Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 2007, 41:141-200.
- [140] Casadonte R., Caprioli R.M.: Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc* 2011, 6:1695-709.
- [141] Tucker K.R., Serebryanny L.A., Zimmerman T.A., Rubakhin S.S., Sweedler J.V.: The modified-bead stretched sample method: development and application to MALDI-MS imaging of protein localization in the spinal cord. *Chem Sci* 2011, 2:785-95.
- [142] Enthaler B., Trusch M., Fischer M., Rapp C., Pruns J.K., Vietzke J.P.: MALDI imaging in human skin tissue sections: focus on various matrices and enzymes. *Anal Bioanal Chem* 2013, 405:1159-70.
- [143] Cillero-Pastor B., Heeren R.M.: Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging for peptide and protein analyses: a critical review of on-tissue digestion. *J Proteome Res* 2014, 13:325-35.
- [144] Groseclose M.R., Andersson M., Hardesty W.M., Caprioli R.M.: Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007, 42:254-62.

- [145] De Sio G., Smith A.J., Galli M., Garancini M., Chinello C., Bono F., Pagni F., Magni F.: A MALDI-Mass Spectrometry Imaging method applicable to different formalin-fixed paraffin-embedded human tissues. *Mol Biosyst* 2015, 11:1507-14.
- [146] Djidja M.C., Francese S., Loadman P.M., Sutton C.W., Scriven P., Claude E., Snel M.F., Franck J., Salzet M., Clench M.R.: Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections. *Proteomics* 2009, 9:2750-63.
- [147] Lemaire R., Tabet J.C., Ducoroy P., Hendra J.B., Salzet M., Fournier I.: Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 2006, 78:809-19.
- [148] Bonnel D., Franck J., Meriaux C., Salzet M., Fournier I.: Ionic matrices pre-spotted matrix-assisted laser desorption/ionization plates for patient maker following in course of treatment, drug titration, and MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Biochem* 2013, 434:187-98.
- [149] Heeren R.M., Smith D.F., Stauber J., Kukrer-Kaletas B., MacAleese L.: Imaging mass spectrometry: hype or hope? *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, 20:1006-14.
- [150] Winter M., Tholey A., Krüger S., Schmidt H., Röcken C.: MALDI-mass spectrometry imaging identifies vitronectin as a common constituent of amyloid deposits. *J Histochem Cytochem* 2015, 63:772-9.
- [151] Gallo G., Wisniewski T., Choi-Miura N.H., Ghiso J., Frangione B.: Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *Am J Pathol* 1994, 145:526-30.
- [152] Pepys M.B., Rademacher T.W., Amatayakul-Chantler S., Williams P., Noble G.E., Hutchinson W.L., Hawkins P.N., Nelson S.R., Gallimore J.R., Herbert J.: Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:5602-6.
- [153] Elimova E., Kisilevsky R., Szarek W.A., Ancsin J.B.: Amyloidogenesis recapitulated in cell culture: a peptide inhibitor provides direct evidence for the role of heparan sulfate and suggests a new treatment strategy. *FASEB J* 2004, 18:1749-51.

- [154] Akiyama H., Kawamata T., Dedhar S., McGeer P.L.: Immunohistochemical localization of vitronectin, its receptor and beta-3 integrin in Alzheimer brain tissue. *J Neuroimmunol* 1991, 32:19-28.
- [155] Zanusso G.L., Moretto G., Bonetti B., Monaco S., Rizzuto N.: Complement neoantigen and vitronectin are components of plaques in amyloid AL neuropathy. *Ital J Neurol Sci* 1992, 13:493-9.
- [156] Dahlbäck K., Löfberg H., Dahlbäck B.: Immunohistochemical demonstration of vitronectin in association with elastin and amyloid deposits in human kidney. *Histochemistry* 1987, 87:511-5.
- [157] Jenne D., Hille A., Stanley K.K., Huttner W.B.: Sulfation of two tyrosine-residues in human complement S-protein (vitronectin). *Eur J Biochem* 1989, 185:391-5.
- [158] Seiffert D., Keeton M., Eguchi Y., Sawdey M., Loskutoff D.J.: Detection of vitronectin mRNA in tissues and cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88:9402-6.
- [159] Anderson D.H., Hageman G.S., Mullins R.F., Neitz M., Neitz J., Ozaki S., Preissner K.T., Johnson L.V.: Vitronectin Gene Expression in the Adult Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40:3305-15.
- [160] Hageman G.S., Mullins R.F., Russell S.R., Johnson L.V., Anderson D.H.: Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *FASEB J* 1999, 13:477-84.
- [161] Ozaki S., Johnson L.V., Mullins R.F., Hageman G.S., Anderson D.H.: The Human Retina and Retinal Pigment Epithelium are Abundant Sources of Vitronectin mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 258:524-9.
- [162] Dufourcq P., Louis H., Moreau C., Daret D., Boisseau M.R., Lamaziere J.M.D., Bonnet J.: Vitronectin Expression and Interaction With Receptors in Smooth Muscle Cells From Human Atheromatous Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18:168-76.
- [163] Walker D.G., McGeer P.L.: Vitronectin expression in Purkinje cells in the human cerebellum. *Neurosci Lett* 1998, 251:109-12.

