



Nagy térbeli felbontású, kvantitatív lipidomikai platform fejlesztése és multiomikai kiterjesztése a tumorképződés vizsgálatára

PhD értekezés

Varga-Zsíros Vanda

Témavezető: Dr. Balogh Elek Gábor

Biokémiai Intézet

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2024

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	iii
1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. Tumorheterogenitás	2
2.2. A tumor, mint komplex szerv	3
2.3. Tumormodellek	5
2.3.1. In vitro tumormodellek	6
2.3.2. In vivo tumormodellek	7
2.3.3. Tumormodellek összehasonlítása	9
2.4. Membránok és lipidek	10
2.4.1. Membránok	10
2.4.2. Lipidek	10
2.4.2.1. A lipidek szerkezete	11
2.4.2.2. Lipidmetabolizmus	13
2.5. A tumorképződés és a lipidmetabolizmus összefüggései	17
2.6. A membránok szerepe a tumorképződésben	21
2.7. A membránok, a stresszválasz és a tumorképződés összefüggései	21
2.8. A lipidomikai munkafolyamat	23
2.8.1. Lipidextrakció	23
2.8.2. Tömegspektrometria	23
2.8.2.1. Mintabeviteli stratégiák	24
2.8.2.2. Tömeganalizátorok	24
2.8.2.3. Kvantitálás	25
2.8.3. Adatfeldolgozás	25
2.8.4. A lipidek nevezéktana	26
2.9. A térbeli felbontás növelése	27
2.9.1. Tömegspektrometriai képalkotó technikák (MSI)	27
2.9.2. Lézer-mikrodisszekcióval (LMD) kapcsolt technikák	28
3. Célkitűzés	30
4. Anyagok és módszerek	31
4.1. Mintatípusok	31
4.1.1. Sejtkultúrák	31
4.1.1.1. HeLa-Kyoto 2D sejtkultúra	31
4.1.1.2. 4T1 2D sejtkultúra	31
4.1.1.3. 4T1 szferoidok	32
4.1.2. Egérszövetminták	32
4.1.3. Egértumormodell	32
4.2. Metszetkészítés	33
4.3. Hematoxilin–eozin (HE)-festés	33
4.4. Nagy felbontású mikroszkópia és a kivágandó régiók kijelölése	33
4.5. Automatizált lézer-mikrodisszekció (LMD)	34
4.6. Lipidextrakció	35
4.6.1. 4T1 2D sejtkultúrák egyfázisú metanolos extrakciója	35

4.6.2.	Lézerdisszekciót követő in situ lipidextrakció	35
4.7.	Shotgun lipidomikai analízis.....	35
4.7.1.	Adatfeldolgozás, kiértékelés.....	36
4.8.	Proteomikai analízis.....	37
4.9.	Transzkriptomika	37
4.10.	Statisztikai módszerek	38
5.	Eredmények	39
5.1.	Lézerdisszekcióval kapcsolt, kvantitatív shotgun lipidomikai platform fejlesztése	39
5.1.1.	Áttekintés.....	39
5.1.2.	Módszerfejlesztés: extrakciós-infúziós szolvenselegy kidolgozása	39
5.1.3.	Módszervalidálás: MS mérés polaritásváltással	41
5.1.4.	Módszervalidálás: reprodukálhatóság és extrakciós hatékonyság.....	42
5.1.5.	Módszervalidálás: a kvantitálás linearitása	45
5.1.5.1.	Vesemetszet.....	45
5.1.5.2.	HeLa 2D sejtkultúra	46
5.1.6.	A módszer hatékonyságának bemutatása: a hippocampusz heterogenitása	47
5.2.	Lipidomikai vizsgálatok 4T1 <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> tumormodelleken	49
5.2.1.	4T1 szferoidok.....	50
5.2.2.	4T1 2D sejtkultúra a szferoid modellezésére	51
5.2.3.	4T1 tüdő és szubkután primer egértumorsejtök.....	52
5.2.4.	Lépbe oltott 4T1 primer tumor metasztatizálása a májban és a tüdőben	53
5.2.5.	4T1 szubkután egértumor intratumorális heterogenitása.....	54
5.3.	4T1 tumormodellek nagy térbeli felbontású multiomikai vizsgálata.....	56
5.3.1.	Multiomikai kísérleti elrendezés áttekintése	56
5.3.2.	4T1 szferoid.....	57
5.3.2.1.	A szferoidok lipidomikája	57
5.3.2.2.	A szferoidok proteomikája	59
5.3.2.3.	A szferoidok transzkriptomikája	62
5.3.2.4.	A szferoidok omikai mintázatainak összefüggései.....	65
5.3.3.	4T1 szubkután tumor.....	65
5.3.3.1.	A szubkután tumor lipidomikája	66
5.3.3.2.	A szubkután tumor proteomikája	70
5.3.4.	A szferoid és a tumor összehasonlítása	74
6.	Diszkusszió	77
6.1.	Módszerfejlesztés.....	77
6.2.	Tumormodellek az omikai eredmények tükrében.....	78
7.	Hivatkozások.....	82
8.	Összefoglalás	96
9.	Summary	99
10.	Köszönetnyilvánítás.....	102
11.	Publikációs lista	104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG	2-Arachidonoilglicerín
AA	Arachidonsav
ACLY	ATP-citrát-liáz
AGPS	Alkilglicerón-foszfát-szintáz
AKT	Proteinkináz B
ATX	Autotaxin
BIAS	Biology Image Analysis Software
BMP	Bisz(monoacilgliceril)foszfát
CA	Cornu Ammonis
CE	Koleszteril-észter
Cer	Ceramid
Cer1P	Ceramid-1-foszfát
CerS	Ceramid-szintetáz
CL	Kardiolipin
CMP	Kloroform:metanol:izopropanol
CoA	Koenzim-A
DESI	Deszorpciós elektropray ionizáció – Desorption electrospray ionization
DG	Diglicerid
DHA	Dokozahexaénsav
DHAP	Dihidrox-aceton-foszfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamid
ECM	Extracelluláris mátrix
ESI-MS	Elektropray ionizációval kapcsolt tömegspektrometria
EV	Extracelluláris vezikula
FA	Zsír-sav – Fatty acid
FA-CoA	Zsír-sav-koenzim A
FAS	Zsír-sav-szintetáz – Fatty acid synthase
<i>fasn</i>	Zsír-sav-szintetáz gén – Fatty acid synthase gene
FBS	Újszülött borjúszérum – Fetal bovine serum
FFA	Szabad zsír-sav – Free fatty acid
GluCer	Glükózilceramid
GPD2	Glicerín-foszfát-dehidrogenáz-2
GPL	Glicerofosfolipid
GSL	Glikoszfinolipid
HE	Hematoxilin-eozin
LC-MS	Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria – Liquid chromatography mass spectrometry
LMD	Lézer-mikrodisszekció
LPA	Lizofoszfátidsav
LPC	Lizofoszfátidilkolin
LPL	Lizofosfolipid
LPLAT	Lizofosfolipid-aciltranszferáz
MALDI	Mátrix-asszisztált lézerdeszorpciós ionizáció – Matrix-assisted laser desorption/ionization
MG	Monoglicerid

MS	Tömegspektrometria – Mass spectrometry
MSI	Tömegspektrometriai képalkotás – Mass spectrometry imaging
mTOR	A rapamicin emlős célpontja – Mammalian target of rapamycin
MUFA	Egyszeresen telítetlen zsírsav – Monounsaturated fatty acid
OCT	Optimal cutting temperature
PA	Foszfatidsav
PBS	Foszfáttal pufferolt sóoldat – Phosphate-buffered saline
PC	Foszfatidilkolin
PCA	Főkomponens-analízis – Principal component analysis
PC-O	Alkil foszfatidilkolin
PDX	Betegből származó xenograft – Patient-derived xenograft
PE	Foszfatidiletanolamin
PE-P	Plazmalogén foszfatidiletanolamin
PET	Polietilén-tereftalát
PG	Foszfatidilglicerín
PI	Foszfatidilinozitol
PI3K	Foszfoinozítid-3-kináz
PLA ₁ /PLA ₂	Foszfolipáz A ₁ /A ₂
PLC	Foszfolipáz C
PLD	Foszfolipáz D
PLS-DA	Részleges legkisebb négyzetek diszkriminancia-analízis – Partial least squares-discriminant analysis
PS	Foszfatidilszerin
PUFA	Többszörösen telítetlen zsírsav – Polyunsaturated fatty acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-1640
S1P	Szfingozin-1-foszfát
SCD1	Sztearoil-CoA-deszaturáz
Ser	Szerin
SL	Szfingolipid
SM	Szfingomielin
SPH	Szfingozin
TG	Triglicerid
TM	Tumor-mikrokörnyezet
CV%	Variációs együttható – Coefficient of variation
FDR	Fals pozitív arány – False discovery rate
R ²	Determinációs együttható
SD	Normál eltérés, szórás – Standard deviation
SEM	Az átlag standard hibája – Standard error of the mean

Megjegyzés: Bizonyos esetekben az angol rövidítés annyira szerves része a szaknyelvnek (pl. lipidek nevezéktana), hogy a szövegben nem használtunk magyar fordítást.

1. BEVEZETÉS

A rákos megbetegedések a világ egyik legsúlyosabb egészségügyi problémáját jelentik. 2023-as adatok szerint a kardiovaszkuláris betegségek után a második vezető halálókként tartják őket számon. A rák terápiákkal szembeni ellenállóképessége az egyik legfontosabb kutatási terület. A sikeres kezelés fő akadályát az olyan gyógyszerek hiánya jelenti, amelyek képesek a tumorsejtek ellenállóképességét megszüntetni, az áttétképzést megakadályozni és a tumor-mikrokörnyezet segítő hatását csökkenteni.

A tumorok komplex szerveknek tekinthetők, amelyek tumorsejtekből és nagyon heterogén sztrómából állnak. A tumor- és a sztrómasejtek közötti kommunikáció befolyásolja a tumorok agresszivitását és áttétképzési hajlamát, ezért a tumorheterogenitás vizsgálata nagy érdeklődésre tart számot.

A metabolikus átprogramozódás ma már a malignitás egyik védjegyeként ismert. A tumor fejlődése során a tumor- és sztrómasejtek újraaktiválják *de novo* lipogenezisüket, hogy biztosítsák a tumor növekedéséhez szükséges mennyiségű és minőségű lipidet.

A kvantitatív bioanalitikai módszerek fejlesztése elengedhetetlen a lipidmetabolikus folyamatok értelmezéséhez. Ezek között kiemelt helyet foglalnak el a tömegspektrometria alapú technikák, különösen a közvetlen mintabevitelt alkalmazó shotgun lipidomika.

A szöveti heterogenitás vizsgálatának kihívása a nagy lefedettségű omikai adatok térbeli információkkal való kombinálása, amelyre a tömegspektrometriai képalkotó technikák jelenthetnek megoldást. Ezek azonban többségükben nem képesek kvantitatív információt szolgáltatni a szöveti összetevőkről.

A térbeli felbontás növelésének alternatív módját képviselik a lézer-mikrodisszekcióval kapcsolt módszerek, amelyek az elmúlt évtizedben hódítottak teret. Népszerűségüket elsősorban a különböző sejtpopulációk szövetből történő precíz izolálásának köszönhetik, valamint annak, hogy bármilyen omikai analízissel kombinálhatóak további elemzés céljából.

PhD munkámban a lipidmetabolikus folyamatok térbeli heterogenitásának feltérképezését és az ehhez elengedhetetlen új, kvantitatív bioanalitikai módszerek fejlesztését tűztem ki célul, különös tekintettel a tumorképződés vizsgálatára.

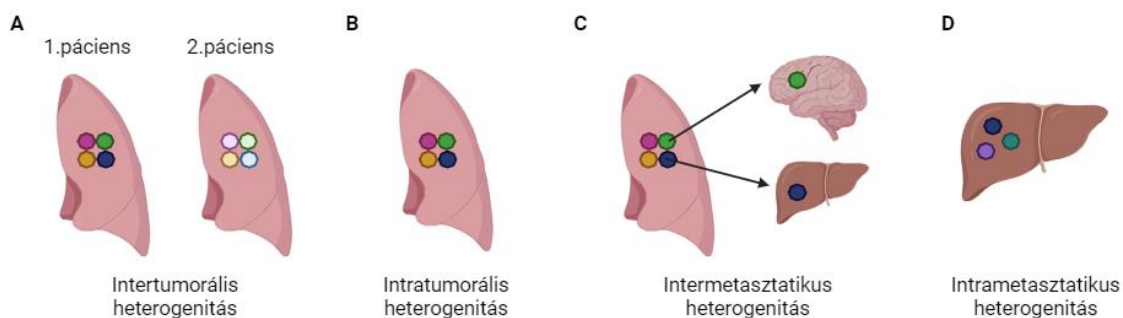
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Jelen dolgozat keretei nem teszik lehetővé, hogy minden, a doktori munkámban érintett területről és technikáról részletes bevezetést adjak, de törekedtem arra, hogy az itt következő rövid áttekintések a témához igazodva fókuszáltak legyenek, és megfelelően helyezzék kontextusba az elért eredményeket.

