



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE
E BIOMOLECOLARI "RODOLFO PAOLETTI" - DiSFeB

Direttore: Prof.ssa Monica DiLuca



RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA

In relazione alla richiesta per l'acquisizione di un sistema integrato di spettrometria di massa Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight/ Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/TOF) Imaging, nel quadro del finanziamento ottenuto dal Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB) come Dipartimento di Eccellenza (progetto Farmacologia Traslazionale - FATE) e per la quale si intende ricorrere all'affidamento diretto ex art. 76, comma 2, lett. b), n. 2 d.lgs. 36/2023, si specifica quanto segue:

L'acquisto di questa strumentazione è necessario al fine di perseguire gli obiettivi indicati all'interno del progetto FATE la cui finalità è quella di creare un sistema di ricerca integrato per lo studio a livello molecolare dei meccanismi alla base dei processi fisiologici e patologici.

La carenza di terapie in grado di contrastare efficacemente malattie a larga diffusione e, spesso, di natura cronica come le patologie neurologiche e psichiatriche, quelle cardiovascolari e causate da agenti patogeni, rappresenta una delle maggiori sfide dei prossimi anni. Inoltre, terapie di successo in queste aree necessitano di diagnosi precoci e tempestive. È pertanto urgente identificare bersagli farmacologici innovativi e biomarcatori efficaci. In questo scenario la comprensione nei dettagli molecolari dell'organizzazione spaziale di network biologici complessi e la conseguente specificità in termini di funzione e localizzazione cellulare e tissutale diventa un requisito essenziale per l'avanzamento delle conoscenze dei meccanismi fisiopatologici e la loro efficace traslazione ad interventi di prevenzione o di trattamenti farmacologici.

L'obiettivo del progetto FATE del DiSFeB si realizza attraverso l'impiego di approcci innovativi di biologia 2D/3D quali spatial imaging e spatial -omics in modelli in vitro e in vivo nel contesto delle linee di ricerca di maggior interesse per il dipartimento.

L'acquisizione della strumentazione sopra indicata e con le specifiche richieste dettagliate in seguito permette il rilevamento, l'identificazione e la quantificazione finalizzata alla mappatura della distribuzione di molecole biologiche da campioni di tessuto animale e vegetale con la massima sensibilità. La tecnologia che si vuole acquisire, attualmente non disponibile presso il DiSFeB, permetterà di ottenere preziose informazioni con risoluzione spaziale e compartimentalizzazione 2D/3D di proteine e metaboliti in campioni biologici di varia natura.

Lo spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF deve essere in grado di generare immagini in uno schema da griglia virtuale applicato alla superficie del campione. La tecnologia richiesta deve essere in grado di definire l'area di misurazione con una risoluzione di almeno 20 μm per poter rispondere alla domanda sperimentale, con particolare riguardo ad analisi di proteomica, metabolomica e lipidomica assicurando al contempo elevata processività. Inoltre, la possibilità di interfacciare lo spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF a strumentazioni di microscopia associata a dissezione laser già disponibili presso il DiSFeB consentirà di inviare le coordinate di determinate aree di interesse analizzate con MALDI-TOF/TOF al microscopio per il taglio specifico per permettere ulteriori analisi sulla stessa porzione di tessuto.

Per raggiungere gli obiettivi descritti nel progetto FATE attraverso approcci innovativi di biologia 2D/3D, la strumentazione che si desidera acquisire, e attualmente non disponibile nemmeno a livello di Ateneo, deve soddisfare i seguenti requisiti:



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE
E BIOMOLECOLARI "RODOLFO PAOLETTI" - DiSFeB

Direttore: Prof.ssa Monica DiLuca



- i) Garantire facilità e velocità di utilizzo nell'acquisizione delle immagini sia per il profilo proteomico che metabolomico.
- ii) Assicurare un'elevata flessibilità analitica, consentendo l'analisi multiplexed, multiomica e multimodale di proteine intere, peptidi, lipidi, metaboliti o molecole xenobiotiche.
- iii) Prevedere la possibilità di interfacciare lo strumento MALDI-TOF/TOF con strumentazioni di microscopia associata a dissezione laser (laser capture microdissection, LCM) e rendere così possibile inviare le coordinate di determinate aree di interesse analizzate con MALDI-TOF/TOF al microscopio per il taglio specifico in modo da permettere ulteriori analisi sulla stessa porzione di tessuto.
- iv) Fornire dati metabolomici, proteomici e lipidomici spaziali che possono essere integrati con quelli ottenuti dall'analisi trascrittomica spaziale mediante l'impiego di un'altra piattaforma tecnologica implementata nel progetto FATE del DiSFeB. Questo permetterà di costruire un modello molecolare che descriva quali vie metaboliche e/o di trasduzione del segnale sono regolate da un determinato intervento farmacologico e/o di silenziamento/sovraespressione di una determinata proteina