- [164] Hayman E.G., Pierschbacher M.D., Öhgren Y., Ruoslahti E.: Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1983, 80:4003-7.
- [165] Preissner K.T.: Structure and Biological Role of Vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* 1991, 7:275-310.
- [166] Schwartz I., Seger D., Shaltiel S.: Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31:539-44.
- [167] Barnes D.W., Silnutzer J., See C., Shaffer M.: Characterization of human serum spreading factor with monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80:1362-6.
- [168] Basara M.L., McCarthy J.B., Barnes D.W., Furcht L.T.: Stimulation of Haptotaxis and Migration of Tumor Cells by Serum Spreading Factor. *Cancer Res* 1985, 45:2487-94.
- [169] Cherny R.C., Honan M.A., Thiagarajan P.: Site-directed Mutagenesis of the Arginine-Glycine-Aspartic Acid in Vitronectin Abolishes Cell-Adhesion. *J Biol Chem* 1993, 268:9725-9.
- [170] Suzuki S., Pierschbacher M.D., Hayman E.G., Nguyen K., Öhgren Y., Ruoslahti E.: Domain Structure of Vitronectin Alignment of Active Sites. *J Biol Chem* 1984, 259:15307-14.
- [171] Gebb C., Hayman E.G., Engvall E., Ruoslahti E.: Interaction of Vitronectin with Collagen. *J Biol Chem* 1986, 261:6698-703.
- [172] Ishikawa-Sakurai M., Hayashi M.: Two Collagen-binding Domains of Vitronectin. *Cell Struct Funct* 1993, 18:253-9.
- [173] Bronfman F.C., Soto C., Tapia L., Tapia V., Inestrosa N.C.: Extracellular Matrix Regulates the Amount of the b-Amyloid Precursor Protein and Its Amyloidogenic Fragments. *J Cell Physiol* 1996, 166:360-9.
- [174] Shin T.M., Isas J.M., Hsieh C.L., Kaye R., Glabe C.G., Langen R., Chen J.: Formation of soluble amyloid oligomers and amyloid fibrils by the multifunctional protein vitronectin. *Mol Neurodegener* 2008, 3:16.
- [175] Casadonte R., Kriegsmann M., Deininger S.O., Amann K., Paape R., Belau E., Suckau D., Fuchser J., Beckmann J., Becker M., Kriegsmann J.: Imaging mass

- spectrometry analysis of renal amyloidosis biopsies reveals protein co-localization with amyloid deposits. *Anal Bioanal Chem* 2015, 407:5232-331.
- [176] Winter M., Tholey A., Kristen A., Rocken C.: MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Novel Tool for the Identification and Classification of Amyloidosis. *Proteomics* 2017.
- [177] Nakanishi T., Ito M., Nirasawa T., Tsuji M., Takubo T.: Topologies of amyloidogenic proteins in Congo red-positive sliced sections of formalin-fixed paraffin embedded tissues by MALDI-MS imaging coupled with on-tissue tryptic digestion. *Clin Biochem* 2013, 46:1595-600.
- [178] Röcken C., Menard R., Buhling F., Vockler S., Raynes J., Stix B., Krüger S., Roessner A., Kahne T.: Proteolysis of serum amyloid A and AA amyloid proteins by cysteine proteases: cathepsin B generates AA amyloid proteins and cathepsin L may prevent their formation. *Ann Rheum Dis* 2005, 64:808-15.
- [179] Kristen A.V., Brokbals E., Aus dem Siepen F., Bauer R., Hein S., Aurich M., Riffel J., Behrens H.M., Krüger S., Schirmacher P., Katus H.A., Röcken C.: Cardiac Amyloid Load: A Prognostic and Predictive Biomarker in Patients With Light-Chain Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2016, 68:13-24.
- [180] Brambilla F., Lavatelli F., Di Silvestre D., Valentini V., Palladini G., Merlini G., Mauri P.: Shotgun protein profile of human adipose tissue and its changes in relation to systemic amyloidoses. *J Proteome Res* 2013, 12:5642-55.
- [181] Mohammed S.F., Mirzoyev S.A., Edwards W.D., Dogan A., Grogan D.R., Dunlay S.M., Roger V.L., Gertz M.A., Dispenzieri A., Zeldenrust S.R., Redfield M.M.: Left ventricular amyloid deposition in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *JACC Heart Fail* 2014, 2:113-22.