2.1. Tumorheterogenitás

A rák egy dinamikusan változó kórkép, amely fejlődése során fokozatosan egyre komplexebbé válik. Ennek a folyamatos evolúciónak köszönhetően egy olyan heterogén, térben és időben szüntelenül változó, különböző molekuláris tulajdonságokkal rendelkező sejttömeg alakul ki, amelyben az egyes sejtek terápiás érzékenysége, terápiára adott válasza igen eltérő (Dagogo-Jack & Shaw, 2018).

A populáció szintjén a tumorheterogenitást (**1. ábra**) két nagy csoportra oszthatjuk. Az intertumorális heterogenitás szövettanilag egyforma, de különböző páciensekből származó tumorokra vonatkozik, amelyek az eltérő etiológiai és környezeti faktoroknak köszönhetően más genotípussal és fenotípussal rendelkeznek (J. Liu és mtsai., 2018). Az intratumorális heterogenitás adott daganaton belüli, specifikus fenotípusos jellemzőkkel, egyedi molekuláris mintázattal rendelkező, különböző sejtpopulációkra utal (Jamal-Hanjani és mtsai., 2015). Az intratumorális heterogenitás lehet térbeli, ami alatt a genetikailag eltérő tumorsejt-populációk egyazon tumoron belüli egyenlőtlen eloszlását értjük, míg az időbeli intratumorális heterogenitás egy adott tumor genetikai diverzitásának időben változó, dinamikus evolúcióját jelenti (Dagogo-Jack & Shaw, 2018).



1. ábra: A tumorheterogenitás típusai

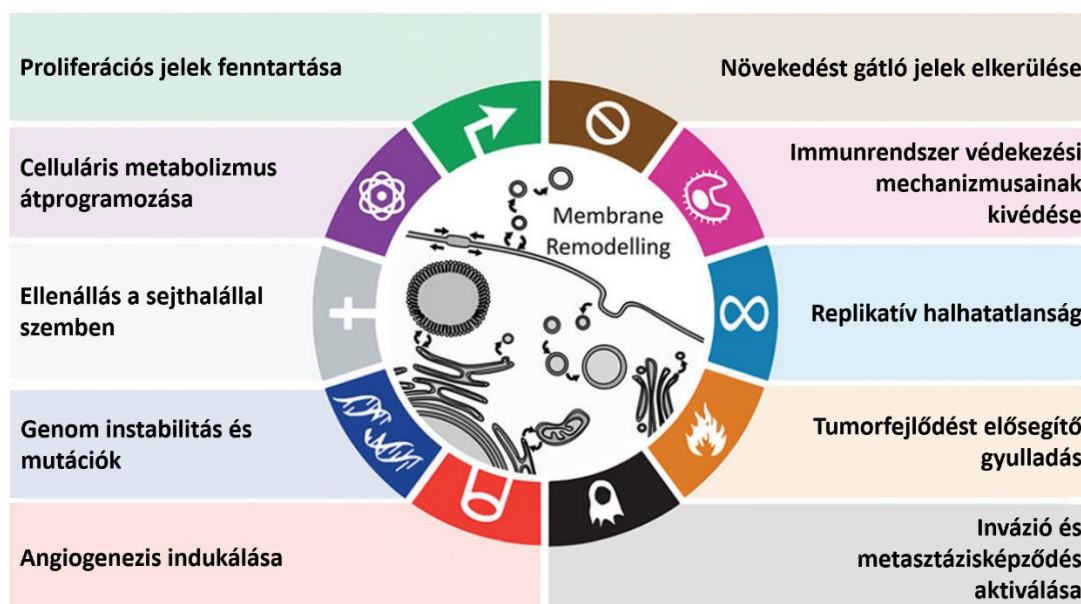
A metasztázisképződés is vezethet heterogenitáshoz (**1. ábra**), amikor a primer tumor különböző sejtpopulációi új mutációkra szert téve egy másodlagos helyet

kolonizálnak. Az intermetasztatikus heterogenitás egy primer tumorból kialakult, különböző szervekbe adott áttétekre, míg az intrametasztatikus heterogenitás egy másodlagosan kolonizált szervben kialakult áttét eltérő molekuláris jellemzőkkel rendelkező sejtpopulációira vonatkozik (Jamal-Hanjani és mtsai., 2015).

2.2. A tumor, mint komplex szerv

Mára nyilvánvalóvá vált, hogy a tumorok komplex szerveknek tekinthetők, amelyek tumorsejtekből és nagyon heterogén tumor-mikrokörnyezetből (TM, sztróma) állnak. A sztróma alkotóelemei közé tartoznak a tumorasszociált fibroblasztok, különböző immun- és gyulladásos sejtek, adipociták és neuroendokrin sejtek. A TM részei továbbá a tumort újonnan behálózó vér- és nyirokerek, valamint az extracelluláris mátrix (ECM) (Hanahan, 2022).

Elfogadott az a tény is, hogy a daganatképződésben és a rosszindulatú rákos folyamatok kialakulásában a TM komponensei is aktívan részt vesznek, és hozzájárulnak a **2. ábrán** bemutatott tumorvédjegyek modulációjához vagy akár létrejöttéhez (Hanahan, 2022; Molendijk és mtsai., 2020). A tumorheterogenitás feltérképezése, a tumor és a sztróma közötti metabolikus kommunikáció megértése, valamint a TM egyes komponensei pontos szerepének feltárása nélkülözhetetlen az új, hatékonyabb, kombinált terápiák megalkotásához.



2. ábra: Tumorvédjegyek (készült Hanahan, 2022 alapján)

A tumorasszociált fibroblasztok képesek úgy átalakítani az extracelluláris mátrixot, hogy megkönnyítsék az agresszív rákos sejtek invázióját, angienezist

indukálnak, gyulladásos sejteket toboroznak, valamint közvetlenül stimulálják a rákos sejtek osztódását azáltal, hogy növekedési faktorokat, illetve immunszuppresszív citokineket bocsátanak ki (Gout & Huot, 2008; Hlatky és mtsai., 1994; Kalluri & Zeisberg, 2006; Wiseman & Werb, 2002).

Az immunsejtek (makrofágok, neutrofilek, természetes ölősejtek, dendritikus sejtek) számos különböző citokint, kemokint és egyéb faktorokat szekretálnak, amelyek befolyásolják a tumor kialakulását és fejlődését. A makrofágok például segítenek fenntartani egy olyan krónikus gyulladásos állapotot, amely kedvez a tumor növekedésének és fejlődésének. Ezenfelül a makrofágok az első sejtek közé tartoznak, amelyek infiltrálják a gyors tumornövekedés következtében kialakult hipoxiás szöveti területeket annak érdekében, hogy stimulálják a neoangiogenezist. Továbbá közvetlen sejt-sejt kapcsolatokon keresztül szuppresszálni tudják az immunsejtek működését, így serkentik a tumor fejlődését (Cendrowicz és mtsai., 2021).

Az extracelluláris mátrix tartalmazza az összes tumor- és sztrómasejt által szekretált citokint, növekedési faktort és hormont, amelyek biztosítják a folyamatos kommunikációt a sejtek között. Ezenkívül az ECM által biztosított hipoxiás és savas környezet kedvez a tumorsejtek túlélésének és gyors tumornövekedéshez vezet (M. Wang és mtsai., 2017).

A tumorasszociált adipociták a tumorsejtek által kibocsátott jelek hatására képesek lebontani a bennük tárolt lipideket glicerinné és szabad zsírsavakra, ezáltal biztosítva a malignus sejtek tápanyagellátását. Ezenkívül nagy energiájú metabolitokat (piruvát, laktát) és szabad savakat szekretálnak, amelyek elegendő energiát biztosítanak a rákos sejtek metabolikus átprogramozásához (Yao & He, 2021).

Az új vér- és nyirokerek képződése a tumornövekedés és áttétképzés egyik kulcsfeltétele. Az angiogenezis a gazdaszerv ereiből indul ki a tumorsejtek által a hipoxiás környezet hatására termelt faktorok következtében (Onimaru & Yonemitsu, 2011). A proangiogenikus szignáloknak köszönhetően olyan új, rendellenes morfológiájú, elágazó, hibás bazális membránnal rendelkező, pericitákkal borított vér- és nyirokerek képződnek, amelyek annak ellenére, hogy ezen rendellenességek miatt gyenge funkcionalitást feltételezünk róluk, képesek ellátni a tumorsejteket tápanyaggal és oxigénnel, valamint elszállítani a felhalmozódott szén-dioxidot és metabolikus termékeket. Ennek köszönhetően biztosítják a tumorsejtek túlélését, a tumor növekedését, valamint segítik a tumorsejtek bejutását a vér- és nyirokkeringésbe, elősegítve ezzel a metasztázisképzést (De Palma és mtsai., 2017).

Az extracelluláris vezikulák (EV) kritikus szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban (Kudo és mtsai., 2022). A rákos sejtek által termelt EV-k fehérjék, mRNS-ek, mikroRNS-ek és lipidek transzportja révén olyan sejt-sejt kommunikációt alakítanak ki, amely támogatja a tumorsejtek növekedését és túlélését, segíti a TM kialakítását, és növelheti a tumorsejtek inváziós képességét és metasztatikus aktivitását (Chang és mtsai., 2021).

A tumorsejtek és a TM tehát egy flexibilis, folyton változó rendszert alkot, amely adaptívan reagál a környezet megváltozására. Emiatt a rákos megbetegedések jelentős hányadához rossz prognózis társul. A hagyományos sebészeti eljárásokon, sugár- és kemoterápiákon túl számos ígéretes kiegészítő terápia áll fejlesztés alatt, amelyek a TM egyes elemeit célozzák. Például a vaszkuláris-endoteliális növekedési faktor képződése, receptorain keresztüli jelképzése az ezt célzó terápiás fejlesztések célkeresztjébe került (Ghalehbandi és mtsai., 2023). Gátlására számos monoklonális ellenanyagot, rekombináns fúziós fehérjét, ill. receptor tirozinkináz inhibitort fejlesztettek ki az utóbbi években (Elebiyo és mtsai., 2022). Egy másik példa az ún. immunellenőrző pont fehérjék ellen kifejlesztett inhibitorok csoportja. Az immunellenőrző pontok akkor lépnek működésbe, amikor a T-sejtek felszínén lévő fehérjék felismerik partnerfehérjéjüket és kötődnek hozzá. A két fehérje kapcsolódásakor a tumorsejt egy „kikapcsoló” szignált küld a T-sejtnek, ezzel megakadályozva, hogy az immunrendszer elpusztítsa. Az inhibitorok megfosztják a tumorsejteket a TM támogatásától, és lehetővé teszik, hogy azokat a citotoxikus T-sejtek elpusztítsák. Ezeket a szereket sikeresen alkalmazzák számos szolid tumor kezelésénél (Shiravand és mtsai., 2022). Egy egészen új, a lipidmetabolizmust érintő felfedezés, hogy a limfóma eredetű EV-k protumorigén hatását fokozza egy szekretált foszfolipáz A₂, amelynek inhibíciója humanizált egerekben csökkentette a tumornövekedést (Kudo és mtsai., 2022).

2.3. Tumormodellek

A tumor komplexitásának, a tumor és a TM kölcsönhatásainak, az áttétképződésnek és a különböző kemoterapeutikumokkal szemben mutatott rezisztencia kialakulásának megértéséhez nélkülözhetetlenek a különböző tumormodellek. Ezek az *in vitro* és *in vivo* rendszerek adják a tumorkutatás alapját, és teszik lehetővé, hogy olyan vizsgálatokat végezzünk, amelyek gazdasági, erkölcsi és jóléti megfontolások miatt nem kivitelezhetőek betegeken.

2.3.1. *In vitro* tumormodellek

A tumorbiológia és onkológia területén a legrégebb óta használt, legelterjedtebb *in vitro* modellrendszerek a 2D sejtkultúrák. Ennek legfőbb oka, hogy a 2D tenyészetek könnyen kezelhetők, olcsó a fenntartásuk, immortalizáltak, a sejtek közötti heterogenitás igen kismértékű és alkalmasak nagy áteresztőképességű kísérletek tervezéséhez. Azonban számos hátránnyal is rendelkeznek. A Petri-csésze mesterségesen kialakított, szintetikus, lapos felületén tenyésztett sejtek szabadon kitapadhatnak, nőhetnek, osztódhatnak. Ilyen körülmények között elveszítik eredeti morfológiájukat, polarizáltságukat, és olyan létfontosságú szignálútvonalak működése sérül vagy szűnik meg, amelyek segítségével a sejt reagál a külső stimulusokra, ezért biológiai relevanciájuk megkérdőjelezhető (Gillet és mtsai., 2013; Katt és mtsai., 2016). Az *in vivo* tumornövekedés dinamikáját sem mutatják be pontosan, hiszen mesterséges körülmények között (standard tápoldatok, szérum) minden sejt számára egyformán hozzáférhető az összes növekedéshez és osztódáshoz szükséges erőforrás, míg *in vivo* ez nem mindig valósul meg (Sharma és mtsai., 2010). Ugyancsak nem tükrözik egy valós tumor heterogenitását, hiszen egy sejttenyészetből hiányoznak a sztrómális komponensek. Így például egy tumorterápiás hatóanyag hatékonyságának vizsgálata során a klinikumba való adaptálhatóság és alkalmazhatóság nehezen megjósolható (McMillin és mtsai., 2013; Róbert & János, 2015). Ezenfelül a folyamatos, ciklikus fagyasztásnak és felolvasztásnak köszönhetően a sejtek evolválódnak és szelektálódnak. Így az azonos, de két különböző laborban tenyésztett sejtvonalak eltérő genetikai profillal rendelkezhetnek, ami szintén megkérdőjelezi a világszerte rohamosan keletkező adatok és eredmények valós interpretációját.

