



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12  
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**MALDI-IMS: Ehun bateko  
konposatuen distribuzio-irudiak  
lortzeko masa-espektrometria  
teknika ezagutzen**

*Antonio Veloso*

22-27 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.03>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



## **MALDI-IMS: Ehun bateko konposatuen distribuzio-irudiak lortzeko masa-espektrometria teknika ezagutzen**

Antonio Veloso

*POLYMAT, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Tolosa Hiribidea 72, 20018, Donostia  
antonio.veloso@polymat.eu*

### ***Laburpena***

Gaur egun, laborategietan biomolekulak eta materialak karakterizatzeko gero eta gehiago hedatu den Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) edo matrizez lagundutako laserraren bidezko desortzio ionizazio-hegaldi denbora masa espektrometria teknika erabiltzen da. Teknika hau hainbat alorretan zabaldu egin da, masa molekularra jakitea baimentzen duelako inolako zatiketarik gabe, hau da, molekulen mikroegiturak karakterizatzea baimentzen du. Aldi berean, ehun batean dauden molekulen banaketa eta distribuzioa jakitea lor daitezke MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS) edo masa espektrometriaren bidezko irudia deritzon teknikari esker. Lan honetan, MALDI-IMS teknikaren oinarriak eta aplikazioak azaldu eta aztertuko dira.

Hitz gakoak: MALDI-TOF, IMS; masa espektrometria, irudiak, karakterizazioa

### ***Abstract***

*Nowadays, the improved Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) technique is more and more used in laboratories to characterize biomolecules and materials. The use of this technique has increased in different fields due to the fact that molar mass is determined without any fragmentation, that is, allows the molecules microstructure characterization. At the same time, MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS) technique allows to detect the distribution of molecules in a tissue. In this work, the fundamentals and applications of MALDI-IMS technique are going to be explained and studied.*

*Keywords: MALDI-TOF, IMS; mass spectrometry, images, characterization*

## 1. Sarrera eta motibazioa

1980. hamarkadan Tanaka et al. (1988), Karas eta Hillenkampek (1988) Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) edo matrizez lagundutako laserraren bidezko desortzio-ionizazioa/hegaldi-denbora masa espektrometria asmatu eta garatu zuten. Teknika hau hainbat arlotan barreiatu da, proteinak, lipidoak eta farmakoak identifikatzeko edo polimeroak karakterizatzeko, hain zuzen ere. Lortzen diren espektroetan masa absolutu independenteen balioak lortzen dira, hau da, hegaldi denborarekin erlazionatzen diren masa-karga erlazio balioak ( $m/z$ ). Proteinen kasuan, entzima bat erabiliz (tripsina adibidez) proteina zatiak edo peptidoak lortzen dira. Digestioa egin ondoren, lagin hori matrizearekin nahasten da eta espektrometro barruan analisia burutzen da. Horrela, proteinaren sekuentzia jakitea lor daiteke, hau da, zeintzuk diren aminoazidoak eta zein den horien ordena proteinan. Farmakoen eta lipidoen kasuan horien masa absolutua jakitea lortzen da. Polimeroen kasuan, polimero kate bakoitza eta horien kopurua ikus daiteke eta horregatik monomero unitatearen masa eta mutur taldeak jakiteko aukera lortzen da eta baita masa molarren distribuzioa (MMD) jakiteak ere.

Beste teknika analitiko batzuekin alderatuz, masa espektrometriak informazio gehigarria ematen du, analito baten eta horren zatien masa molekularrak, esate baterako. Gainera, analisia egiteko laginaren oso kantitate gutxi kontsumitzen da, denbora laburrean eta lortzen diren masa molekularrak balio absolutuak dira. Bestalde, beste masa espektrometria batekin alderatuz, MALDI teknikan ioi gehienek karga bakarra dute, eta datuen tratamendua eta interpretazioa erraztu egiten da eta lortzen den bereizmena hobesten da masa tarte handiagoetan. Desabantaila nagusia, teknika suntsitzailea izatea da, hau da, ezin dira laginak berreskuratu.

