

Mass Spectrometry for Multimodal Imaging of Lipids in Brain Tissue

Citation for published version (APA):

Škrášková, K. (2016). *Mass Spectrometry for Multimodal Imaging of Lipids in Brain Tissue*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20160303ks>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160303ks](https://doi.org/10.26481/dis.20160303ks)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

6.2. Summary

Constant methodology improvement is essential in all analytical fields. In this thesis, I described novel methodologies to study lipids in the brain using multimodal mass spectrometry imaging (MSI). The described protocols improved both, the qualitative and the spatial aspects of MSI. They broadened the general workflow of the MSI analytical approach, as presented in *Chapter 1*.

Chapter 2 introduced the readers to the principles of MSI in greater detail. This chapter focused on the most commonly employed MSI ionization technique: matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). The primary strength of MSI is in providing the information about the position of individual molecules within a tissue sample. However, the price to pay for the spatial information is in increased ionization suppression. Separation techniques have the ability to significantly reduce it, hence to improve ionization of low-abundant molecular species. However, due to nature of MSI, it is impossible to incorporate a separation step prior to an imaging experiment. As a result, MSI suffers from ionization suppression to a great extent. This chapter stressed that a comprehensive local sample composition information can be obtained by combination of MSI and separation techniques in a single analytical approach. We reviewed and discussed examples of MSI combined with electrophoresis, chromatography and blotting.

In *Chapter 3* we introduced another MSI technique, namely desorption electrospray ionization (DESI). We employed DESI coupled to ion mobility separation (IMS) for the analysis of lipids in murine brain tissue. When coupled to MSI, IMS cannot reduce the ionization suppression as discussed in *Chapter 2*, since the separation occurs after the ionization process. However, it simplifies imaging data interpretation by grouping molecules based on their structure and charge. In our DESI-IMS-MSI study, we detected gangliosides, including low abundant GT and GQ species and their acetylated versions as multiply charged ions directly from the murine brain tissue. Using IMS, complex gangliosides were separated from the rest of the lipid classes based on their structure and charge state. Findings demonstrated in this chapter represent a major improvement in the spatial analysis of fragile lipid species. Gangliosides are highly abundant in the nervous system, where they play various biological roles and are involved in some brain pathologies, including lysosomal storage disorders. Knowledge of ganglioside spatial distribution can contribute to broadening our molecular understanding of the brain and its pathologies.

In this chapter, we also compared DESI imaging to MALDI-MSI experiments performed on the same ion mobility enabled instrument. We show that MALDI-IMS enabled separation of background and tissue related molecules. DESI mobilograms,

however, contained higher number of trendlines, thus demonstrating a better separation of endogenous molecular species. We also showed that by combination of the two imaging modalities under the reported conditions, complementary lipid information is obtained. It should be noted, however, that by optimizing sample preparation or experimental conditions for both DESI and MALDI, ionization of particular lipid classes can be improved for each of the techniques. Thus far a methodology enabling MSI of all lipid classes with high sensitivity under single experimental conditions has not been reported. Consequently, it can be advantageous to utilize a combination of MSI techniques.

Finally, *Chapter 3* showed examples of fragmentation spectra of various lipid species and discussed briefly the identification of lipids in the MSI analytical approach.

Secondary ion mass spectrometry (SIMS), introduced in *Chapter 4*, also offers complementary lipid (molecular) information when compared to MALDI. However, in order to obtain unique information about the structure and composition of tissue sections, multimodal imaging requires appropriate co-registration of different images. Consequently, this chapter focused on the problem of co-registration of MS images acquired by different modalities. We described the development and proof-of-principle for a novel co-registration method combining SIMS and MALDI. Our protocol is based on gold sputtered fiducial markers, implanted on and next to a tissue section prior to multimodal MSI. As SIMS has minimal mechanical impact on a sample during MSI, it is possible to re-image the same tissue section using MALDI. We showed that the markers can be visualized with SIMS and MALDI and thus enable co-registration of MS images acquired by both modalities. We showed that the method is universal and can be used for various tissue types, including brain tissue.

Chapter 5 explored the co-registration of MS images from a different perspective. MSI is often combined with other imaging modalities, such as histochemical staining, to assess anatomical information of specific tissue regions (possibly highlighted during an MSI experiment). However, direct comparison of histology based and MS based molecular images can become problematic due to potential tissue damage or changes caused by different sample preparation. On the contrary, automated comparison of MSI to curated atlases such as the Allen Brain Atlas (ABA) allows for conclusions to be drawn on the precise anatomical localization of MSI derived molecular signatures.