9 Anhang

9.1 Anhang Kapitel 6.2

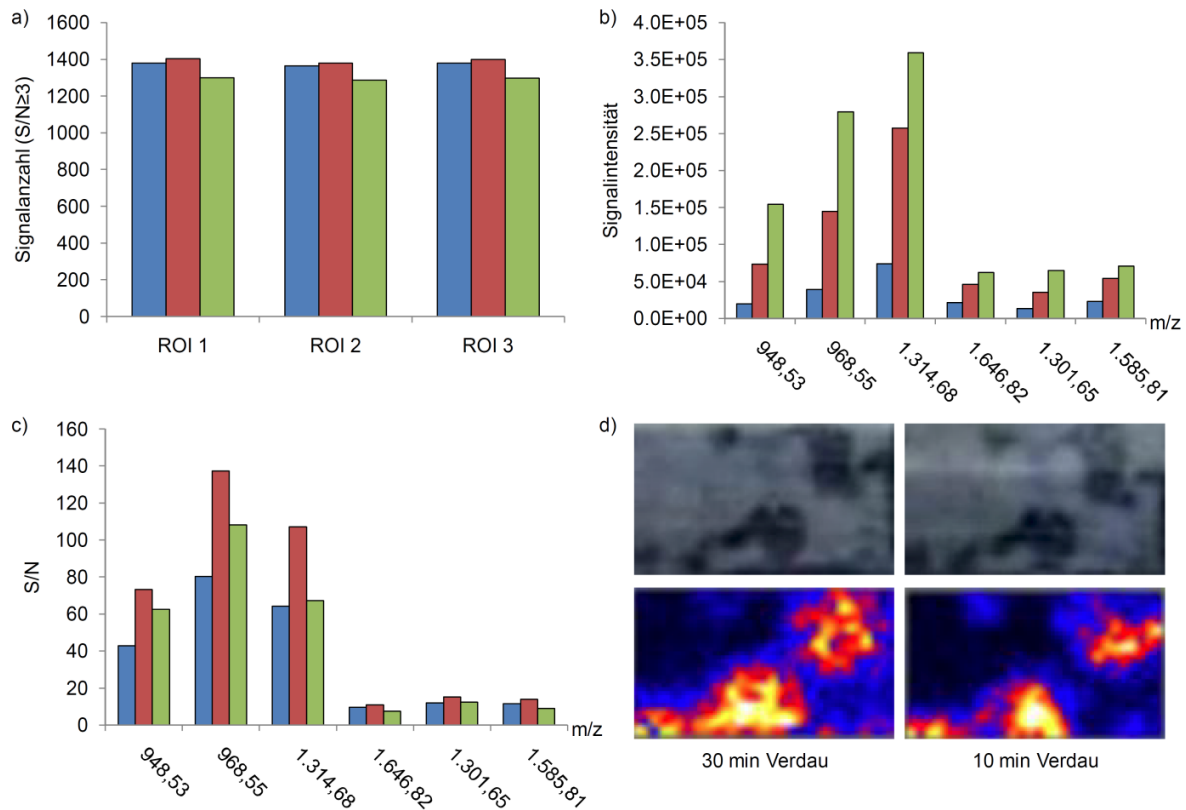


Abbildung A1: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Matrixauftragung erfolgte mit einer CHCA-Konzentration von 5 mg/ml (■), 7,5 mg/ml (■) und 10 mg/ml (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen für den 30-minütigen Verdau ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einer Verdauzeit von 30 min und 10 min anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für 7,5 mg/ml CHCA dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

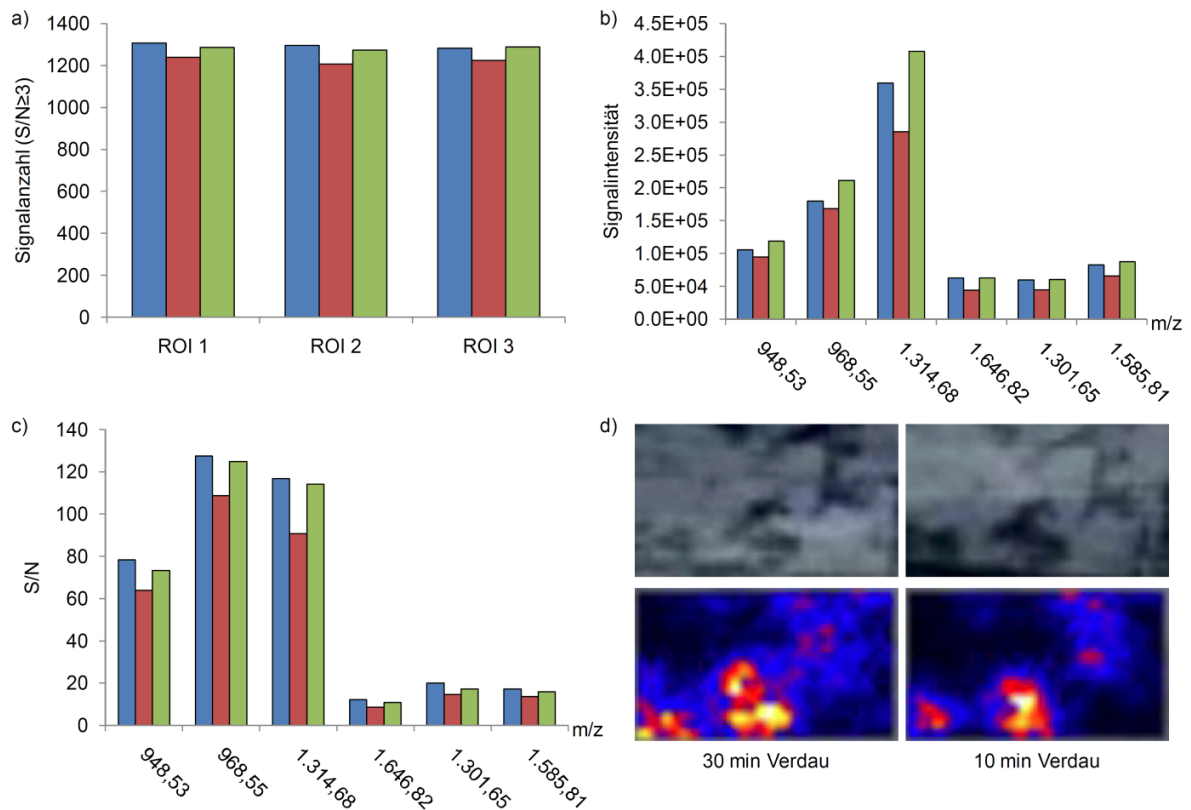


Abbildung A2: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoA1-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Trypsinkonzentrationen und Flussraten für die Trypsinauftragung getestet: 20 µg/ml mit 20 µl/min (■), 20 µg/ml mit 10 µl/min (■) und 10 µg/ml mit 20 µl/min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen für den 30-minütigen Verdau ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation bei einer Verdauzeit von 30 min und 10 min anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für 10 µg/ml Trypsin mit der Flussrate 20 µl/min dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areal (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