Bestalde, MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS) edo masa espektrometriaren bidezko irudi teknikak ehun batean dauden molekulen banaketa eta distribuzioa jakitea lortzea ahalbidetzen du. IMS teknika, oso teknika bikaina da ehun biologikoetan dauden molekulen distribuzioa aztertzeko molekula mota ezberdinen identifikazioa eta lokalizazioa ahalbidetzen duelako, konposatuaren edota familia kimikoaren aukera egin aurretik. Analizatu behar diren konposatuen aukera aldeztu aurretik egin behar ez denez, aukera dago irudiak sortzeko masa espektrometroan detektatutako ioietatik abiatuta (Caprioli et al., 1997; Rohner et al., 2005; Khatib-Shahidi et al., 2006).

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

IMS teknika oso erabilgarria eta interesantea da hainbat arlotan ehun batean molekula bat non kokatzen den zehazki jakiteko. Teknika honek ehunen *ex vivo* analisiak baimentzen ditu inolako etiketatzerik egin gabe (label-free), hau da, arriskutsuak diren isotopo erradiaktiborik erabili gabe markatzaile bezala. Modu honetan, ehun batean proteinen, peptidoen, lipidoen zein farmakoen kokapena edo metatzea jakin daiteke erradiografiarik egin gabe, hots, hain garestia den material erradiaktiboaren erabilpena saihestuz. Beste aldetik, ehunen konparazioa burutu daiteke berezitasunak aurkitzeko. Modu honetan, ehun osasuntsuak eta gaixoak konparatzeko aukera dago edo gaixotasun baten sailkapenak egiteko ere gaixotasun-aldia zehazteko, minbiziaren kasuan adibidez (Meding et al. 2012) eta aurrerapen handia izango litzateke minbizi ebakuntzetan azkar jakin daitekeelako zenbat ehun gaixoa kendu behar da. Aldi berean, ehun batean farmako baten inkubazioa eta IMS esperimendua eginez, ikertu daiteke farmako horrek non daukan eragina (Greer et al., 2011; Chumbley et al., 2016). Beraz, teknika honek gero eta garrantzia handiago dauka Biokimika, Farmakologia eta Medikuntza arlotan.

Lan honen helburua, MALDI-IMS teknikaren oinarriak eta aplikazioak azaltzean datza. Horretarako, lehendabizi, laginaren prestakuntza-pausuak erakutsiko dira. Ondoren, espektroak eskuratzeko eta hauen prozesamendurako jarraituko diren pausuak azalduko dira. Azkenik, ehun batean lortutako emaitzak, hau da, batezbesteko espektroa eta irudiak aztertuko dira.

### 3. Ikerketaren muina

MALDI analisi orokor bat egiteko, laginaren prestakuntza egin behar da espektrometroan sartu aurretik. Lagina prestatzeko MALDI matrizearekin nahasten da. Matrize ezberdin asko eta hauek prestatzeko teknika ugari existitzen dira. Normalean konposatu organiko eta aromatikoa dira. Horrela, espektrometroko laserrak laginean dauden osagai guztiak ionizatu egiten ditu zatiketarik gertatu gabe, hau da, matrizeak laserraren energia xurgatzen du eta laginaren osagaiak ionizatzeko energia transferitzen dio. Ondoren, ioien masak TOF analizatzailean banatzen dira eta azkenik, ioiak detektorera iristen dira espektro bat lortuz. Espektro on bat lortzeko zenbait parametro optimizatzen dira, hala nola, energia, tiro zenbakia, maiztasuna, masa eskualdea, detektorea, etab... Espektroan dauden gailur guztiak, laginean dagoen osagaien masa izango dira.