In this chapter we imaged brain sections of mice with an impaired lipid metabolism using SIMS. The mice were lacking a gene (MFP2) responsible for degradation of very long chain fatty acids. We found fatty acid rich deposits manifesting specific spatial patterns within the brain sections of the knockout-out

mice. However, we were unable to unequivocally determine the anatomic localization of the SIMS-derived lipid signatures. We employed a pipeline for automated comparison of SIMS images with the Allen Brain Atlas, which resulted in a precise anatomic localization of the accumulated fatty acids. After the co-registration, the hotspots were linked to the 4th ventricle.

The ABA contains highly standardized information on gene expression anatomically organized in a hierarchic order. We further explored the tools provided by the ABA, and used one of them to generate a list of genes correlated with the MFP2 expression pattern. Various molecular substrates linked to the correlated genes can be used for future targeted molecular analysis of MFP2 deficient mouse models. Although the biological impact of our work is minimal, we suggested future directions of research and opened the door to further investigations. Importantly, the work presented in *Chapter 5* represents an enhancement in the spatial capabilities of MSI through the automated combination with a brain anatomical atlas.

The novel protocols described in this thesis led to a proposal of a comprehensive workflow which can be applied in further molecular investigations of the brain and other tissue types. The workflow, its suggested methodological improvements, and involvement in future research were described and discussed in *Chapter 6*.

6.3. Samenvatting

Continue methodologie verbeteringen zijn essentieel in alle velden van analyse. In deze thesis beschrijf ik nieuwe methodologieën om met behulp van multimodale massa spectrometrie imaging (MSI) lipiden te bestuderen. The beschreven protocollen hebben zowel kwalitatieve als spatiele aspecten van MSI verbeterd. Zij hebben de algemene werkwijze van de MSI analytische aanpak verbreedt, zoals beschreven in *Hoofdstuk 1*.

Hoofdstuk 2 introduceert de lezers in de meer gedetailleerde principes van MSI. Dit hoofdstuk is gericht op de meest gebruikte MSI ionisatie techniek: matrixgeassisteerde laser desorptie ionisatie (MALDI). De voornaamste kracht van MSI ligt in het verstrekken van informatie over de locatie van individuele moleculen binnen een te onderzoeken weefsel. Echter, deze spatiele informatie gaat ten koste van het vermogen om moleculen te detecteren die in mindere mate aanwezig zijn, een fenomeen genaamd ionen onderdrukking. Scheidingstechnieken worden traditioneel ingezet om dit te overkomen. Echter, vanwege het principe van MSI is het niet mogelijk om een scheidingsstap te verwerken in een imaging experiment. In dit hoofdstuk hebben wij laten zien dat de volledige lokale moleculaire compositie kan worden achterhaald door een combinatie van MSI en scheidingstechnieken te gebruiken. We hebben hier voorbeelden van combinaties tussen MSI en elektroforese, chromatografie en blotting besproken en bediscussieerd.

In *Hoofdstuk 3* hebben wij een andere MSI techniek geïntroduceerd, namelijk desorptie electrospray ionisatie (DESI). Wij hebben met DESI gekoppeld aan ionen mobiliteitsscheiding (IMS) analyses uitgevoerd van lipiden in muizen hersenweefsel. Wanneer IMS gekoppeld is aan MSI kan deze het ionen onderdrukking fenomeen, beschreven in *Hoofdstuk 2*, niet reduceren omdat de scheiding gebeurt na het ionisatie proces. Echter, het versimpeld de imaging data interpretatie door moleculen te groeperen op basis van hun structuur en lading. In onze DESI-IMS-MSI studie hebben wij gangliosiden inclusief lage concentraties GT en GQ moleculen en hun geacytyleerde versies in muis hersenweefsel kunnen detecteren als meervoudig geladen ionen. Dankzij IMS konden wij complexe gangliosiden scheiden van de andere lipiden soorten op basis van hun structuur en lading. Bevindingen gepresenteerd in dit hoofdstuk representeren een grote verbetering in de spatiele analyse van fragiele lipiden soorten. Gangliosiden zijn veelvoorkomend in het zenuwstelsel, waar zij diverse biologische rollen vervullen en betrokken zijn bij bepaalde hersen ziektebeelden, waaronder lysosoom opslag aandoeningen. Kennis van de spatiele verdeling van gangliosiden kan van waarde zijn in het vergroten van ons inzicht in de hersenen en hersenaandoeningen.

In dit hoofdstuk hebben wij DESI imaging vergeleken met MALDI-MSI experimenten uitgevoerd op hetzelfde, met ionen mobiliteitsscheiding uitgeruste, instrument. Wij hebben laten zien dat het gebruik van MALDI-IMS de onderzoeker in staat stelt achtergrond en weefsel gerelateerde moleculen van elkaar te scheiden. DESI mobilograms bevatten echter meer trendlijnen, wat duidt op een betere scheiding van endogene moleculaire soorten. Wij hebben laten zien dat de combinatie van de beide imaging modaliteiten onder de gerapporteerde condities complementaire informatie levert. Daarbij moet worden opgemerkt dat door het optimaliseren van monster voorbereiding en experimentele condities voor zowel DESI als MALDI de ionisatie efficiëntie kan worden verhoogd. Tot dusverre is er nog geen methodologie met hoge gevoeligheid voor alle lipiden soorten onder gelijke experimentele condities gerapporteerd. Het gebruik van een combinatie van MSI technieken kan dus voordelig zijn.