Az utóbbi években a háromdimenziós sejttenyésztési módszerek egyre nagyobb teret hódítanak. A 2D tenyészetekkel szemben a 3D módszereknél a sejtek képesek több rétegben nőni, így morfológiájuk és polarizáltságuk megmarad, valamint metabolikus folyamataik sem sérülnek. Ezenfelül a különböző rétegekben elhelyezkedő sejtek különböző mértékben jutnak oxigénhez és tápanyaghoz, így egy ilyen rendszer jobban modellezi a valós fiziológiás körülményeket (Däster és mtsai., 2017). A 3D modellek közé tartoznak a szferoidok, az organoidok, valamint a tumor-on-a-chip rendszerek.

A szferoidok olyan mikroméretű sejtaggregátumok, amelyek belső szerkezetüket, heterogenitásukat, szignálútvonalaikat, növekedési kinetikájukat, génexpressziós mintázatukat, sejt-sejt interakcióikat tekintve alapvetően hasonlítanak egy avaszkularizált daganatos sejtszövetesüléshez, mikrometasztázishoz. A nagyobb méretű szferoidoknál

(>500 μm) már különböző sejtrétegeket figyelhetünk meg, hiszen a szferoid belseje felé haladva egyre csökken az oxigén és tápanyag mennyisége, valamint a pH, míg a széndioxid, laktát és katabolitok mennyisége nő. Legbelül, sejttípustól függően, egy anoxiás, savas mag helyezkedhet el, ahol a sejtek már nekrotizálhatnak, ezt követi egy hipoxiás, középső sejtréteg, amelyben a sejtek alvó/nyugalmi állapotban vannak, végül egy aktívan proliferáló, vékony külső sejtréteg (Han és mtsai., 2021). A szferoidok ezért népszerű modellek a nagy átteresztőképességű gyógyszer-rezisztencia kísérleteknél és tumorterápiás szerek vizsgálatánál (Mehta és mtsai., 2012). Ugyanakkor hátrányuk, hogy a TM-et nem vagy csak részlegesen képesek modellezni. Ezenkívül a szferoidformáláshoz használatos bizonyos módszerek nem alkalmasak azonos méretű szferoidok reprodukálható előállítására (Katt és mtsai., 2016). A standard biokémiai vizsgálatok, mint az életképesség és citotoxicitás mérése, egyelőre nem kompatibilisek a szferoidokkal a próbák gyenge penetrációja miatt. A fény gyenge penetrációja miatt az optikai, konfokális, „light-sheet”, fázis-kontraszt és fluoreszcens mikroszkópiai vizsgálatok is kevésbé hatékonyak (Manduca és mtsai., 2023).

Az organoidok olyan összejtekből (pluripotens magzati vagy felnőtt) származó 3D sejtkultúrák, amelyekben a sejtek spontán módon önszerveződnek megfelelően differenciált sejttípusokká (Huch & Koo, 2015). A modell nagy előnye, hogy lehetővé teszi a betegspecifikus modellalkotást, ami a személyre szabott diagnosztika és terápia területén jelent előnyt (Kim és mtsai., 2019). Hátránya, hogy nagyon idő- és energiaforrás-igényes, kényes modellrendszer, és a TM hiánya nagyban megnehezíti a kísérleti eredmények klinikai értelmezését (Neal és mtsai., 2018).

A tumor-on-a-chip technológia egy gyorsan fejlődő, innovatív rendszer, amely a sejtbiológiát a mikrotechnikával és a mikrofluidikával ötvözi. Technikai összetettsége miatt azonban nagy szakértelmet követel, és csak miniatürizált tumorok elemzésére alkalmas (Imparato és mtsai., 2022).

2.3.2. *In vivo* tumormodellek

Az egér a leggyakrabban használt *in vivo* modellrendszer a rákkutatásban a különböző környezetekhez való nagyfokú alkalmazkodóképessége és genetikai variabilitása miatt. Az egértumormodellek 3 fő csoportját különböztetjük meg: 1) a karcinogén-indukált, 2) a genetikailag módosított, valamint 3) az allograft és xenograft modelleket. Jelen dolgozatban az allograft és xenograft modellek jelentőségét és tulajdonságait tárgyalom részletesebben.

A szingenikus egértumormodellek (allograft modellek) esetében egértumor-sejtvonalat oltanak egy immunkompetens állatba. Széleskörűen elterjedt, könnyen előállítható modellrendszer, amely valós immunkörnyezetben teszi lehetővé a tumor és a TM kapcsolatának teljes körű vizsgálatát. Kitűnően alkalmas a tumorfejlődés, az invázió és metasztázisképződés valós idejű tanulmányozására (Bos és mtsai., 2010), valamint immunterápiás szerek fejlesztésére és tesztelésére (Olson és mtsai., 2018). Széleskörű alkalmazása ellenére a modell hátrányai között meg kell említeni, hogy egyrészt meglehetősen korlátozott azon sejtvonalak száma, amelyek allograft modellek előállításához használhatóak, másrészt annak ellenére, hogy valós immunkörnyezetben lehet tanulmányozni egy tumor fejlődését, az egér és a humán immunrendszer működési különbségei jelentősen megnehezítik az adatok interpretációját (Chulpanova és mtsai., 2020; Ireson és mtsai., 2019).

Az *in vivo* xenograft modellek lehetővé teszik különböző humán tumorsejtvonalak és humán tumorok vizsgálatát immundeficiens vagy immunhiányos állatban. Attól függően, hogy a vizsgálni kívánt sejtvonalat szubkután vagy ortotopikusan injektáljuk az állatba, beszélhetünk ektopikus vagy ortotopikus xenograft modellekről. A tumordisszemináció és metasztázisképződés vizsgálatára a metasztázismodellek állnak rendelkezésünkre, ahol luciferáz-aktivitással rendelkező tumorsejteket injektálnak az egér farokvénájába (Jung, 2014).

A jelenleg leghatékonyabb preklinikai tumormodell a betegből származó xenograft (patient-derived-xenograft, PDX), amelynek előállítása során nem sejteket, hanem egy humán tumorból származó szövetdarabot ültetnek immundeficiens állatba (pl.: egér, zebrahal), így a beültetett tumor megőrzi az eredeti primer tumor belső szerkezetét, heterogenitását (Y. Liu és mtsai., 2023). A rágsáló-PDX modellek előnye az állatok emberhez hasonló testhőmérséklete (37 °C), valamint a rágsáló és a humán szervezet közti nagy hasonlóság. Előállításukhoz azonban hónapok, akár évek szükségesek. Ezzel szemben a zebrahal-PDX modellek létrehozásához mindössze néhány nap elegendő, és a zebrahalban számos, rákkal kapcsolatos szignálút vonal evolúciósan konzervált (Hason & Bartúněk, 2019), ideális tenyésztési hőmérséklete (28 °C) viszont lényegesen alacsonyabb az emlősökénél (W. Wang és mtsai., 2023). Az *in vivo* xenograft modellek általános hátránya, hogy nagyon költségesek, előállításuk komoly szaktudást és szigorú laboratóriumi feltételeket követel meg (Sajjad és mtsai., 2021), továbbá immunszupprimált állat szükséges hozzájuk, ami megakadályozza az immunrendszert célzó terápiás lehetőségek vizsgálatát.

Az utóbbi időben egyre elterjedtebbé és népszerűbbé váltak a humanizált xenograft modellek. Ebben az esetben a humán tumor mellett humán immunrendszeri komponenseket is transzplantálnak az immundeficiens állatba, jellemzően CD34+ hematopoetikus őssejteket vagy csontvelő-máj-thymus szöveteket (Jin és mtsai., 2021). Így olyan immunkörnyezet hozható létre, amely sokkal közelebb áll a humán immunrendszer valós működéséhez (Morton és mtsai., 2016).

2.3.3. Tumormodellek összehasonlítása

Ahogy a fentiekből láthattuk, mindegyik modellrendszer rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal; ezeket összegzi az **1. táblázat**. Bár nem tökéletesek, a tumormodellek kapcsolatot teremtenek az alap kutatás, a transzlációs medicina és a valós humán tumorok között. Segítik a tumorfejlődés hátterében zajló patológiás biokémiai és genetikai folyamatok megértését, és nélkülözhetetlenek új tumormarkerek azonosításához, célzott terápiák és gyógyszerek fejlesztéséhez.

1. táblázat: Tumormodellek összehasonlítása

Tumormodell		Előnyök	Hátrányok	
<i>in vitro</i>	2D sejtkultúra	+ könnyű kezelhetőség + olcsó + nagy áteresztőképesség	– megkérdőjelezhető biológiai relevancia – tumorheterogenitás hiánya	
	3D szferoid	+ jól modellez egy avaskularizált mikrometasztázist + nagy áteresztőképesség	– TM hiánya – kevésbé reprodukálható – standard biokémiai és mikroszkópai vizsgálatok korlátozottak	
	3D organoid	+ betegspecifikus modellalkotás + a tumorfejlődés stádiumainak modellezése	– drága és kényes – TM hiánya – standardizált protokollok hiánya	
	Tumor-on-a-chip	+ a TM szabályozható modellezése + az állatmodelleknél olcsóbb	– bonyolult – nem alkalmas valós méretű tumorok vizsgálatára	
<i>in vivo</i>	Szingenikus egérmodell	+ könnyű előállíthatóság + tumor-TM kapcsolat valós immunkörnyezetben + a tumorfejlődés tanulmányozása	– a felhasználható sejtvonalak száma korlátozott – az adatok humán “extrapolálása” nehézkes	
	Rágcsáló-PDX	+ a rágcsáló és a humán szervezet közti nagyfokú hasonlóság	– immunrendszert célzó vizsgálatokra nem alkalmas – előállítása hosszadalmas	– költséges – komoly szaktudást és szigorú laborkörülményeket követel
	Zebrahal-PDX	+ nagy áteresztőképesség + gyors létrehozás + evolúciósan konzervált tumoral kapcsolatos szignálút vonalak	– immunrendszert célzó vizsgálatokra nem alkalmas – a humántól eltérő ideális testhőmérséklet (28 °C)	
	Humanizált egérmodell	+ immunrendszert célzó vizsgálatokra is alkalmas		

2.4. Membránok és lipidek

A membránok és lipidek szerepe a tumor metabolikus átprogramozódásában rendkívül sokrétű (Molendijk és mtsai., 2020). Ennek jobb megértéséhez először egy rövid betekintést adunk a területre.

2.4.1. Membránok

A biológiai membránok képezik azt a szerkezeti keretet, amely a sejteket környezetüktől elhatárolja és – eukariótákban – lehetővé teszi a kompartmentalizációt (Vigh és mtsai., 1998). Ez a kompartmentalizáció biztosítja a specifikus kémiai reakciók elkülönítését a biokémiai hatékonyság növelése és a reakciótermékek szétterjedésének korlátozása érdekében.

A biológiai membránok lipidekből és fehérjékből felépülő, vízzel nem elegyedő struktúrák, amelyekben bizonyos szabadságfokú diffúzióra mind rotációsan, mind laterálisan lehetőség nyílik (van Meer és mtsai., 2008). A sejtmembrán szerkezeti alapja a kettősréteggént ismert struktúra, ami amfipatikus, a vízzel kapcsolatba kerülő hidrofíl részből és a vizes médiumtól izoláltan maradó lipofil részből álló lipidmolekulák önszerveződésével jön létre.

2.4.2. Lipidek

A lipidek megdöbbentő szerkezeti változatossággal bíró bioaktív kismolekulák, számukat a modern analitikai technikáknak köszönhetően több tízezerre becsülik. Genetikailag nem kódoltak, hanem összetett táplálkozási és fiziológiás kontroll alatt álló metabolikus reakciók termékei, ezért a lipidek sokaságát magába foglaló lipidom egyedi ujjlenyomatként tudósít a szervezet aktuális állapotáról. A teljes szervezettől a lipid kettősréteg rétegeinek szintjéig megfigyelhető szerkezeti sokféleség nagy mértékű mennyiségi és aránybeli különbségekkel is párosul. Ez a komplex diverzitás sokféle funkció betöltését sejteti, amelyeket még csak most kezdünk el részleteiben felfedezni, és megérteni, hogy hogyan lehetnek a lipidhomeosztázis akár kis változásai is jelentős befolyással alapvető biológiai folyamatokra, és hogyan hozhatóak összefüggésbe számos betegség, mint például metabolikus, kardiovaszkuláris és neurodegeneratív kórképek vagy éppen a rák kialakulásával (Harayama & Riezman, 2018).