MALDI-IMS teknikan, espektroak lortzeko prozesua MALDI analisi orokorrean egiten den bezalakoa da, baina lagina prestatzeko eta datuen tratamendua egiteko zenbait ezberdintasun nabarmendu daitezke. Esan dugun bezala, teknika honekin ehun batean dauden konposatu desberdinen distribuzio espaziala lortzen da. Horregatik, lehenik eta behin erabiliko den ehuna kriostatara erabiliz moztu eta beirazko portan jartzen da (1.a irudia). Kriostatoak  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  lan egitea baimentzen du eta horrela ehunaren degradazioa saihesten da. Gainera, ehuna izoztuta dagoenez, xaflak oso uniforme geratzen dira eta ehunaren mikroegiturak mantentzen dira. Informazio anitz lortzeko, xafla ezberdinak jarraian egiten dira, modu honetan ehunaren xafla batzuk mikroskopioan sartzeko, beste batzuk tindaketa egiteko eta azken batzuk MALDI-IMS esperimentuak burutzeko erabiltzen dira (1.b irudia). Ehuneko xafla MALDI espektrometroan sartu aurretik matrizez estali behar da. Hau modu homogeneoan egin behar da irudi ona eta egokia lortzeko (1.c irudia). Matrizez ehunak estaltzeko teknika ezberdinak erabili dira: lainoztatzea sublimazioa, aerografoa, inprimatzailea... Guztiak matrizez asetutako disoluzio bat erabilita analizatu nahi den azalera homogeneoki estaltzea bilatzen dute. Egun, zenbait enpresak matrizez estaltzeko tresnak garatu dute, Imaging Prep (Bruker), AccuSpot (Shimadzu) edo SumCollect MALDI-spotter (SumChrome), adibidez.

Ehuna matrizez uniformeki estalita dagoenean, espektrometro barruan sartzen da eta programatzen da ehunaren posizio desberdinetan espektroa lortzeko (2.a irudia). Horrela, programatzerakoan bereizmen espazial bat ematen da eta hori izango da puntu batetik bestera laserrarekin tiro egiteko izango den distantzia. Beraz, posizio bakoitzean espektro bat lortuko da.

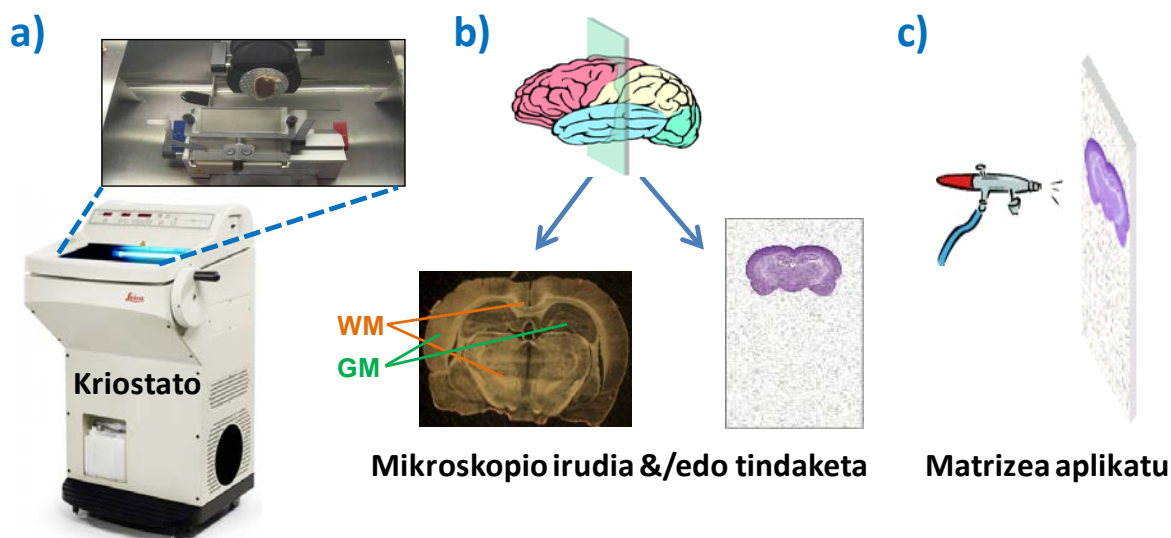
Espektro guztiak egin eta gero, datuen tratamendua eta prozesamendua egin behar da. Horretarako, lehendabizi posizio guztietan bildu diren batezbesteko espektroa lortzen da (2.b irudia). Espektro honetan gailur edo espezie guztiak izango dira, baina pixel edo posizio zehatz batean espezie batzuk izango dira, aldiz, beste batzuk ez. Beraz, aukera dago gailur bat zein pixeletan dagoen jakiteko, hau da, espezie baten distribuzioa ikusaraztea. Horrela, espezie bakoitzak ehunaren zein posiziotan kokatzen den jakin dezakegu. Gainera, gailur edo espezie bat posizio desberdinetan ager daiteke (pixel batzuetan) eta bakoitzak intentsitate desberdina izan. Horregatik, intentsitate eskala-kolore bat erabiliz espezie baten ugaritasuna edo banaketa irudika daiteke.