Tot slot presenteert *Hoofdstuk 3* voorbeelden van fragmentatie spectra van verschillende lipiden soorten en wordt de identificatie van lipiden in de MSI analytische werkwijze bediscussieerd.

Secundaire ionen massa spectrometrie (SIMS), geïntroduceerd in *Hoofdstuk 4*, kan additionele moleculaire informatie leveren over lipiden, in aanvulling op MALDI. Echter, om unieke informatie te verkrijgen over de structuur en compositie van weefsel coupes dienen de beelden verkregen uit meerdere MSI modaliteiten correct te worden gecombineerd. Daarom is dit hoofdstuk gecentreerd rondom het probleem van co-registratie van datasets verkregen uit verschillende MSI modaliteiten. Wij hebben de ontwikkeling van een nieuwe methode om MSI datasets te co-registreren beschreven en gedemonstreerd met SIMS en MALDI data. Ons protocol is gebaseerd op referentiemarkeringen die met een goud bundel zijn aangebracht naast en op een weefsel coupes in voorbereiding op multimodale MSI experimenten. Omdat SIMS minimale mechanische impact heeft op een monster tijdens een MSI experiment is het mogelijk om hetzelfde weefsel opnieuw te analyseren met MALDI. We hebben aangetoond dat de markeringen kunnen worden gevisualiseerd met SIMS en MALDI en dus de co-registratie van MSI datasets mogelijk maken. Wij hebben laten zien dat de methode universeel is en dus kan worden gebruikt voor allerlei weefsel types, waaronder dus ook hersenweefsel.

In *Hoofdstuk 5* is de co-registratie van MSI beelden verkend vanuit een ander perspectief. MSI wordt vaak gecombineerd met andere imaging modaliteiten, zoals immuunhistochemische kleuring, om anatomische informatie van specifieke weefselregionen (mogelijk gestuurd door MSI resultaten) te beoordelen. Echter kan directe vergelijking van op histologie en MS gebaseerde beelden problematisch zijn door eventuele schade of veranderingen aan het weefsel als gevolg van monster

voorbereiding. Tegelijkertijd maakt geautomatiseerde vergelijking van MSI beelden met anatomische atlassen zoals de Allen Brain Atlas (ABA) het mogelijk om conclusies te trekken over exacte anatomische lokalisatie van moleculaire verdelingen geobserveerd in MSI experimenten.

In dit hoofdstuk hebben wij met SIMS MSI beelden gemaakt van hersencoupees van muizen met vertraagd lipiden metabolisme. Bij deze muizen ontbrak het MFP2 gen dat verantwoordelijk is voor de afbraak van zeer lange vetzuren. Wij hebben in de hersencoupees van deze muizen vetrijke afzettingen geobserveerd in specifieke spatiale patronen. Wij waren echter niet in staat om ondubbelzinnig aan te tonen waar deze SIMS-afgeleide lipiden patronen anatomisch gelokaliseerd waren. Met behulp van een protocol voor automatische vergelijking van SIMS images met de Allen Brain Atlas waren in staat de samengeklonterde vetzuren anatomisch te lokaliseren. Na de co-registratie konden wij deze plaatsen in het vierde ventrikel. Gebruikmakend van andere mogelijkheden van de Allen Brain Atlas konden wij een lijst met aan het MFP2 expressie patroon gecorreleerde genen opstellen. Verscheidene moleculaire substraten die gekoppeld zijn aan de gecorreleerde genen kunnen worden gebruikt voor toekomstige gerichte moleculaire analyse van MFP2 gen missende muismodellen. Hoewel de biologische waarde van ons onderzoek minimaal is hebben wij toekomstige onderzoeksrichtingen voorgesteld en een basis gemaakt voor aanvullend onderzoek. Vooral representeert het onderzoek getoond in *Hoofdstuk 5* een verhoging van de spatiale mogelijkheden van MSI door de geautomatiseerde combinatie met een anatomische atlas.

De nieuwe protocollen beschreven in deze thesis hebben geleid tot een voorstel voor een veelomvattende werkwijze die toegepast kan worden in verdere moleculaire onderzoeken naar hersen- en ander weefsel. Deze werkwijze, de methodologische verbeteringen die hierbij voorgesteld worden en de toepassing in toekomstig onderzoek is beschreven en bediscussieerd in *Hoofdstuk 6*.