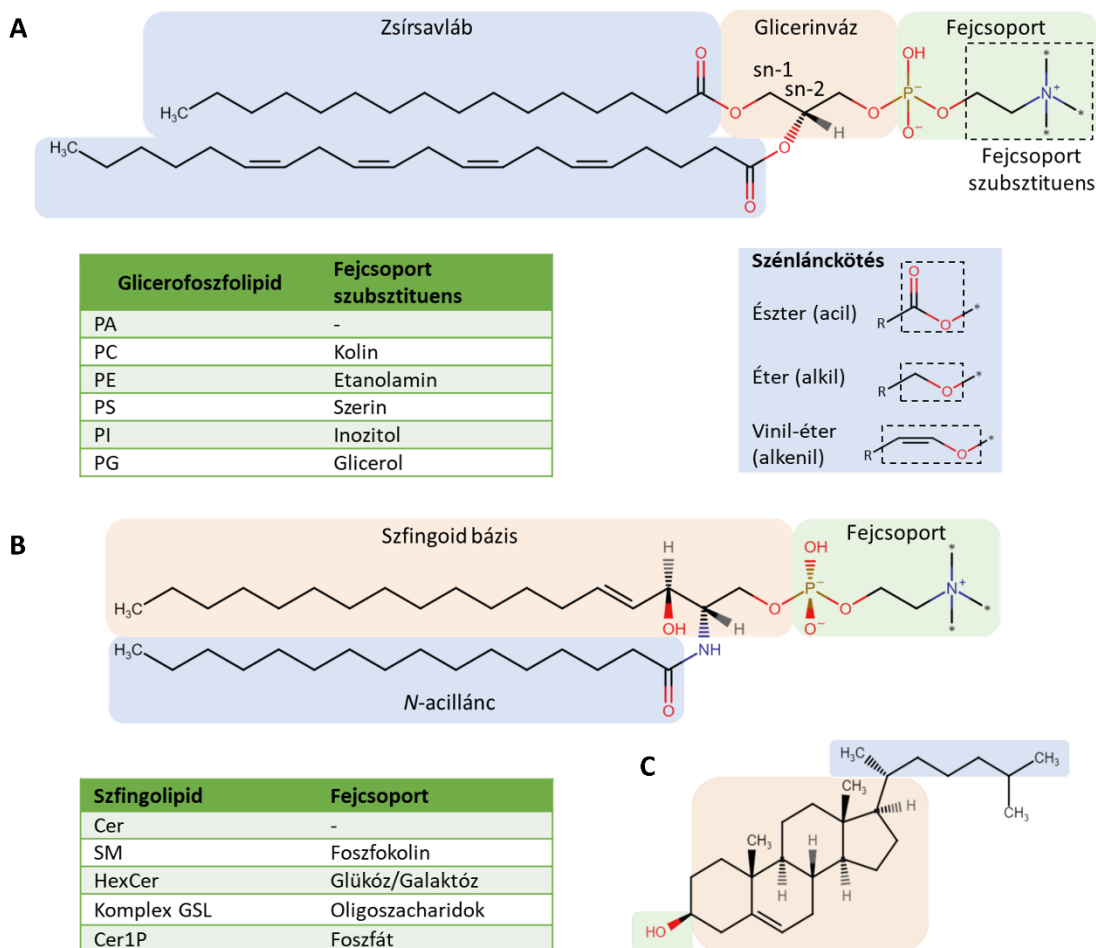
2.4.2.1. A lipidek szerkezete

A lipidek kémiai szerkezete három alapvető funkciót szolgál: a biológiai membránok építőköveiként *szerkezeti szerepet* töltenek be, lipidcseppecskékben raktározva könnyen mozgósítható *energiát tárolnak*, illetve rendkívül sokrétű közvetlen és közvetett *jelátviteli folyamatban* vesznek részt. A dolgozat témájával összhangban a **3. ábra** az emlős membránlipidekre fókuszál; három fő csoportjuk az amfipatikus tulajdonságú glicerofoszfolipidek (GPL, **3A ábra**) és szfingolipidek (SL, **3B ábra**), valamint a koleszterin (**3C ábra**). A fő raktározó lipidek a glicerinváz, mindhárom hidroxilcsoporton zsírsavval észteressített trigliceridek (TG), valamint a koleszterin OH-csoportjának észteressítésével keletkező koleszteril-észterek (CE). A jelátviteli lipidek a membránlipidek metabolizmusával képződő, rendkívül változatos és általában kis koncentrációban előforduló molekulacsoport.

A GPL-ek (**3A ábra**) sokféleségének forrása a két hidrofób zsírsavláb szerkezeti változatossága és kombinálhatósága a glicerinváz sn-1 és sn-2 pozíciójában, a szénláncötés típusa az sn-1 pozícióban, valamint a foszfátartalmú hidrofil fejcsoport variálhatósága. A zsírsavak szerkezeti diverzitása elsősorban a szénlánc hosszának (jellemzően C14–24), a kettős kötések számának (0–6) és pozíciójának változásából adódik. A glicerinváz sn-1 pozíciójában jellemzően telített, míg az sn-2 pozícióban telítetlen zsírsavat találunk. A hidrofil fejcsoportban a foszfátcsoportot leggyakrabban kolin, etanolamin, inozitol vagy szerin észteressíti, létrehozva így a legabundánsabb membránlipideket, rendre a foszfatidilkolint (PC), a foszfatidiletanolamint (PE), a foszfatidilinozított (PI) és a foszfatidilszerint (PS). A szerkezeti diverzitás tekintetében fontos megemlíteni a szénláncötés lehetséges típusait is. Kétségtelenül a leggyakoribb az alapváz hidroxilcsoportjához észterkötéssel történő kapcsolódás; ilyenkor valóban zsírsav az észteressítő ágens. Az ún. éterlipidek esetében a glicerinváz sn-1 hidroxiljához zsíralkohol kapcsolódik a bioszintézis során (ld később); az így létrejövő éter (alkil), illetve vinil-éter (alkenil) típusú vegyületek egyes szövetekben (pl. az agyban), illetve patológias állapotokban (pl. rák) jelentősen feldúsul(hat)nak.

A SL-ek (**3B ábra**) sokféleségének forrása a szfingoid bázis alapváz, az *N*-acillánc és a fejcsoport változatosságából ered. A legfontosabb emlős szfingoid bázis a 18 szénatom hosszú, a 4-es pozícióban transz kettős kötést tartalmazó szfingozin. Az alapváz aminocsoportjának észteressítésével kapjuk a ceramidokat (Cer); az észteressítő zsírsav általában szaturáltabb és hosszabb, mint a GPL-ek zsírsavai, és gyakrabban tartalmaz hidroxil szubsztituenst. Az egyik legfontosabb szerkezeti szfingolipid az 1-es pozícióban

fejcsoportként foszfokolint tartalmazó szfingomielin (SM). Amennyiben a fejcsoport cukormolekula, glikoszfingolipidekről (GSL) beszélünk. A cukormolekulák (itt nem részletezett) szerkezete, száma és kötődési típusai zavarba ejtő változatosságot mutatnak, analízisük komoly kihívást jelent.



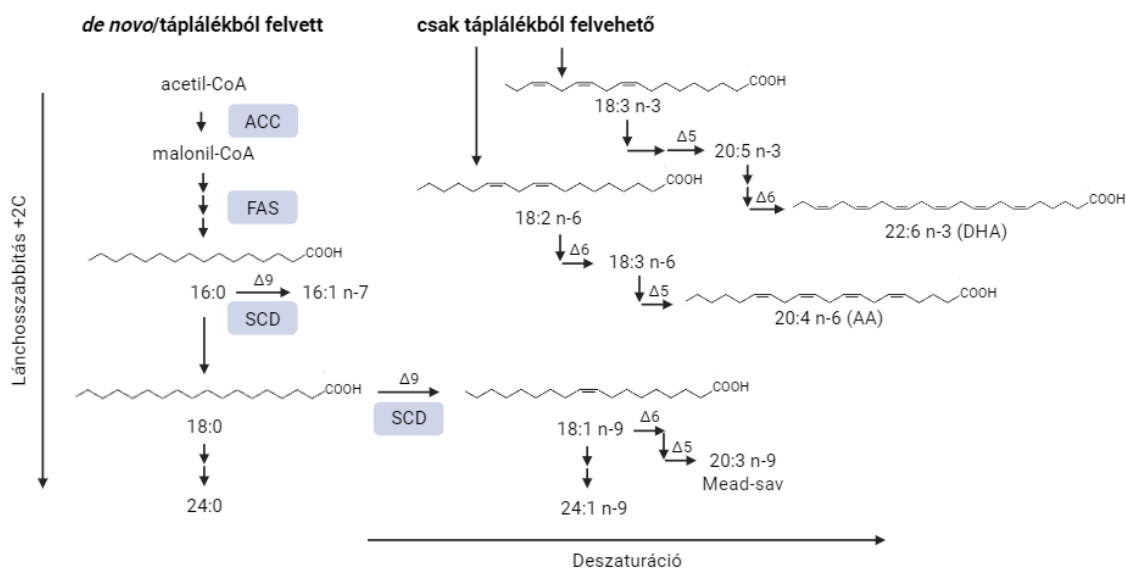
3. ábra: A fő membránlipidek szerkezeti sokfélesége. A) Glicerofosfolipidek, B) Szfingolipidek, C) Koleszterin. Cer, ceramid; Cer1P, ceramid-1-foszfát; GSL, glikoszfingolipid; HexCer, hexozilceramid; PA, foszfatisav; PC, foszfatidilkolin; PE, foszfatidiletanolamin; PG, foszfatidilglicerin; PI, foszfatidilinozitol; PS, foszfatidilszerin; SM, szfingomielin.

A membránlipidek kémiai szerkezete meghatározza méretüket, alakjukat, szolvatációjukat, kollektív szinten pedig a membrán alapvető fizikai-kémiai tulajdonságait. A fluiditás, a felületi töltéssűrűség, a lipid „packing”, a görbületképzés, a merevség, az összenyomhatóság, a permeabilitás vagy a vastagság mind olyan paraméterek, amelyeken keresztül a lipidek alapvető biológiai folyamatokat szabályoznak.

2.4.2.2. Lipidmetabolizmus

A lipidek kémiai és összetételbeli diverzitását a lipidmetabolikus hálózat három jellemzőjére vezethetjük vissza: 1) a lipidmetabolikus enzimek gyakran működnek hasonló szubsztrátok széles skáláján, vagyis néhány enzim képes a különböző lábösszetételű specieszek előállítására (*promiszkuitás*), 2) ugyanakkor az enzimek egyedi *szubsztrátpreferenciával* is rendelkeznek, aminek eredményeként a különböző termékek különböző arányban képződnek, 3) végül pedig a lipidmetabolizmus sok lépése használ különböző preferenciájú *redundáns* enzimeket, a lipidösszetétel változatossága így ezen enzimek expressziójától függ, ami – pl. szövetspecifikusan – meglehetősen eltérő lehet (Harayama & Riezman, 2018).

A zsírsavak a komplex lipidek alapvető építőkövei, ugyanakkor maguk is számos metabolikus és jelátviteli funkcióval bírnak. A citoplazmában zajló *de novo* zsírsavszintézis során kétszénatomos acetyl-CoA egységek lépésenkénti összeszerelésével jutunk el a telített palmitinsavig (16:0), amiből aztán különböző lánchosszabbítási és/vagy deszaturációs, valamint hidroxilezési lépéseken keresztül képződik a zsírsavak széles palettája (**4. ábra**) (Ali & Szabó, 2023).



4. ábra: Zsírsavak szerkezete és szintézise. AA, arachidonsav; ACC, acetyl-CoA-karboxiláz; DHA, dokozaheksaénsav; FAS, zsírsav-szintetáz; SCD, sztearoil-CoA-deszaturáz.

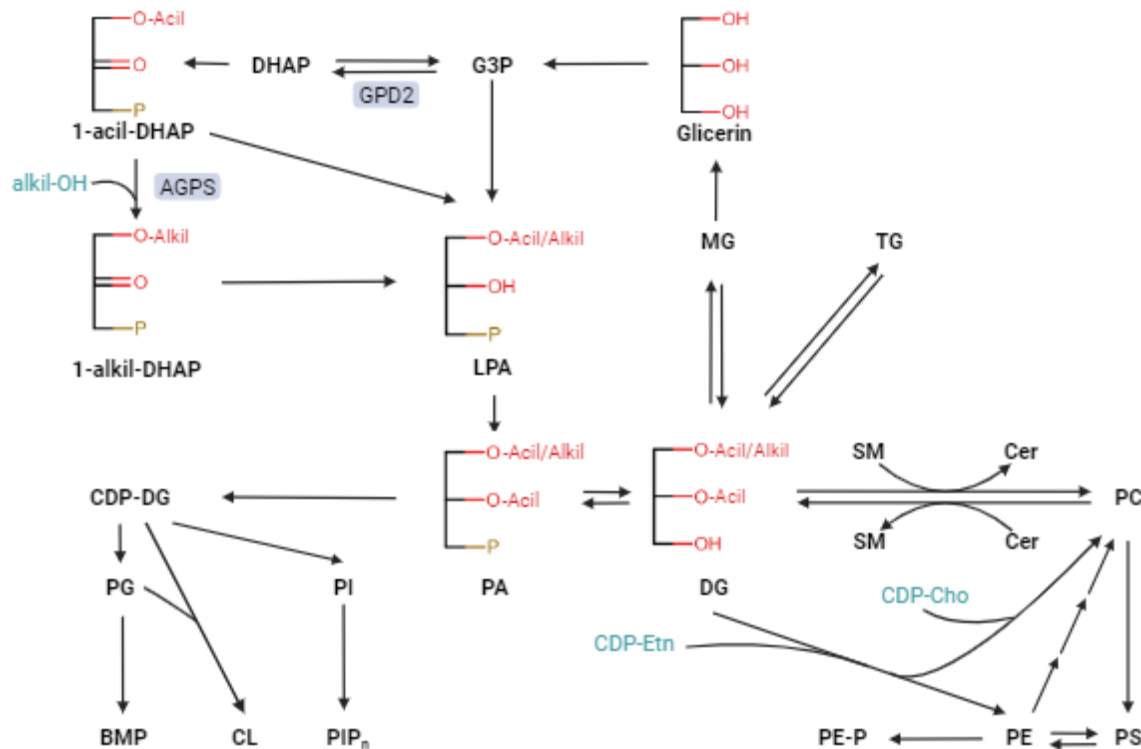
A zsírsavak jelölésére az (XX:Y n-Z) formulát használjuk, ahol az X a szénlánc hosszát, Y pedig a kettős kötések számát jelzi. Az általában *cis* konfigurációjú és egymástól metilénhidakkal elválasztott kettős kötések pozíciójának jelölésére a szabad zsírsavvégtől számított pozíciót adjuk meg (n-Z). A legabundánsabb és legfontosabb

emlős zsírsavak közé tartozik a telített palmitinsav (16:0) és sztearinsav (18:0), az egyszeresen telítetlen olajsav (18:1 n-9) és a két kettős kötéssel rendelkező linolsav (18:2 n-6), továbbá a politelítetlen arachidonsav (AA, 20:4 n-6) és dokozaheksaénsav (DHA, 22:6 n-3) (**4. ábra**). Fontos kiemelni, hogy az emlősök nem képesek az első elongációs és deszaturációs lépés után keletkező olajsavból többszörösen telítetlen zsírsavakat szintetizálni (kivétel az ún. Mead-sav, 20:3 n-9), azok beépítéséhez külső tápanyagforrásra van szükség, ezért a táplálkozás jelentős befolyással van a lipidösszetételre.