3. irudian, adibide zehatz bat erakusten da, MALDI masa espektrometria bitartez arratoi baten burmuineko ehunean lortutako batezbesteko lipidoen espektroa hain zuzen ere. Ehun honetan bi egitura ezberdin daude: materia grisa (GM) eta materia zuria (WM). Materia ezberdinak lipido kontzentrazio ezberdinak ditu eta batzuetan lipido espezie batzuk materia mota bakar batean izaten dira. Espektroko gailur bakoitza molekula bati dagokio. Espektro honetan gailur gehienak eta ugarienak bi materietan agertzen dira, baina gailur ezberdinak ere bereizten dira. Horrela, gailur edo espezie baten distribuzioa ikusteko aukera ematen digu IMS teknikak. Gailur batzuen gainean espezie horren IMS irudia agertzen da. Ondorioz, GM eta WM-en konposizio zehatza jakitea lortzen da teknika hau erabilita. Bestalde, MALDI-IMS bidez lortutako arratoi-muineko lipido batzuen distribuzioen irudiak agertzen dira, non materia grisa eta zuria ondo bereizten diren. Gailur batean lortzen den irudia eta esleipena gailur horren gainean erakusten da. Eskala-kolorea alboan ikus daiteke. Kolore gorriak espezie bat oso ugaria dela adierazten du, aldiz, urdinak urria dela. Fosfatidilkolina (PC) espeziea ugariagoa da

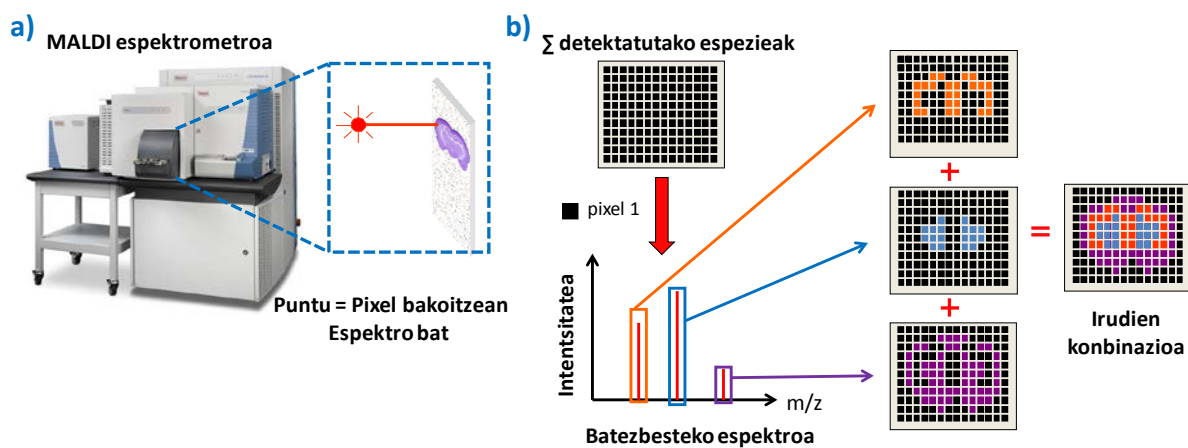
ehunaren barrualdean, aldiz, zeramida eta lisofosfatidilkolina (LPC) espezieak kanpoaldean barreiatzen dira. Azken espezie batzuk ehun osoan barreiatuta agertzen dira: diazilglicerola (DAG) eta esleitu ezin izan den espeziea (galdera-ikurra erabili da).