Sulla base di quanto sopra descritto, per raggiungere gli obiettivi previsti nel progetto FATE del DiSFeB e dopo un'approfondita analisi di quello che il mercato offre è stata individuata la strumentazione RapifleX® TOF/TOF di Bruker Daltonics™ come spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF che soddisfa appieno le esigenze sperimentali dei vari gruppi di ricerca del DiSFeB.

La strumentazione RapifleX® TOF/TOF fornita dalla società Bruker Italia srl per conto di Bruker Daltonics™, rappresenta la soluzione più idonea a soddisfare gli obiettivi del progetto FATE considerate le caratteristiche di seguito specificate, che complessivamente, lo rendono unico sul mercato.

La tecnologia MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization) permette il desorbimento ionico di diverse classi di analiti da diverse tipologie di tessuto/campioni. Sorgenti MALDI sono generalmente associate a detector di tipo Time-Of-Flight (TOF) in modalità assiale o ortogonale. **Il RapifleX® presenta una geometria di tipo assiale**; tale geometria permette l'analisi ad alta risoluzione di analiti in un **range di massa estremamente superiore rispetto a strumenti MALDI-TOF Ortogonali** (Range di massa fino a 500000 m/z), rendendo questo strumento perfetto per l'analisi di molecole ad alto peso molecolare (>10kDa), e complementare ad altre strumentazioni con TOF ortogonale.

Analisi di campioni biologici di origine animale o vegetale con cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC/MS) o MALDI-TOF ortogonali (come lo spettrometro TimsTOF fleX in fase di acquisizione da parte di altra struttura dell'Ateneo) consentono di ottenere un gran numero di informazioni, ma richiedono generalmente tempi piuttosto elevati di acquisizione dei dati strumentali. Inoltre, il setting strumentale è focalizzato verso molecole a medio/basso peso molecolare, limitando ad esempio la capacità di rilevazione di molecole di natura peptidica. **Lo spettrometro RapifleX®, essendo un MALDI-TOF assiale, riesce a sfruttare l'estrema velocità del laser per analisi di "Profiling" ed "Imaging" accurate e riproducibili ad una frazione del tempo rispetto a quello richiesto impiegando Tims TOF fleX, con una maggiore copertura per bassi, medi ed alti pesi molecolari.**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE
E BIOMOLECOLARI "RODOLFO PAOLETTI" - DiSFeB

Direttore: Prof.ssa Monica DiLuca



In sintesi, la strumentazione RapifleX® TOF/TOF di Bruker Daltonics™ rappresenta il top di gamma MALDI-TOF Assiale di Bruker e presenta le seguenti caratteristiche di unicità e adeguatezza alle applicazioni previste per realizzare gli obiettivi del progetto FATE:

- **Velocità di acquisizione e throughput:**

La tecnologia laser utilizzata (SmartBeam 3D) presenta:

- 10 kHz di repetition rate con un profilo modulabile;
- Garanzia di funzionamento per più di 10 miliardi di shots
- Acquisizione dati da "pixel" di forma quadrata e precisa con una risoluzione spaziale fino a 20 µm.
- Estrema velocità di acquisizione 40 pixel/secondo (per confronto lo spettrometro TimsTOF FleX presenta velocità fino a 15 pixel/secondo). 1cm² alla massima risoluzione con RapifleX® TOF/TOF (20 µm): 1,7 ore. Per confronto con lo strumento TimsTOF fleX sono richieste 5,8 ore.