A szervezet szintjén a lipogenezis elsősorban a hepatocitákban és az adipocitákban zajlik. A sejt szintjén a komplex lipidek szintézisének fő színtere az endoplazmatikus retikulum, de más organelleknek is jut szerep, pl. a TG és CE szintézisében a lipidcseppecskék vesznek részt, a komplex szfingolipidek előállítása pedig a Golgi apparátusra specializálódik. A foszfatidilglicerin (PG) és a kardiolipin (CL) mitokondriális, míg a bisz(monoacilgliceril)foszfát (BMP) lizoszómális markerlipidként ismertek. Intenzív és specifikus válogatási és szállítási („sorting”) események következtében a sejtorganellek lipidösszetétele jelentősen eltér a sejten belül (Casares és mtsai., 2019; van Meer és mtsai., 2008).

A glicerinvázis lipidek bioszintézisének kiindulási vegyületei a glikolízisből származó dihidroxiacetonfoszfát (DHAP) és a glicerin-3-foszfát (G3P), amelyek ezáltal kapcsolódási pontot biztosítanak a két nagy metabolikus kör között. Ezen szubsztrátokból koenzim-A-aktivált zsírsavak beépítésével először a közös prekursor foszfatidsav (PA) jön létre 1-acil-lizofoszfatidsavon (LPA) keresztül (**5. ábra**). A különböző fejcsoporthú membránlipidek szintézise a PA-ból kétféle mechanizmussal történik. Citidin-difoszfát-aktivált diglicerid (CDP-DG) köztiterméken át képződik a PI és a PG (valamint a CL és a BMP), míg a PC és a PE (valamint a PS) szintézisekor a PA-foszfátáz révén keletkező diglicerid (DG) kapcsolódik CDP-aktivált poláris fejcsoporthúkkal (CDP-kolin és CDP-etanolamin). A PC PE-ből is keletkezhet szekvenciális metilezések útján, harmadik lehetséges szintézisútja pedig kapcsolódási pontot jelent a GPL- és SL-metabolizmus között, amikor az SM degradációjával termelődő Cer mellett a visszamaradó foszfokolin fejcsoporthú DG-hez kötődik. A DG-ből egy további zsírsav felvételével TG keletkezhet, így a DG fontos köztitermék a membránlipid/raktározó lipid arány szabályozása tekintetében is. Mindemellett a DG sokrétű jelátviteli szerepet is betölt számos szignálfehérje (pl. proteinkináz C) aktiválása vagy toborzása révén.

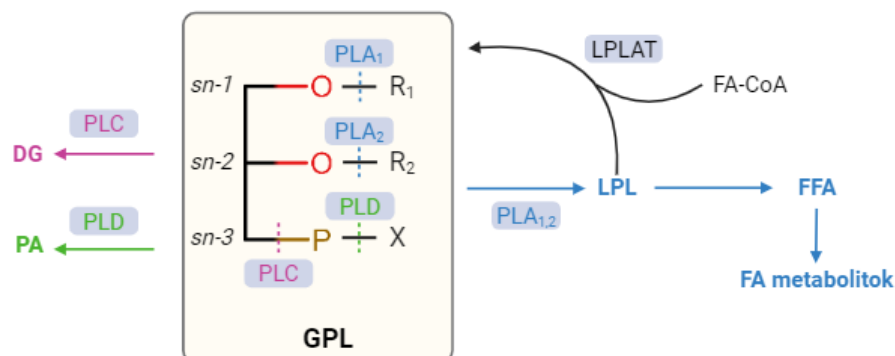
Az éter típusú glicerolipidek szintézisének első két lépése a peroxiszómában zajlik, ahol az 1-acil-DHAP acilcsoportja zsíralkohollal történő szubsztitúció során alkilcsoportra cserélődik; a reakciót az alkilglicerofoszfát-szintáz (AGPS) katalizálja. Az 1-alkil-DHAP redukciójával keletkező 1-alkil-LPA-t már a diacil lipidek szintéziséért is felelős enzimrendszer alakítja tovább. A viniléterkötést létrehozó deszaturáz preferált szubsztrátként 1-alkil-2-acil-PE-t használ, így nem meglepő, hogy az ún. plazmalogén (alkenil) lipidek jellemzően PE származékok (PE-P, 5. ábra).



5. ábra: A glicerolipidek metabolizmusa. AGPS, alkilglicerofoszfát-szintáz; BMP, bisz(monoacilgliceril)foszfát; CDP-Cho, citidin-difoszfát-kolin; CDP-DG, citidin-difoszfát-diglicerid; CDP-Etn, citidin-difoszfát-etanolamin; Cer, ceramid; CL, kardiolipin; DG, diglicerid; DHAP, dihidroxiacetonfoszfát; GPD2, glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz-2; G3P, glicerol-3-foszfát; LPA, lizofoszfatidsav; MG, monoglicerid; PA, foszfátidsav; PC, foszfátidilkolin; PE, foszfátidiletanolamin; PE-P, plazmalogén-foszfátidiletanolamin; PG, foszfátidilglicerin; PI, foszfátidilinozitol; PIP_n, foszfátidil-inozitol-n-foszfát; PS, foszfátidilszerin; SM, szfingomielin; TG, triglicerid.

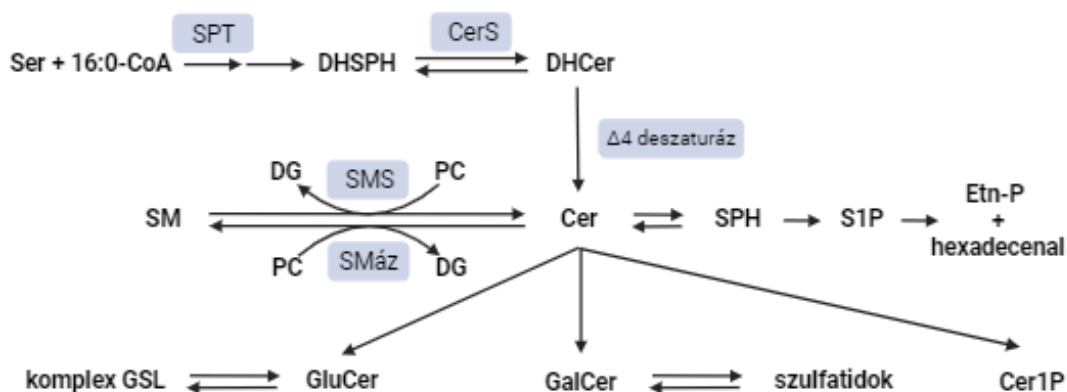
A komplex glicerolipidek katabolizmusa hidrolitikus folyamatok révén számos köztiterméket termel. A zsírsavakat, fejcsoportokat, illetve fejcsoport összetevőket lehasító foszfolipázokat 4 családba soroljuk hasítóhelyük szerint. A foszfolipáz A₁/A₂ (PLA₁/PLA₂) az sn-1/sn-2 észterkötést bontja lizolipidek egyidejű képződésével, amelyek tovább hidrolizálódhatnak, illetve reacileződhetnek. Az egymást követő hidrolitikus és reacilezési reakcióknak fontos szerepük van, mert poszt szintetikus határozzák meg a glicerinvázon a zsírsavak összetételét és pozícióját

(zsírsavátrendeződés, Lands-ciklus). A foszfolipáz C (PLC) a foszfáttartalmú fejcsoportot hasítja, miközben DG keletkezik, a foszfolipáz D (PLD) pedig a fejcsoportot a foszfodiészter-kötés alapvázal ellentétes oldalán hasítva PA-t hoz létre (6. ábra).



6. ábra: A foszfolipázok hasítási helyei. DG, diglicerid; FA, zsírsav; FA-CoA, zsírsav-koenzim A; FFA, szabad zsírsav; GPL, glicerofoszfolipid; LPL, lizofoszfolipid; LPLAT, lizofoszfolipid-aciltranszferáz; PA, foszfatidsav; PLA_{1/2}, foszfolipáz A_{1/2}; PLC, foszfolipáz C; PLD, foszfolipáz D.

A szfingolipid-metabolizmus központi eleme a Cer (7. ábra). *De novo* szintézise során szerin és palmitát reakciójából telített szfinganin bázis (dihidroszfingozin, DHSPH) képződik, amit specifikus Cer-szintetázok (CerS) acileznek. A létrejövő dihidroceramid (DHCer), illetve az annak deszaturációjával keletkező Cer foszforilálódhat (Cer1P), glikozileződhet (Glu/GalCer) vagy foszfokolin fejcsoport kapcsolódhat hozzá (SM). A komplex SL-ek lebontása specifikus hidrolázok segítségével megy végbe. A Cer hidrolízise szfingozint (SPH) termel, ami reacileződhet ("salvage" útvonal) vagy szfingozin-1-foszfáttá (S1P) alakulhat. A SL-metabolizmus megfelelő működésének fontosságát jól illusztrálja az a tény, hogy számos anabolikus és katabolikus lépéshez köthető betegség direkt vagy indirekt módon. Ilyen pl. a Niemann-Pick betegség, egy szfingolipidózis típusú zavar, amikor SM halmozódik fel a lizoszómában.



7. ábra: A szfingolipidek metabolizmusa. Cer, ceramid; CerS, ceramid-szintetáz; CoA, koenzim-A; DG, diglicerid; DHCer, dihidroceramid; DHSPH, dihidroszfingozin; Etn-P, Etn-P,

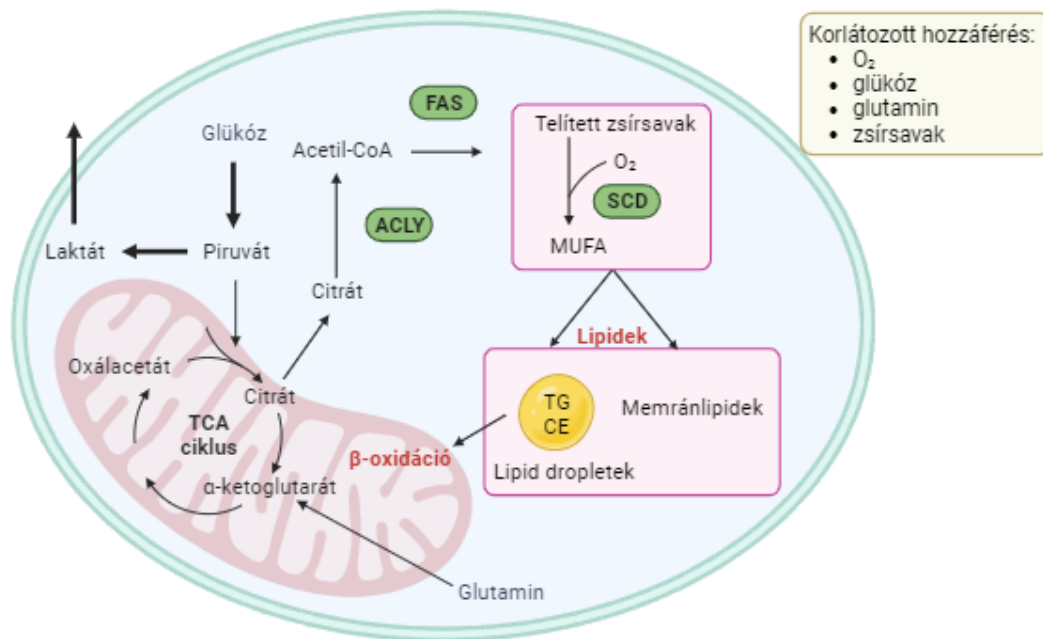
etanolamin-foszfát; GalCer, galaktozilceramid; GluCer, glükozilceramid; GSL, glikoszfinolipid; PC, foszfatidilkolin; Ser, szerin; SM, szfingomielin; SMáz, szfingomielináz; SMS, szfingomielin-szintetáz; SPH, szfingoizin; SPT, szerin-palmitoil-transzferáz; S1P, szfingoizin-1-foszfát.