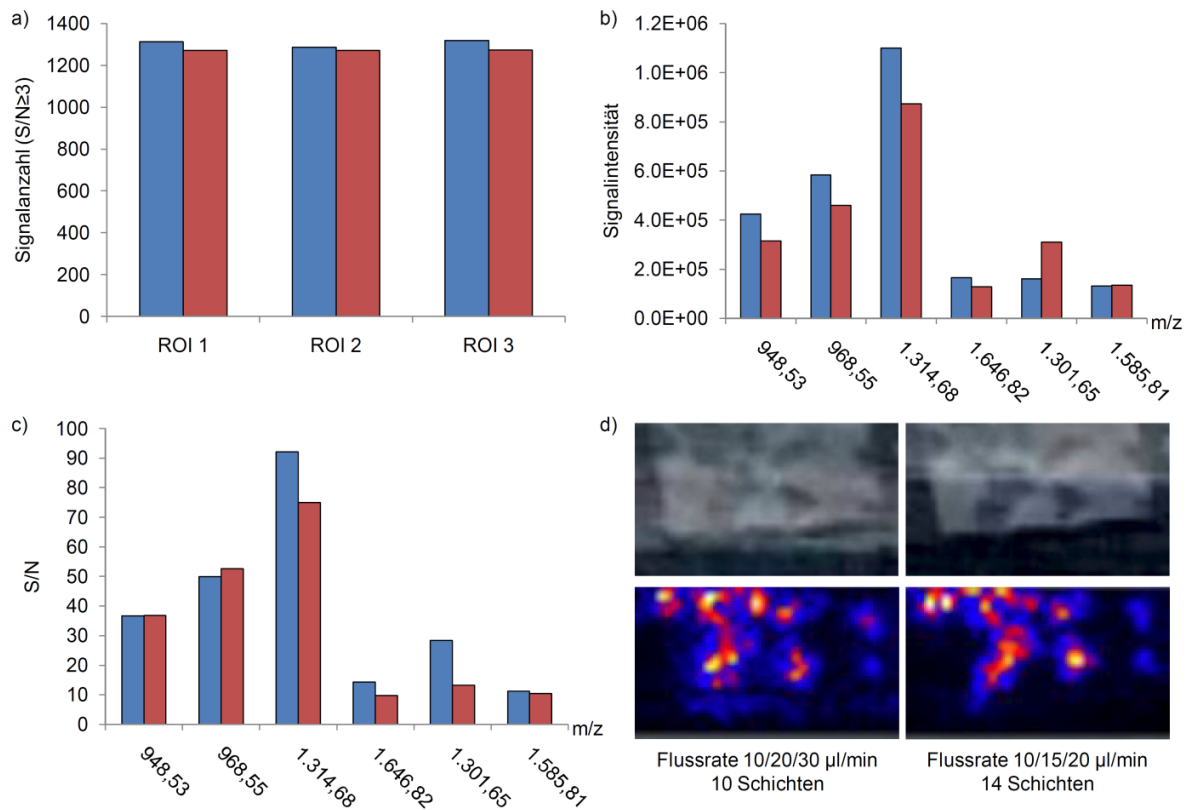


Abbildung A3: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoA1-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Matrixauftragung erfolgte mit den Flussraten 10/20/30 μ l/min über 10 Schichten (■) und 10/15/20 μ l/min über 14 Schichten (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die unterschiedlichen Flussraten bei der Matrixauftragung dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

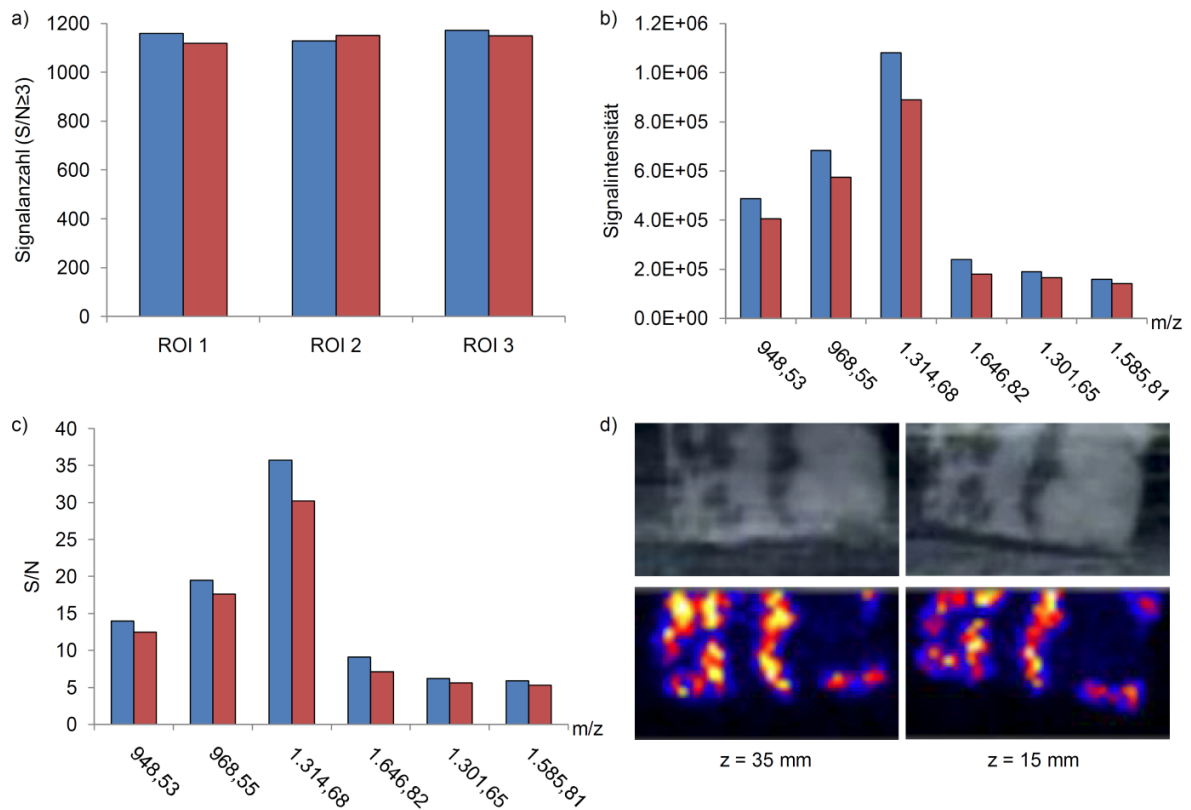


Abbildung A4: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N -Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Offsets der z-Position für die Matrixauftragung getestet: $z = 35$ mm (■) und $z = 15$ mm (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die unterschiedlichen Offsets der z-Position bei der Matrixauftragung dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