- **Sinergia con altre tecnologie**

- I campioni possono essere analizzati velocemente con RapifleX® permettendo l'identificazione spaziale veloce di aree di interesse. Tali aree possono essere poi campionate e analizzate in dettaglio in LC/MS se necessario.
- Biomarcatori isolati con altri metodi possono essere ricercati e analizzati con RapifleX® in maniera "high- throughput" su diversi campioni in tempi brevi.
- L'high-throughput della strumentazione permette di ottenere velocemente risultati utilizzando la tecnologia MALDI HiPLEX-IHC da tessuti: questa tecnologia, sviluppata sulla strumentazione RapifleX®, permette l'analisi multiplexed, multiomica e multimodale per massimizzare l'informazione ottenuta da un singolo vetrino con l'analisi di proteine intere, peptidi, lipidi e metaboliti. L'alta velocità della strumentazione permette di integrare questa tecnologia in analisi di routine. L'analisi di un intero vetrino che comprende anche l'elaborazione dei dati strumentali si esegue in 40 minuti.
- La strumentazione RapifleX® è inoltre completamente integrabile con la suite software SCiLS™ (Data visualization e Data Analysis) che permette la co-registrazione di aree di interesse e l'interfacciamento a sistemi LCM (Leica LMD e Zeiss PALM MicroBeam) per l'isolamento e conseguente analisi in LC-MS o per altre tipologie di analisi.

Tutte le caratteristiche descritte non sono riscontrabili nella strumentazione disponibile presso altri operatori sul mercato e sono coperte dai seguenti brevetti:

Titolo: "Wide mass range focusing in time-of-flight mass spectrometers"

Brevetto numero: US 5,969,348 B1.

Titolo: "Mass spectrometry method for accurate mass determination of unknown ions"

Brevetto numero: US 6,188,064 B1.

Titolo: "Daughter ion spectra with time-of-flight mass spectrometers"

Brevetto numero: US 6,300,627 B1.

Titolo: "High throughput of laser desorption mass spectra in time-of-flight mass Spectrometers"

Brevetto numero: US 6,723,983 B2.

Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti"

Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano, Italia

Tel.: 02.50318294/18414/18374 - Fax: 02.50318284; e-mail segreteria: disfeb.direzione@unimi.it

Sito web: www.disfeb.unimi.it - Facebook: @DiSFeBMilano



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE
E BIOMOLECOLARI "RODOLFO PAOLETTI" - DiSFeB

Direttore: Prof.ssa Monica DiLuca



Titolo: "Clean daughter-ion spectra using time-of-flight mass spectrometers"

Brevetto numero: US 6,717,131 B2.

Titolo: "Space-angle focusing reflector for time-of-flight- mass spectrometers"

Brevetto numero: US 6,740,872 B1.

Titolo: "Biopolymer sequences by MALDI granddaughter ion spectra"

Brevetto numero: US 7,396,686 B2.

Titolo: "Laser system for the ionization of a sample by matrix-assisted laser desorption in mass spectrometric analysis" => SMARTBEAM I

Brevetto numero: US 7,235,781 B2.

Titolo: "Laser systems for the ionization of a sample by matrix-assisted laser desorption in mass spectrometric analysis" => SMARTBEAM II

Brevetto numero: US 7,385,192 B2.

Titolo: "Method and Apparatus for adjusting a sample-ion source electrode distance in a TOF mass spectrometer"

Brevetto numero: US 7,872,226 B2.

Titolo: "Adjusting the detector amplification in mass spectrometers"

Brevetto numero: US 8,536,519 B2.

Titolo: "Arrangement for a removable ion-optical assembly in a mass spectrometer"

Brevetti numero: US 8,642,945 B2, US 9,087,681 B2.

Titolo: "Control of the Laser Spot Position in MALDI Mass Spectrometers"

Brevetto numero: US 8,872,103 B2.

Titolo "Mass spectrometer with MALDI laser system"

Brevetto numero: US 8,431,890 B2.

Titolo: "Massenspektrometer mit Laserspotmuster für MALDI" => SMARTBEAM III

Brevetto numero: DE 10 2013 018 496 B4, US and GB pending.

Complessivamente le caratteristiche tecnologiche elencate non sono riscontrabili nella strumentazione disponibile presso gli altri operatori presi in considerazione e sono ben distinte rispetto alle caratteristiche tecniche e possibilità di applicazione dello spettrometro TimsTOF flex in fase di acquisizione presso altra struttura dell'Ateneo.

Il referente scientifico per l'acquisto

Prof.ssa Emma De Fabiani