### 3.1 Irudiak eta grafikoak

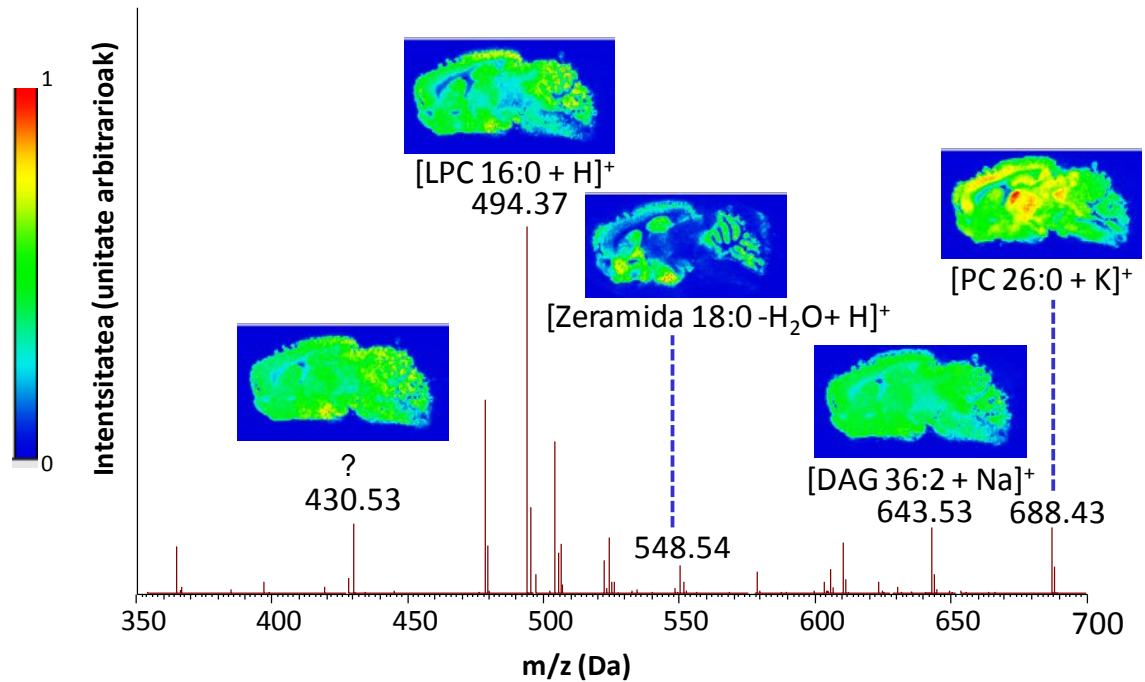
1. irudia. Ehunaren prestakuntza: a) Kriostatato bidez ehuna moztu; b) Ehunaren mikroskopia irudia edo tindaketa; eta c) Matrizearen aplikazioa



2. irudia. a) MALDI espektrometroan espektroen eskuratzeari; eta b) Espektroen prozesamendua ehunaren konposatu desberdinak irudikatzen



3. irudia. Arratoi baten burmuin ehunaren batezbesteko MALDI espektroa 300-700 Da masa tartean. Gailur batzuen gainean erantsita dauden irudiak gailur horri ehun horretan IMS irudia dagokio.