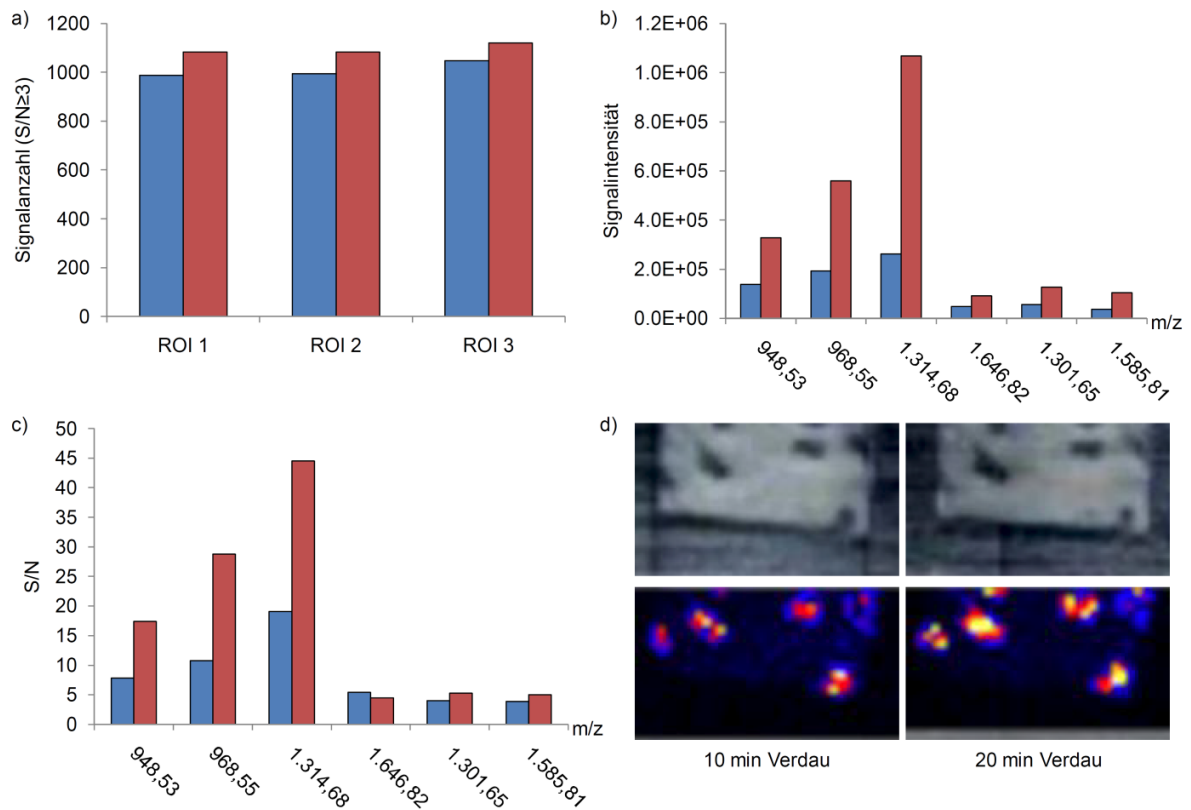


Abbildung A5: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N-Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoAI-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Es wurden unterschiedliche Inkubationszeiten für den enzymatischen Verdau getestet: 10 min (■) und 20 min (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

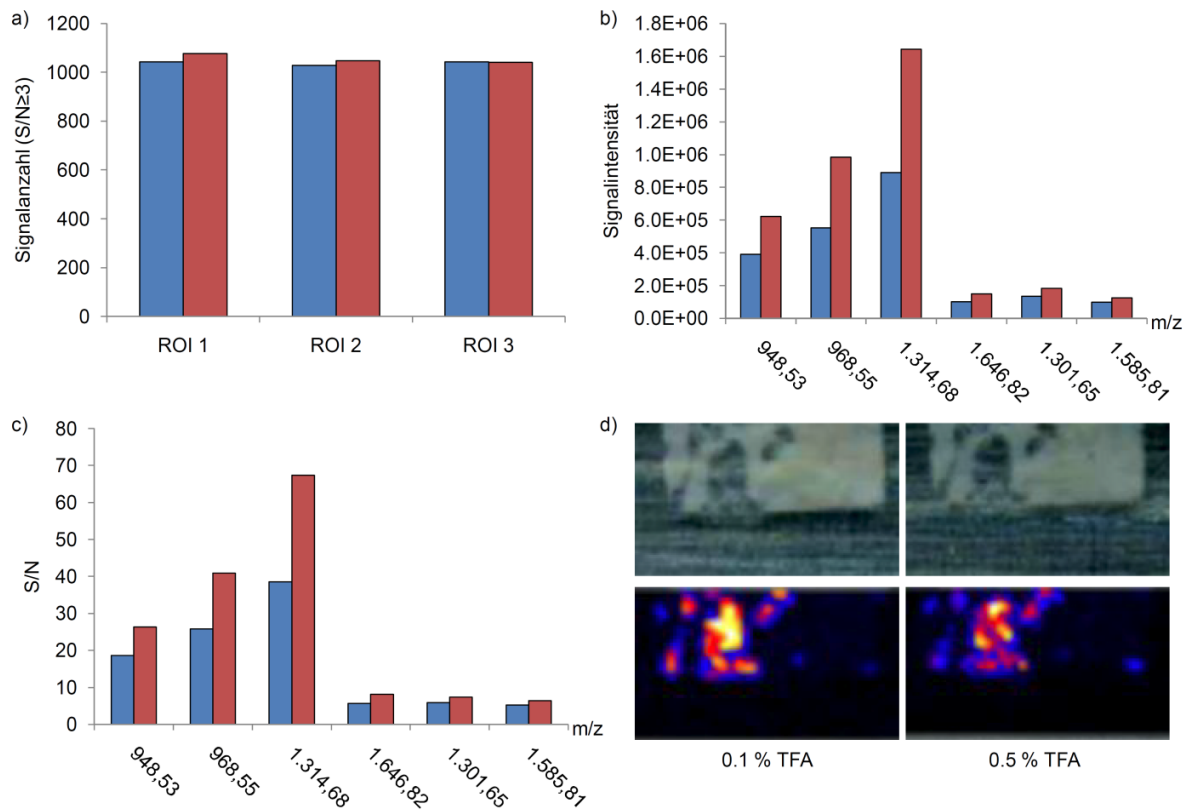


Abbildung A6: Vergleich der Spektrenqualität anhand a) der Anzahl detektierter Peptidsignale mit $S/N \geq 3$ für drei gemessene ROIs und b) der Signalintensitäten sowie c) S/N-Verhältnisse von jeweils zwei tryptischen ApoE-, VTN-, ApoA1-Peptiden (von links nach rechts) für eine repräsentative ROI. Die Matrixauftragung erfolgte mit unterschiedlichen Matrixlösungen: 0,1 % TFA (■) und 0,5 % TFA (■). Die aufgetragenen Werte wurden aus den aufsummierten MS1-Spektren der MALDI MSIP Messungen ermittelt ($n = 1$). d) Vergleich des Ausmaßes der Delokalisation anhand der Peptidmasse 1.314,68 m/z (VTN). Es werden die MALDI MSI Messungen für die unterschiedlichen TFA-Konzentrationen bei der Matrixauftragung dargestellt. Digitale Bilder des aufgenommenen Areals (oben) dienen als Referenz für die Peptidbilder (unten).