2.5. A tumorképződés és a lipidmetabolizmus összefüggései

A metabolikus átprogramozódás a malignitás egyik védjegye (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011; Molendijk és mtsai., 2020), amelynek következtében a sejtek szelekciós előnyre tesznek szert a tumorigenezis során. Lassan 100 éves Otto Warburg azon megfigyelése, hogy a rákos sejtekben felgyorsul a glükóz laktáttá történő konverziója oxigén jelenlétében is (Warburg, 1924; Warburg és mtsai., 1927; Warburg & Minami, 1923). A legújabb eredmények szerint azonban – Warburg eredeti feltételezésével szemben – a felgyorsult aerob glikolízis nem elsődleges és univerzális következménye a diszfunkcionális mitokondriális működésnek, hanem a Warburg-effektus a legtöbb tumorban alapvető része egy „önző” metabolikus átprogramozódásnak, ami számos szignálút vonal kölcsönhatásának eredménye (Vaupel & Multhoff, 2021). Ilyen többek között a hipoxia indukált faktor 1 komplex túltermelődése, ami például a glükóztranszporterek expressziójának megemelkedéséhez vezet. A p53 tumorszupresszor gén mutációja gátolja a mitokondriális oxidatív foszforilációt és a glikolízis útvonalat erősíti. Az egyik legfontosabb sejtnövekedést serkentő útvonal, a PI3K-AKT-mTOR (foszfoinozítid-3-kináz–protein kináz B – mammalian target of rapamycin), mutációja következtében ez az útvonal növekedési szignál nélkül is folyamatosan aktív lesz és biztosítja a rákos sejtek proliferációját (Yuan & Cantley, 2008), miközben a tumorszupresszióhoz hozzájáruló LKB1-AMP (liver-kináz-B1-adenozil-monofoszfát) szignálút lehalkul (Shackelford & Shaw, 2009).

A tumor fejlődése során a rákos és a sztrómasejtek képesek úgy átprogramozni a lipidmetabolizmusukat, hogy biztosítsák a sejtek gyors proliferációjához szükséges mennyiségű és minőségű lipidet, ezt pedig *de novo* lipidszintézisük újraaktiválásával érik el (Bian és mtsai., 2020) (8. ábra). A glikolitikus szénáramlás lipid-bioszintézisbe történő átirányításához szükséges két kulcsenzim az ATP-citrát-liáz (ACLY) és a zsírsav-szintetáz (FAS). Az ACLY a citoszolikus citrátot konvertálja acetyl-CoA-vá és oxálacetáttá, így biztosítva esszenciális komponenseket a lipidszintézishez. Az ACLY megnövekedett aktivitása szükséges a sejtnövekedéshez és a tumorigenezishez (Bauer és mtsai., 2005). A FAS katalizálja az acetyl-CoA és a malonil-CoA kondenzációját a hosszú szénláncú telített zsírsavak előállításához; a FAS enzimek overexpressziója nagyon rossz

prognózissal és multihidrorezisztenciával társul (Papaevangelou és mtsai., 2018). Az AKT fehérje aktivációja az *acly* és a *fasn* gének expresszióját is indukálja, a PI3K-AKT-mTOR útvonalon keresztül pedig aktiválódnak a lipidhomeosztázisban kulcsfontosságú szerepet játszó enzimek is, többek között a telített zsírsavszintézis sebességhatározó enzime, a sztearoil-CoA-deszaturáz (SCD1) és a SREBP (sterol regulatory element binding protein) fehérjecsalád tagjai (Eberlé és mtsai., 2004). Az SCD1 túltermelődése elősegíti például vastagbélráksejtekben az epithélialis-mezenchimális tranzíciót, a sejtek migrációját és invázióját (Ran és mtsai., 2018).



8. ábra: Metabolikus átprogramozódás a tumorban. ACLY, ATP-citrát-liáz; FAS, zsírsavszintetáz; MUFA, egyszerűen telítetlen zsírsav; SCD, sztearoil-CoA-deszaturáz; CE, koleszterilészter; TCA, citromsavciklus; TG, triglicerid.

A tumorsejt a membrán-bioszintézishez szükséges zsírsavakat és lipideket az extracelluláris térből is fel tudja venni. A PI3K-AKT-mTOR szignalizációs út aktiválja a sejt zsírsavfelvételt és gátolja a zsírsavoxidációt is (Deberardinis és mtsai., 2006). A megnövekedett zsírsavfelvétel a hajtóereje az áttétképzésnek és a rezisztencia kialakulásának. Ebben kulcsszerepet játszik a CD36 receptorfehérje, ami a hosszú szénláncú zsírsavakat internalizálja és a sejt inváziós képességét fokozza (Pascual és mtsai., 2017). A CD36 expressziója rákos betegekben nagyon rossz prognózissal társul (Feng és mtsai., 2019). A rákos sejtek az újonnan szintetizált és az extracelluláris térből felvett, de még fel nem használt zsírsavakat trigliceridek formájában lipidcseppecskébe

zárva képesek tárolni és szükség esetén felszabadítani a további sejtproliferáció és invázió elősegítésére.

A PI és metabolikus termékei számos szignálútvonatot aktiválnak, többek között a fentebb bemutatott PI3K-AKT-mTOR útvonatot (Engelman és mtsai., 2006). A foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát szintjének emelkedése kontrollálatlan sejtnövekedést és tumorfejlődést eredményez (Yuan & Cantley, 2008). A PE, mint lipidchaperon, szerepet játszik a membránfehérjék megfelelő feltekeredésében. Csökkent mennyisége rosszul vagy egyáltalán fel nem tekeredett fehérjéket eredményez, ami krónikus endoplazmatikus retikulum stresszt indukál, és ezáltal rák kialakulásához vezethet (Patel & Witt, 2017).

A Cer a komplex szfingolipidek szintézisének prekursora, egyszerre rendelkezik szerkezeti és jelátviteli funkciókkal. Általában antiproliferatív hatással bír: gátolja a sejtnövekedést, apoptózist indukál, sejttöredést szabályoz (Mullen & Obeid, 2012). A Cer-bioszintézisben szerepet játszó enzimek expressziójának fokozását ezért tumorterápiás lehetőségként tartják számon (Moro és mtsai., 2019). Ugyanakkor a GSL-ek közé tartozó cerebrozidok megnövekedett koncentrációja nagyobb ellenállóképességet biztosít a tumorsejteknek a kemoterápiával szemben azáltal, hogy indukálja a p53 gén expresszióját (Hosain és mtsai., 2016). Ismert tény az is, hogy bizonyos rákos sejtek jelentős mennyiségű gangliozidot bocsátanak ki a TM-be. A gangliozidok és a gangliozidreceptorok interakciója aktiválja a vaszkuláris-endoteliális növekedési faktor szignalizációs útvonatot, ami angiogenezishez vezet (Chung és mtsai., 2016; Lang és mtsai., 2001). A megemelkedett SM-szint promalignus hatással bírhat, amennyiben csökkent szfingomielináz aktivitással és emiatt csökkent proapoptotikus Cer-szinttel társul, ezáltal támogatva a tumorsejtek túlélését és növekedését (K. Zheng és mtsai., 2019).

A szfingolipid-hálózat foszforilált és nem-foszforilált közttermékei teljesen ellentétes biológiai szerepeket töltenek be, pl. a Cer és az SPH apoptózist és sejtciklusleállást indukál, míg a Cer1P vagy az S1P a túlélésben és növekedésben vesz részt (Espanillat és mtsai., 2015; Guo és mtsai., 2015; W. Zheng és mtsai., 2006).

A rákos folyamatokban kiemelkedően fontos szerepet játszanak a membránlipidek metabolizmusával képződő jelátviteli lipidek is. A rákos sejtek szekretálják ezeket a bioaktív lipideket, amelyek autokrin vagy parakrin módon számos szignálútvonatot indukálnak a tumorigenezis elősegítésére (Hisano & Hla, 2019). A foszfolipázok által termelt arachidonsav (AA) például a ciklooxygenáz vagy a lipoxigenáz

útvonalon olyan mediátorokká (prostaglandinok, leukotriének) alakulhat, amelyek aztán többségében tumorpromótáló hatásúak, illetve szintén a tumorfejlődést elősegítő krónikus gyulladásos állapotot tarthatnak fenn (Chiurchiù és mtsai., 2018; Fishbein és mtsai., 2021).

Többféle ráktípusnál megfigyelték, hogy megváltozik a sejtek PC-metabolizmusa PLC és/vagy PLD megemelkedett aktivitása következtében (Wolf és mtsai., 2023); mind az előbbi hatására keletkező DG, mind az utóbbi által termelt PA másodlagos hírvivőként a tumorképződéshez, fejlődéshez és invázióhoz szükséges szignálútvonalakat indukál (Cooke & Kazanietz, 2022; Gomez-Larrauri és mtsai., 2023).

Az egyik nagy figyelmet kiváltó lipidmediátor az LPA, amely főként LPC-ből képződik az autotaxin (ATX) nevű PLD típusú enzim által. Hat darab G-fehérje-kapcsolt receptora ismert, és a rákos transzformációtól kezdve a proliferációs, inváziós és metasztatikus lépéseken át a genotoxikus vagy metasztatikus stressz kivédéséig szinte minden tumorigenikus folyamatban részt vesz (G. Tigyi és mtsai., 2021; G. J. Tigyi és mtsai., 2019).

A rákos sejtek nemcsak a saját, de a sztrómasejtek metabolizmusát is képesek átprogramozni például olyan citokinek felszabadításával, amelyek a sztrómális adipocitákat arra készítetik, hogy zsírsavakat szekretáljanak (ld. fentebb), és így energiaforrásként szolgáljanak a gyors tumornövekedéshez (Corn és mtsai., 2020). A tumorasszociált fibroblasztok LPC-t bocsátanak ki, ami az ATX/LPA útvonalon keresztül segíti a proliferációt és migrációt (Aiello & Casiraghi, 2021; Auciello és mtsai., 2019).

Évtizedekkel ezelőtt megfigyelték azt is, hogy a rákos sejtek membránjai nagyobb mértékben tartalmazznak éterlipideket, mint a normál, egészséges sejtek (Albert & Anderson, 1977; Howard és mtsai., 1972; Snyder & Wood, 1969). Azóta számos publikáció született ezzel kapcsolatban (Benjamin és mtsai., 2013; Roos & Choppin, 1984; Stazi és mtsai., 2019; Zhu és mtsai., 2014), azonban a háttérben meghúzódó pontos mechanizmus, e speciális lipidspecieszek jelentősége még mindig nem tisztázott.

A fentiekből láthatjuk, hogy az onkogén jelutak aktiválása elősegíti a lipidanyagcseréhez szükséges gének fokozott expresszióját, a lipidanyagcsere intermedierek pedig onkogén szignálútvonalakat indíthatnak be. Ebben a komplex szabályozásban a TM-ből származó jelek is aktívan részt vesznek, és ez a metabolikus flexibilitás teszi lehetővé, hogy a tumor a fejlődése során adekvát és adaptív módon reagáljon a környezetére.

2.6. A membránok szerepe a tumorképződésben

Az átprogramozott metabolizmus következtében a rákos sejtek membránlipid-összetétele merőben eltér az egészséges szöveti sejtektől, sőt még a malignus transzformáció egyes stádiumaiban is különbözik a sejtek lipidomja (Bernardes & Fialho, 2018; Casares és mtsai., 2019). Bizonyos metasztatizáló sejtek például csökkentik a sejtmembránjukban lévő koleszterin mennyiségét, hogy az így kialakuló fluidabb, plasztikusabb sejtmembrán elősegítse a sejtek véredényekbe való penetrációját (Zalba & ten Hagen, 2017). Az SM képes intermolekuláris hidrogénhidak létrehozására, ahol például a GPL-ek akceptorként szerepelnek, szemben az SM-mel, amely donorként funkcionál. A plazmamembrán külső rétegében az SM nagymértékű növekedése csökkenti a membránfluiditást és permeabilitást, növeli a membrán fizikai ellenállóképességét, csökkenti a kontaktgátlást és a sejt-sejt kommunikációt, hozzájárulva a rákos sejtek TM-hez való fokozott alkalmazkodóképességéhez (Nicolson, 1982; Tallima és mtsai., 2021) és kemoterápiával szembeni rezisztenciájához (Slotte & Ramstedt, 2007).

Fontos megjegyezni azt is, hogy a koleszterin és a SL-ek szorosan „összecsomagolt” membrán-mikrodoméneket (tutajokat) alkotnak, amelyek kulcsfontosságúak számos fiziológiai, ill. patofiziológiai folyamatban (PIKE, 2004). A tutajok fontos szerepet játszanak a receptorok lokalizációjában, és magában a jelképzésben, jeltovábbításban. Ezek a mikrodomének fehérjeplatformokat képesek egybegyűjteni, és a fehérjék szelektálásával és egymás közelébe rendezésével párhuzamosan új lipidkörnyezetet alakítanak ki. A specifikus receptorok monomerjei egymás közelében itt kapnak lehetőséget az oligomerizációra és a szupramolekuláris csoportosulásra, és ezáltal a felerősített jelképzésre. A malignus állapotokban a lipidtutajok által közvetített jelerősítés az onkogenikus és prometasztikus folyamatokat is érinti. Az angiogenezis, az epiteliális-mezenchimális átmenet, a migráció, az extravazáció és a sejtadhézió szabályozásában ezek a szignálplatformok kiemelkedő szerepet játszanak (Greenlee és mtsai., 2021; Mollinedo & Gajate, 2015; Roy & Patra, 2023; Vona és mtsai., 2021).