#### 4. Ondorioak

MALDI masa espektrometriak, beste teknika analitikoekin alderatuz, arlo ezberdineko molekulak hobeto karakterizatzea bermatzen du, analitoaren eta bere zatien masa zehatza neurtzen duelako. Gainera, IMS teknikak molekula ezberdinak aldi berean detektatzea eta gainazal batean bakoitzaren distribuzioa ikusteko aukera ematen du, informazioa ugari lortuz. Era honetan, ehunetan lipido espezie ezberdinen kokapena jakin daiteke modu errazean eta konposatu erradiaktiborik erabili gabe. Lan honetan erakusten den bezala, teknika honen garapena beharrezkoa da esparru ezberdinetan dagoen ikerkuntza hobetzeko. Zehazki, lipido batzuen banaketa erakutsi da eta hauek nola barreiatzen diren arratoi burmuineko ehunean.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

IMS teknikaren garapenarekin batera Biokimika, Farmakologian eta Medikuntza arlotan aurrerapen handiak izango dira. Alde batetik, ehun osasuntsuak eta gaixoak konparatuz aukera egongo da ebakuntza batean ehun gaixoa guztiz kentzeko (minbizi batean garrantzi handia dauka, adibidez). Bestalde, gaixotasunen jatorriak ikertzeko ehunak analizatzeko aukera egongo da, jakiteko zein biomolekula aldatzen diren eta zeintzuk izan daitezkeen aldaketa horiek emateko arrazoiak. Bestalde, teknika honek aukera ematen du jakiteko farmako jakin bat zein azpiegitura espezifikoan daukan eragina eta non metatzen den.

#### 6. Erreferentziak

- Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communication in Mass Spectrometry*, 2, 151-153.
- Karas, M.; Hillenkamp, F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60, 2299-2301.
- Caprioli, R. M.; Farmer T. B.; Gile, J. (1997): Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry*, 69, 4751-4760
- Rohner, T.C.; Staab, D.; Stoeckli, M. (2005): MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 177-185.

- Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman J.L.; Gillespie, T.A.; Caprioli, R. M. (2006): Direct Molecular Analysis of Whole-Body Animal Tissue Sections by Imaging MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78, 6448–6456.
- Greer, T.; Sturm, R.; Li, L. (2011): Mass spectrometry imaging for drugs and metabolites. *Journal of Proteomics*, 74, 2617-2631.
- Meding, S.; Nitsche, U.; Balluff, B.; Elsner, M.; Rauser, S.; Schöne, C.; Nipp, M.; Maak, M.; Feith, M.; Ebert, M. P.; Friess, H.; Langer, R.; Höfler, H.; Zitzelsberger, H.; Rosenberg, R.; Walch, A. (2012): Tumor Classification of Six Common Cancer Types Based on Proteomic Profiling by MALDI Imaging. *Journal of Proteome Research*, 11, 1996–2003.
- Chumbley, C. W.; Reyzer, M. L.; Allen, J. L.; Marriner, G. A.; Via, L. E.; Barry, C. E. . Caprioli, R. M. (2016): Absolute Quantitative MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Case of Rifampicin in Liver Tissues. *Analytical Chemistry*, 88, 2392–2398.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau “*Biomolekulen eta farmakoen detekzioa MALDI-IMS Masa Espektrometria erabilia*” doktore-tesiaren atal batzuetan oinarrituta dago. Kimika Fisikoa sailean Espektroskopia Molekularraren taldean egin da, Dr. José Andrés Fernández eta Dr. Rafael Rodríguez-Puertas ikertzaileen zuzendaritzapean. Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) doktore-tesia aurrera eramanez ahal izateko emandako diru-laguntza eskertzen diot.