9.2 Anhang Kapitel 6.3

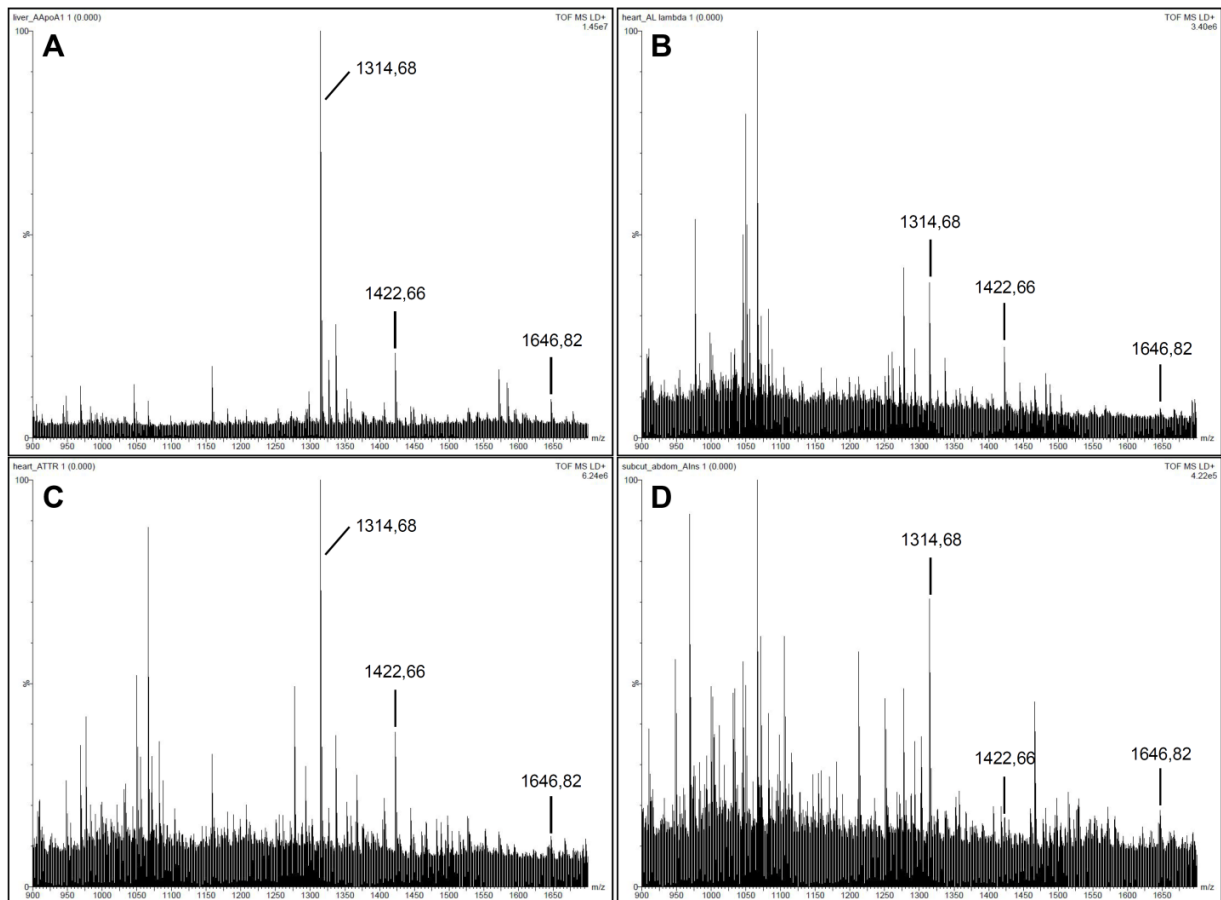


Abbildung A7: Massenspektren von Amyloidablagerungen der vier Amyloidfälle: AApoAI-Amyloid in der Leber (A), AL λ -Amyloid in Herzgewebe (B), ATTR-Amyloid in Herzgewebe (C) und Alns-Amyloid in subkutanem Fettgewebe der Bauchhaut (D). Die Spektren zeigen, dass für jeden Amyloidfall tryptische Peptide von VTN bei m/z 1.314,68, m/z 1.422,66 und m/z 1646,82 detektiert wurden. Übernommen von Winter et al.¹⁵⁰ und ins Deutsche übersetzt.