2.7. A membránok, a stresszválasz és a tumorképződés összefüggései

A membránok igen érzékenyen reagálnak a környezeti változásokra, így alkalmasak arra, hogy részt vegyenek a környezeti változások érzékelésében. A hő sokkválasz, ill. általánosabban a sejt szintű stresszválasz evolúciósan konzervált

mechanizmus. Környezeti és fiziológiás stresszorok, mint például a hő, oxidatív stressz, nehézfémek, toxinok, bakteriális fertőzések indukálják, és ez a rendszer biztosítja a sejt életét veszélyeztető hatások elleni védelmet (Åkerfelt és mtsai., 2010). Mára általánosan elfogadottá vált a kutatócsoportunk által elsőként megfogalmazott membránszenzor-hipotézis (Bromberg & Weiss, 2016; Vigh és mtsai., 1998), amely szerint a membránok és a stresszválasz között szoros kapcsolat áll fenn (Balogh és mtsai., 2013; Török és mtsai., 2014; Vigh, Nakamoto, és mtsai., 2007; Vigh és mtsai., 2005; Vigh és mtsai., 2007). A membránok képesek érzékelni a környezeti változásokat, és a fázisállapotukban és mikrodomén-szerkezetükben bekövetkező változások révén továbbítani tudják azokat a jeleket, amelyek a stresszfehérje gének transzkripcióját aktiválják (Balogh és mtsai., 2005, 2013; Balogi és mtsai., 2019; Crul és mtsai., 2013; Csoboz és mtsai., 2018; Horváth és mtsai., 2008; Nagy és mtsai., 2007; Török és mtsai., 2014; Vigh, Horváth, és mtsai., 2007; Vigh és mtsai., 1998; Vigh és mtsai., 2007). Patológias körülmények között, mint például rákos megbetegedéseknél, megváltozik a membrán összetétele, fizikai állapota, ami a hő sokkfehérjék emelkedett expressziójához vezethet (Bromberg & Weiss, 2016; Vigh és mtsai., 1998).

A membránok fizikai állapota és a stresszválaszadó képesség összefüggését elsőként K562 krónikus mieloid leukémia emlős sejteken bizonyították csoportunkban (Balogh és mtsai., 2005), illetve később B16 egérmelanóma sejteken (Nagy és mtsai., 2007). Mikroszkópos képalkotó technikák segítségével a mikrodomének valós idejű követése révén, illetve lipidomikai módszerek felhasználásával további bizonyítékokat szereztünk arról, hogy bizonyos lipidek hogyan vesznek részt a komplex, membránfüggő stresszválasz jelképzésében (Balogh és mtsai., 2010, 2011; Brameshuber és mtsai., 2010; Gombos és mtsai., 2011; Gungor és mtsai., 2014; Peksel és mtsai., 2017). Ezen ismereteknek köszönhetően az elmúlt évtizedekben előtérbe került a membránlipideket célzó terápiák fejlesztése (Escribá és mtsai., 2015), sőt számos membránlipid-terápiás hatóanyag tesztelése már klinikai fázisban van (Dadhich & Kapoor, 2022; Fei és mtsai., 2023; Lopez és mtsai., 2023). Csoportunk is aktív résztvevő a diabétesz és a neurodegeneratív betegségek membrántámadáspontú, stresszfehérje alapú (Crul és mtsai., 2013; Kasza és mtsai., 2016; Török és mtsai., 2003; Vigh és mtsai., 1997), valamint a rák membránlipid-terápiás lehetőségeinek kutatásában (Antal és mtsai., 2015; Mishra és mtsai., 2022).

2.8. A lipidomikai munkafolyamat

A kvantitatív bioanalitikai módszerek fejlesztése elengedhetetlen a lipidmetabolikus folyamatok értelmezéséhez. A lipidek analitikája nagy kihívást jelent, mert szerkezeti sokféleségük mellett a teljes polaritási skálát lefedik a szénhidrogénekben oldódó trigliceridektől a vízzoldékony gangliozidokig, koncentrációjukat tekintve pedig 5–6 nagyságrendnyi különbség is lehet az egyes lipidspecíeszek között.

A modern lipidanalitikai módszerek között kiemelt helyet foglalnak el a tömegspektrometria (MS) alapú technikák, amelyek képesek megfelelni a fenti kihívásoknak. Az MS alapú lipidomikai munkafolyamat egy soklépéses eljárás, ami magába foglalja a megfelelő minta(elő)készítést, a helyes mintatárolást (és szállítást), szükség esetén a minta feltárását/homogenizálását, a lipidentrakciót, az MS analízist, a tömegspektrumok kiértékelését, valamint az adatok statisztikai elemzését és értelmezését.

2.8.1. Lipidentrakció

A hagyományos lipidentrakció során kétfázisú, folyadék-folyadék extrakciót végzünk a lipidek szelektív kinyerésére. A legelterjedtebb lipidentrakciós eljárások (Bligh&Dyer-extrakció, Folch-extrakció (Bligh & Dyer, 1959; Folch és mtsai., 1957)) többkomponensű oldószerkelegyet alkalmaznak, ahol az alkoholos összetevő (metanol, izopropanol) biztosítja a lipidek és fehérjék közötti kölcsönhatások felbontását, az apoláris szerves komponens (kloroform, éter) szelektíven kiextrahálja a lipideket a metabolom polárisabb komponensei (pl. cukrok, szerves savak, aminosavak) mellől, míg a víz vagy vizes sóoldat a fázisszeparáció indukálásával biztosítja a vízzoldékony vegyületek (poláris metabolitok, sók) eltávolítását a vizes fázisba. A kétfázisú extrakciók igen tiszta lipidentraktumot eredményeznek és a lipidom nagy részét – legalábbis mennyiségi értelemben – valóban kvantitatívan kiextrahálják. Ugyanakkor időigényesek lehetnek, és a polárisabb, többnyire kis mennyiségben jelenlévő lipideket (pl. lizolipidek, foszfátartalmú jelátviteli lipidek, gangliozidok) részben vagy teljesen elveszítjük a fázisszeparációkor. Ennek kiküszöbölését és egyben az extrakciós folyamat lényeges felgyorsítását teszik lehetővé az egyfázisú extrakciók, mint például a kutatócsoportunkban validált metanolos extrakció (Péter és mtsai., 2017).

2.8.2. Tömegspektrometria

A lipidomikai munkafolyamat lelke a tömegspektrometriai analízis. Napjainkban az atmoszférikus nyomáson történő ionizációs technikák dominálnak, ezek közül is

messze a leggyakrabban használt módszer az elektropray ionizációval kapcsolt MS (ESI-MS), ami érzékenységeivel, kis mintaigényével, folyadékfázisú elválasztási technikákkal való könnyű kapcsolhatóságával és a lipidom széles lefedettségével tűnik ki (Holčapek és mtsai., 2018).

2.8.2.1. Mintabeviteli stratégiák

A mintabeviteli stratégiák három nagy csoportját a direkt injekciós, ún. shotgun megközelítések, a folyadékkromatográfiával kapcsolt technikák (LC-MS) és a deszorpciós ionizációs módszerek alkotják; utóbbiakat gyakran használják MS alapú képalkotáshoz (ld. 2.9.1.).

A shotgun lipidomikában a lipidextraktumot közvetlenül juttatjuk be a tömegspektrométerbe. A módszer fő hátránya a kromatográfiás elválasztás hiányából ered, mert a „mindent egyszerre” mintabeviteli stratégia egyrészt jelentős ionszuppressziót eredményezhet, másrészt nem teszi lehetővé a különböző izomer és/vagy izobár specieszek felbontását. A direkt infúzió ugyanakkor a módszer fontos előnye is, ugyanis a tömegspektrumokat az infúziós oldat állandó koncentrációja mellett gyűjtjük tulajdonképpen időkorlát nélkül, ezáltal sokféle MS vizsgálat (fragmentációs analízisek, kiválasztott ionmonitorozás, stb.) elvégzésére van lehetőségünk (Hu és mtsai., 2020). A shotgun mintabevitel könnyen kapcsolható ionmobilitás feltétellel, ami az ionizált analitmolekulák gázfázisú elválasztásával jelentősen javíthatja a spektrumtisztaságot, növelve ezzel az érzékenységet és a lipid-specieszek azonosításának megbízhatóságát.

A shotgun MS mellett az LC-MS a leggyakrabban alkalmazott lipidanalitikai módszer. Fő előnye az elválasztási módok relatíve széles skálája, ami szinte bármilyen típusú lipid-elválasztási feladatra rá szabható. A fordított fázisú LC messze a legelterjedtebb, mert képes a lipid-specieszeket lánchosszuk és telítetlenségük alapján elválasztani; éppen emiatt azonban a kvantitálás problémába ütközhet, mert az alkalmazott standard és a meghatározandó analit ionizációja eltérhet a szeparáció következtében. A hidrofíl kölcsönhatású LC ezzel szemben poláris fejcsoporthoz szerinti elválasztást biztosít, ezért a poláris glicero- és szfingolipidek kvantitálásának preferált módja, míg a normál fázisú LC a nempoláris lipidosztályok szeparációs módszere.

2.8.2.2. Tömeganalizátorok

Az MS alapú lipidomika utóbbi két évtizedben dokumentálható térhódításának kulcsa kétségtelenül a modern, nagy felbontású analizátorok megjelenése volt. Az

Orbitrap és Fourier-transzformációs ionciklotron rezonancia készülékek nagy felbontást ($R_s > 150\,000$), nagy tömegmérési pontosságot (< 2 ppm), nagy érzékenységet és széles dinamikus tartományt biztosítanak. Ezek a tulajdonságok – itt nem részletezett okok miatt – kritikusak a lipidspeciek azonosítása terén. Ezen jellemzőknek köszönhetően az azonosítás már az MS1 szkennelés alapján is lehetővé válik az összegképlet formula szintjén (ld. 2.8.4.), MS/MS, illetve MS_n fragmentációs kísérletekkel pedig a zsírsavlábak összetételét is feloldhatjuk. Az ilyen típusú analizátorok ezért kitűnően alkalmazhatóak a shotgun megközelítéssel kombinálva. Alacsonyabb felbontású analizátorok esetében (quadrupól, ioncsapda, repülési idő) alapvető fontosságúak a különböző típusú fragmentációs analíziseken alapuló lipidspecie azonosítási technikák, illetve előnyt élveznek a kromatográfiás elválasztással kapcsolt módszerek.

2.8.2.3. Kvantitálás

A kvantitatív lipidomikai analízis kulcsfeltétele a megfelelő extrakciós és/vagy belső standardok kiválasztása; minimálisan legalább egy standard/lipidosztály alkalmazása javasolt. Belső standardként használhatunk az adott mintában nem fellelhető, tehát nem-endogén lipidspecieket (emlős minta esetében pl. rövid vagy páratlan szénláncú specieket). Az utóbbi években több, egy bizonyos lipidmátrixra optimalizált, deuterált analógokat tartalmazó lipidmix került kereskedelmi forgalomba (pl. plazma SPLASH mix, Avanti Polar Lipids), és további komoly erőfeszítések történnek az egységes standardizálás előmozdítására a teljes munkafolyamatra kiterjedően (pl. nemzetközi lipidomikai társaság (ILS) létrehozása, nevezéktan egységesítése, kiértékelő szoftverek kritikai áttekintése (Köfeler és mtsai., 2021; Ni és mtsai., 2023)).

A shotgun lipidomika egyszerű és egyértelmű módot kínál a lipidek kvantitálására, mivel a standard és az analizálandó molekulák ugyanabban a mátrixban vannak jelen, így azok ko-ionizációja a teljes mérés alatt biztosított. A minél pontosabb eredmények eléréséhez azonban figyelembe kell venni, hogy a lipidspeciek detektorválasza számos faktortól függhet, ilyenek pl. az infúziós oldat lipidkoncentrációja, az oldószer, az alkalmazott additívok, valamint bizonyos mértékben a zsírsavláncok hossza és kettőskötés-száma.

2.8.3. Adatfeldolgozás

A lipidomikai munkafolyamat kritikus lépése az adatfeldolgozás, ami magában foglalja a lipidek azonosítását, az izotópkorrektúrák számítását, a jelek integrálását,

valamint a relatív és abszolút kvantitálást. Ma már dedikált szoftverek léteznek ezen feladatok automatizált elvégzésére a shotgun (pl. LipidXplorer, ALEX) és LC-MS (pl. LIMS, LipidSearch) módszerekhez egyaránt, sőt a műszergyártó cégek is kínálnak komplett lipidomikai alkalmazásokat. Utóbbiak azonban nem ellenőrizhető módon, „feketedobozként” működnek, és sokszor eredményeznek tévesen, illetve pontatlanul asszignált specieszeket. Ennek elkerülésére sokan, így csoportunkban is, háziilag fejlesztett szoftverekkel egészítjük ki a nyers intenzitásadatok további feldolgozását.