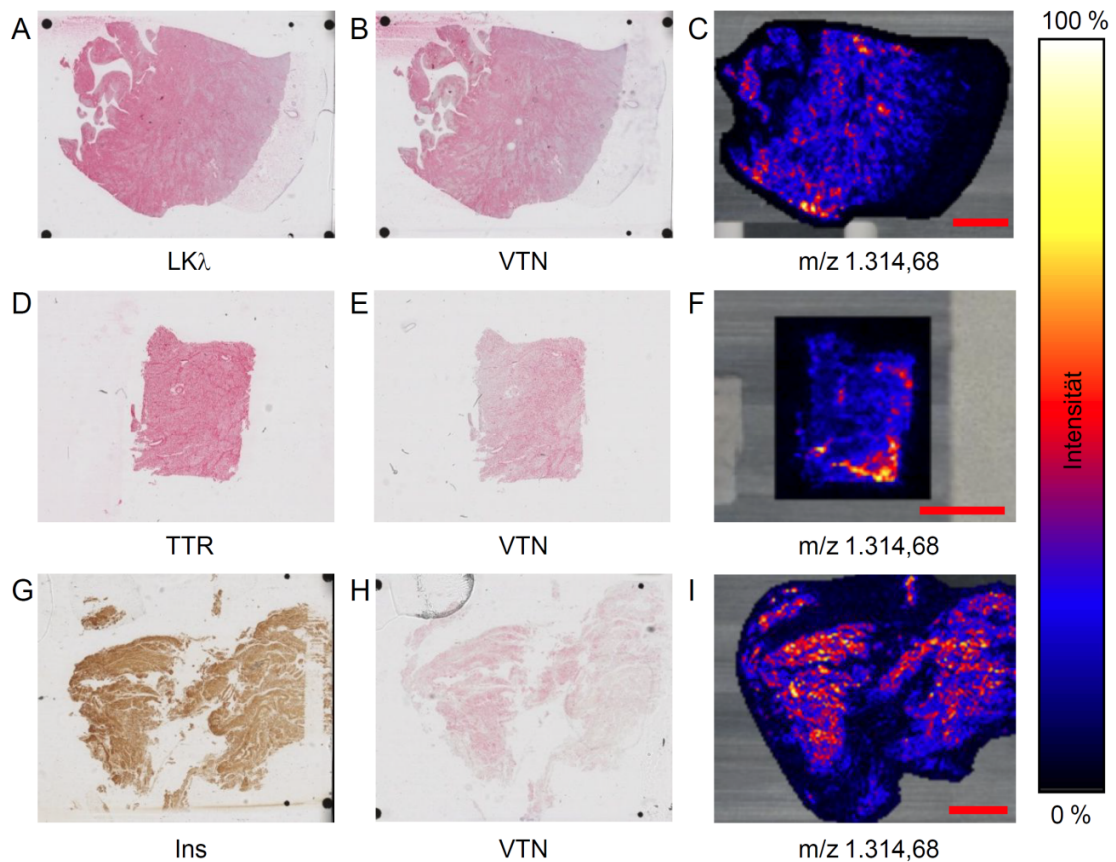


Abbildung A8: Vergleich der Immunfärbungen mit den Peptidbildern der MALDI MSI Messungen der drei Amyloidfälle mit Aλ-, Aλ1- und ATTR-Amyloidose. Die Immunfärbungen von λ-Leichtkette (LKλ, A), Transthyretin (TTR, D) und Insulin (Ins, G) zeigen ein ähnliches Färbemuster wie die zugehörige VTN-Immunfärbung (B, E, H). Die Bilder der MALDI MSI Messungen zeigen die Verteilung des tryptischen Peptids von VTN bei m/z 1.314,68 (C, F, I). Für alle drei Amyloidfälle konnten hohe Signalintensitäten in den Amyloidablagerungen detektiert werden. Skalierung = 5 mm. Übernommen aus Winter et al.¹⁵⁰ und ins Deutsche übersetzt.

Tabelle A1: Liste der identifizierten Peptide mittels MALDI MS/MS Messungen auf amyloidhaltigen FFPE-Gewebe: a) ATTR-Amyloidose im Herzen, b) AL λ -Amyloidose im Herzen und c) AInS-Amyloidose in subkutanem Fettgewebe der Bauchhaut.

a)

Protein	Masse (Da)	detektiertes Peptid (m/z)	Abweichung (ppm)	Aminosäuresequenz	Position	FDR	
						Mascot	Sequest
Vitronectin (P04004)	54271	1314,6772	0,32	RVDTVDPYPR	453-463	<0,01	>0,05
		1422,6583	3,74	FEDGVLDPDYPR	230-241	<0,01	>0,05
		1646,8030	0,00	DWVGIEGPIDAAFTR	198-212	<0,01	>0,05

b)

Protein	Masse (Da)	detektiertes Peptid (m/z)	Abweichung (ppm)	Aminosäuresequenz	Position	FDR	
						Mascot	Sequest
Vitronectin (P04004)	54271	1314,6772	-0,36	RVDTVDPYPR	453-463	<0,01	>0,05
		1422,6583	-5,82	FEDGVLDPDYPR	230-241	<0,01	>0,05
		1646,8030	-7,41	DWVGIEGPIDAAFTR	198-212	<0,01	<0,01

c)

Protein	Masse (Da)	detektiertes Peptid (m/z)	Abweichung (ppm)	Aminosäuresequenz	Position	FDR	
						Mascot	Sequest
Vitronectin (P04004)	54271	1314,6772	1,77	RVDTVDPYPR	453-463	<0,01	>0,05
		1422,6583	4,93	FEDGVLDPDYPR	230-241	<0,01	>0,05
		1646,8030	13,6	DWVGIEGPIDAAFTR	198-212	<0,01	<0,01

9.3 Anhang Kapitel 6.4

Tabelle A2: Massengenauigkeiten der 19 Peptidmassen für die 16 verschiedenen Amyloidfälle, die mittels MALDI-IMS MSI analysiert wurden. Übernommen von Winter et al.¹⁷⁶ und ins Deutsche übersetzt.

Protein	theo. m/z	Abweichung (ppm)															
		AA I	AA II	AA III	AA IV	AA V	AApoAI I	AApoAI II	ATTR I	ATTR II	ATTR III	AL λ I	AL λ II	AL λ III	AL λ IV	ALys I	AFib I
ApoE	948.5261	1.6	-5.0	3.1	-2.2	3.5	3.4	0.1	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-0.2
ApoE	968.5523	3.0	0.6	2.9	-1.0	6.2	3.4	1.1	-1.7	6.5	3.8	0.0	-6.3	-1.5	2.3	-2.7	-1.7
ApoE	1497.8019	2.9	-7.6	-1.7	-5.5	-6.1	4.5	0.1	-30.8	-15.9	-11.4	-14.6	-22.6	-13.8	-18.0	-4.0	-9.9
SAP	764.4453	3.5	2.9	8.6	0.9	9.5	0.8	1.8	1.3	1.3	5.0	1.2	4.8	3.0	-	5.2	7.7
SAP	1156.5997	-	5.8	12.1	-	-	8.9	14.1	27.8	20.6	33.0	-	-	-	-	15.6	-
SAP	1406.6699	9.4	4.8	9.5	14.4	18.0	9.3	-	14.1	14.9	19.8	21.1	21.6	22.7	2.2	9.5	12.8
SAP	1811.8922	-2.2	-6.1	-1.9	-2.0	7.6	2.7	-1.2	-1.6	-0.4	1.3	-8.9	-7.2	-4.8	-11.6	-3.9	-3.0
VTN	887.5097	-25.9	-17.6	-26.6	-24.9	-26.6	-6.6	-10.1	-25.4	-17.9	-12.7	-23.5	-18.3	-24.1	-13.7	-29.9	-29.6
VTN	1314.6800	7.2	1.8	1.6	-6.0	13.9	4.3	3.4	5.0	4.7	7.8	10.0	6.1	7.5	1.2	-4.3	7.3
VTN	1422.6535	18.8	9.6	17.7	28.6	31.5	9.3	21.3	31.4	20.2	29.6	31.1	24.1	31.8	14.0	9.1	21.9
VTN	1503.8352	-3.9	-4.5	-32.9	-18.1	-10.0	4.1	2.9	-31.0	-1.5	-4.6	-5.5	-3.3	-6.5	-1.9	-6.9	-30.5
VTN	1646.8172	-10.5	-21.5	-20.9	-9.0	-3.2	7.1	3.0	-6.2	3.8	5.2	-6.9	6.2	0.1	2.6	1.6	-14.5
VTN	1666.7754	3.4	-5.7	7.7	5.0	15.1	4.7	4.1	22.8	8.6	17.7	9.5	10.5	14.2	3.5	2.7	9.4
ApoAI	781.4315								-1.7	-2.7							
ApoAI	1031.5190								6.3	10.0							
ApoAI	1301.6484								5.7	7.1							
SAA	1612.8190	3.8	-0.9	-22.4	-6.5	9.4											
SAA	1670.7921	3.1	-1.4	2.8	2.8	9.1											
TTR	1366.7589								-17.9	-8.5	-12.5						

Tabelle A3: Liste der identifizierten Peptide mittels MALDI MS/MS Messungen auf FFPE-Gewebe. Übernommen von Winter et al.¹⁷⁶ und ins Deutsche übersetzt.

Protein	Masse (Da)	detektiertes Peptid (m/z)	Abweichung (ppm)	Aminosäuresequenz	Position	FDR	
						Mascot	Sequest
Apolipoprotein E (P02649)	36132	948,5240	-2,30	LAVYQAGAR	177-185	<0,05 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		968,5502	-2,28	LGPLVEQGR	199-207	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1497,8016	-0,31	AATVGSAGQPLQER	210-224	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
Serum Amyloid P-Komponente (P02743)	25371	764,4442	-1,58	VFVFPFR	27-32	-	<0,01 ^{a)}
		1156,6140	12,34	VGEYSLYIGR	87-96	<0,01 ^{c),d)}	<0,01 ^{c),d)}
		1406,6532	-11,89	AYSLSYNTQGR	65-76	<0,01 ^{c)}	-
		1811,8905	-1,01	IVLGQEQDSYGGKFDR	150-165	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
Vitronectin (P04004)	54271	887,5085	-1,47	AVRPGYPK	187-194	<0,05 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1314,6772	-2,23	RVDTVDPPYPR	453-463	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1422,6583	3,27	FEDGVLDPDYPR	230-241	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1503,8331	-1,44	IYISGMAPRPSLAK	354-367	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1646,8030	-8,74	DWVGIEGPIDAAFTR	198-212	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1666,7765	0,57	DWHGVPGQVDAAMAGR	338-353	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
Apolipoprotein AI (P02647)	30759	781,4310	-0,71	AHVDALR	178-184	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1031,5183	-0,75	LSPLGEEMR	165-173	<0,05 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
		1301,6427	-4,44	THLAPYSDELRL	185-195	<0,01 ^{a)}	<0,01 ^{a)}
Serum Amyloid A (P0DJ18)	13524	1612,8208	1,03	RGPGGVWAAEAISDAR	65-80	<0,01 ^{b)}	<0,01 ^{b)}
		1670,7944	1,32	EANYIGSDKYFHAR	44-57	<0,01 ^{b)}	<0,01 ^{b)}
Transthyretin (P02766)	15877	1366,7678	6,39	GSPAINVAVHVFR	42-54	<0,01 ^{c),d)}	<0,01 ^{c),d)}

^{a)}AApoAI-Amyloidose in Lebergewebe, ^{b)}AA-Amyloidose in Lebergewebe, ^{c)}ATTR-Amyloidose in Herzgewebe, ^{d)}Identifizierung erfolgte unter Einsatz der Ionenmobilitätstrennung.

Tabelle A4: Liste der Peptidmasse und Driftzeiten, die als Referenzen für den MDIC-Peptidfilter verwendet wurden. Übernommen von Winter et al.¹⁷⁶ und ins Deutsche übersetzt.

Protein	Peptidmasse (m/z)	Driftzeit (bin)
ApoE	948,5261	75,10
ApoE	968,5523	73,95
ApoE	1497,8019	116,62
SAP	764,4453	62,16
SAP	1156,5997	92,88
SAP	1406,6699	107,60
SAP	1811,8922	138,04
VTN	887,5097	67,91
VTN	1314,6800	101,21
VTN	1422,6535	107,74
VTN	1503,8352	120,23
VTN	1646,8172	125,61
VTN	1666,7754	124,67
ApoAI	781,4315	59,40
ApoAI	1031,5190	79,49
ApoAI	1301,6484	100,27
SAA	1612,8190	121,96
SAA	1670,7921	125,19
TTR	1366,7589	107,07