2.8.4. A lipidek nevezéktana

2005-ben a LIPID MAPS konzorcium kidolgozott egy átfogó osztályozási rendszert a lipidekre, amely azokat 8 fő kategóriába sorolja, és a kémiaiilag pontosan definiált egyedi lipidspecieszeket adatbázisban rögzíti (Fahy és mtsai., 2005). A lipidomikai módszerek azonban sokszor nem képesek az izomer szerkezetek felbontására, illetve egyetlen molekulaspeciesz minden részletre kiterjedő meghatározására. 2013-ban ezért javaslat született egy egyszerűsített nevezéktanra, amelynek kulcsjellemezője, hogy kizárólag a kísérletesen egyértelműen bizonyított szerkezeti elemeket annotálja egy hierarchikus rendszer szerint (Liebisch és mtsai., 2013). Ezzel összhangban a dolgozatban az alábbi nevezéktani szabályokat követjük:

(A) Amennyiben a lipidmolekula „összegképletét” lehet csak meghatározni, az elnevezésében – glicerinvázis lipidek esetében – a lipidosztály kétfetűs rövidítését zárójelben követi a zsírsavlábak összesített szénatomszáma, majd kettősponttal elválasztva a kettős kötések összesített száma, pl. PC(36:4).

(B) Ha annotálni lehet a zsírsavlábakat, de azok pozíciója nem ismert, akkor alulvonás „_”, míg ismert sn-1/sn-2/(sn-3) pozíció esetén perjel „/” az alkalmazandó elválasztó, pl. PC(16:0_20:4) vagy PC(16:0/20:4).

(C) Az O-alkil kötést „O” (PC-O), míg az O-alkenil kötést „P” jelöli (pl. PE-P).

(D) A lizolipideket „L” előtag jelzi, pl. a lizofoszfatidilkolin jelölése: LPC.

(E) Szfingolipidek esetében szintén használatos az „összegképlet” formula, ami az összesített szénlánc-hosszon és kettőskötés-számon kívül kiegészül a hidroxilcsoportok összesített számával, pl. SM(34:1:2). Ha annotálni lehet a szfingoid bázis és az *N*-acillánc típusát, akkor az ebben a sorrendben történik meg, pl. SM(d18:1/16:0), ahol a betűjelzés a bázis OH-csoportjainak számára utal (pl. d = dihidroxil, t = trihidroxil).

2.9. A térbeli felbontás növelése

2.9.1. Tömegspektrometriai képalkotó technikák (MSI)

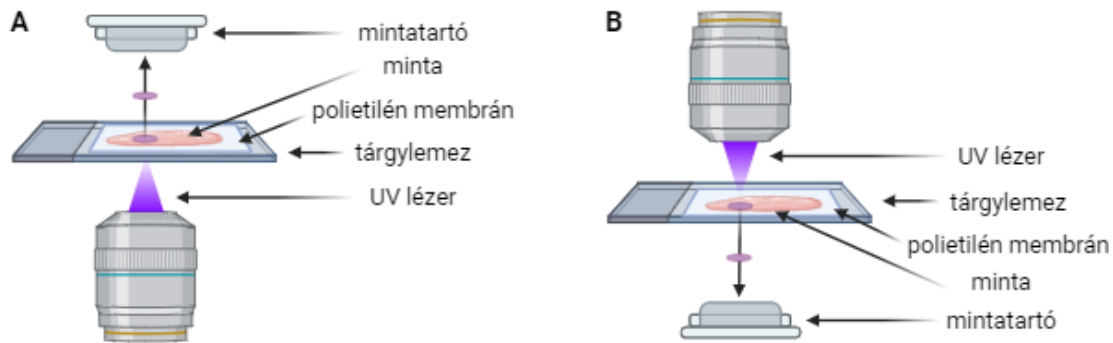
A tumorheterogenitás vizsgálatát, a tumor-TM interakció és a (lipid)metabolikus változások feltérképezését új szintre emelték a térbeli felbontás növelését célzó módszertani fejlesztések, elsősorban a tömegspektrometriai képalkotó technikák (MS imaging, MSI). Az MSI szöveti metszetek közvetlen, jelölésmentes, komplex felületi analízisét teszi lehetővé, így információt kaphatunk a lipidek, fehérjék, poláris metabolitok, illetve kezelőszerek szöveten belüli térbeli eloszlásáról és abundanciájáról. A legelterjedtebb MSI technikák a MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization – mátrix-asszisztált lézerdeszorpciós ionizáció) és a DESI (desorption electrospray ionization – deszorpciós elektropray ionizáció)-MSI (Swales és mtsai., 2016).

A MALDI-MSI több száz, sőt akár több ezer molekula egyidejű detektálására képes. Az analízishez a szöveti metszetet egy speciális MALDI mátrixszal vonják be. Ezután UV lézerrel sugározzák be a mintát, amit a mátrix abszorbeál, ionizálódik, majd ionizálja az analitot (Greco és mtsai., 2021). A szövet minden képkockájához tartozik egy tömegspektrum, amely az adott terület analiteloszlásáról szolgáltat kvalitatív információt. A módszer alkalmas peptidek, fehérjék és lipidek kimutatására viszonylag gyorsan és megbízható módon. Korábban az alacsony térbeli felbontású (100 μm) technikák közé sorolták (Nilsson és mtsai., 2015), mára azonban már egysejt szintű vagy szubcelluláris térbeli felbontást is el lehet vele érni (Kompauer és mtsai., 2017). Hátránya, hogy gyakran hosszadalmas mátrixoptimalizálást igényel, az ionizációhoz vákuumra, a megfelelő detekcióhoz pedig sokszor kémiai derivatizációra van szükség. A mátrixhatás és az extrakciós hatékonyság pixelenkénti variabilitása komoly akadályt jelenthet a kvantitatív mérések biztosítása tekintetében.

A DESI-MSI előnye, hogy atmoszférikus nyomáson, friss vagy fagyasztott mintákból, további mintelőkészítés nélkül, több száz kismolekula jelölésmentes, egyidejű azonosítását teszi lehetővé a szöveti felületről. A lágy ionizáció során a szövetminta felszínét elektromos töltésű oldószerrel porlasztják, majd a felszabaduló ionokat a tömegspektrométerbe vezetik (Takáts és mtsai., 2005). A módszer jó térbeli felbontást (kb. 50 μm) biztosít, hátránya azonban, hogy az extrakciós hatékonyság eltérő lehet a különböző analitokra, ami a kvantitatív gyengíti.

2.9.2. Lézer-mikrodisszekcióval (LMD) kapcsolt technikák

A térbeli felbontás növelésének alternatív módját képviselik a lézer-mikrodisszekciós (LMD) módszerek, amikor a mikroszkóp alatt láthatóvá tett, érdeklődésre számot tartó szöveti sejteket lézer segítségével vágjuk ki további vizsgálatokhoz. A lézer és a mikroszkóp elhelyezkedése szerint megkülönböztetünk 1) katapultáló és 2) gravitációs transzportot (**9. ábra**).



9. ábra: A lézer-mikrodisszekció elrendezési lehetőségei

Mindkét esetben egy speciális, polietilén membránnal fedett tárgylemezre helyezük a vékony (tipikusan 5–20 μm vastagságú), fagyasztott vagy fixált szöveti metszetet. Az első elrendezésben (**9A ábra**) a mintát egy inverz mikroszkóp motorizált mintatartójára helyezzük úgy, hogy a szöveti minta felfelé nézzen. A mintatartó (általában Eppendorf- vagy PCR-cső kupakja) a tárgylemez és a kondenzor között helyezkedik el. Az objektíven keresztül egy immobilis, fókuszált, pulzáló UV lézer segítségével az üveglemezen áthatolva kivágjuk a kívánt szövetdarabot a membránnal együtt. A precíz disszekcióhoz a szöveti metszet megfelelő mozgását a motorizált tárgyasztal biztosítja. A lézeres kivágást követően a minta közepére egy jóval erősebb, fókuszált lézerimpulzust irányítunk, amelynek hatására a kívánt mintadarab katapultál a száraz, adhezív vagy gyakrabban valamilyen oldószerrel megtöltött mintatartó kupakba. A másik elrendezésnél (**9B ábra**) egy hagyományos álló mikroszkóp áll rendelkezésünkre, és a membránnal fedett tárgylemezt a mintával lefelé helyezzük a tárgyasztalra. A minta legyűjtéséhez használt mintatartót a minta és a kondenzor közé rakjuk. Ennél a rendszernél a minta immobilis, és az objektívlencséken keresztül egy fókuszált, pulzáló UV lézernyaláb mozgásával tudjuk a szöveti metszetet és a membránt átvágni. A vágás befejeztével a gravitációs erőnek köszönhetően a minta leesik a száraz vagy szolvenssel teli mintatartóba (Podgorny & Lazarev, 2017).

Az LMD technikák előnye a gyorsaság, a pontosság, a sokoldalúság és a nagy térbeli felbontás. A legkisebb kivágható szöveti egység nagyságát tulajdonképpen a lézernyaláb mérete határozza meg (kb. 1 μm), és viszonylag rövid idő alatt akár több száz sejt legyűjtésére is lehetőség nyílik. Az LMD technológia nem roncsolja a szövetet, megőrzi annak morfológiáját. Nem károsítja a sejtalkotókat sem, így DNS, RNS, fehérje és lipidmolekulák elemzésére is alkalmas. Az LMD-vel kapcsolt RNS szekvenálási (Amini és mtsai., 2017; Brasko és mtsai., 2018; Løvendorf és mtsai., 2015; Martinek és mtsai., 2022) és proteomikai (Coscia és mtsai., 2020; Dilillo és mtsai., 2017; Mollee és mtsai., 2016; Mund és mtsai., 2022) publikációk a sejtspecifikus folyamatok jobb megértéséről és a térbeli szerveződés elemzéséről tanúskodnak.

A lipidomikában a nagy lefedettségű analízis térbeli információkkal való kombinálása különösen nehéz feladat, főleg, ha a rendelkezésünkre álló biológiai minta csekély mennyiségű vagy az analizálandó lipidek kis abundanciával fordulnak elő (Odenkirk és mtsai., 2022). Az irodalomban fellelhető néhány példa közül az egyikben Knittelfelder és munkatársai egy egérmájmetasztázis különböző hisztológiai zónáinak lézeres kivágását követően végeztek lipidomikai analízist, és sikeresen kvantitáltak több, mint 100 lipidspeciest. Az általuk alkalmazott módszer térbeli felbontása azonban csupán 0,3–0,5 mm^2 volt (Knittelfelder és mtsai., 2018). Egy másik esetben ecetmuslica sejttestekben és szinapszisokban gazdag agyi régióinak lipidösszetételét vizsgálták LMD, fluoreszcens mikroszkópia és többlépcsős LC-MS kombinálásával; ebben az esetben 50 sejtnyi mintamennyiséget tudtak egyszerre vizsgálni (Hebbar és mtsai., 2014).

3. CÉLKITŰZÉS

Doktori munkámban az alábbi célokat tűztem ki:

i. Lipidomikai módszerfejlesztés

- egy új, nagy térbeli felbontást biztosító, lézerdisszekcióval kapcsolt, kvantitatív shotgun lipidomikai platform fejlesztése és validálása szöveti és sejtes mintákon.

ii. A lipidomikai platform alkalmazása in vitro tumormodelleken

- szferoidmodell platform-kompatibilis kidolgozása
- lipidmetabolikus változások feltárása a 3D modellben.

iii. A lipidomikai platform alkalmazása in vivo egértumormodelleken

- lipidmetabolikus változások feltárása egér allograftokban – különböző primer tumorok, továbbá az inter- és intrametasztatikus, valamint az intratumorális heterogenitás vizsgálata.

iv. A lipidomikai platform multiomikai kiterjesztése

- a lipidmetabolikus változásokkal párhuzamos proteomikai és transzkriptomikai mintázatváltozások feltárása párhuzamos metszetekből
- az omikai adatok komplex bioinformatikai elemzése
- *in vitro* és *in vivo* tumormodellek összehasonlítása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Mintatípusok

4.1.1. Sejtkultúrák

A módszerfejlesztéshez és validáláshoz HeLa-Kyoto humán adenokarcinóma sejtvonalat, míg az *in vitro* 2D és 3D, valamint az egér allograft tumormodellek előállításához tripla-negatív 4T1 egéremlőtumor-sejtvonalat használtunk.

4.1.1.1. HeLa-Kyoto 2D sejtkultúra

A HeLa-Kyoto humán adenokarcinóma sejtvonalat (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Németország), amely stabilan expresszál két fluoreszcens fehérjét, egy hiszton H2B-kapcsolt mCherry, valamint egy tubulin-kapcsolt GFP fehérjét, 37 °C-on növesztettük 5% CO₂ szint mellett, DMEM médiumban (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A médium 4,5 mg/mL glükózt, 10% magzati marhaszérumot (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 mM glutamint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,5 mg/mL geneticint (G418, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 0,5 µg/mL puromicint (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmazott. Az LMD-hez a sejteket egy speciális fémkeretes polietilén-tereftalát (PET) membránra (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) osztottuk ki 50 000 sejt/cm² koncentrációban. A membránt előzetesen 70%-os etanollal, desztillált vízzel és foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk, végül 30 percig UV fénnel kezeltük. A lézerdisszekciót a sejtek 24 órás inkubációját (37 °C, 5% CO₂) követően végeztük el, amikor elérték a 80%-os konfluenciát.

4.1.1.2. 4T1 2D sejtkultúra

A tripla-negatív, tumorigén, nagyon agresszív 4T1 egéremlő-tumorsejteket (American Type Culture Collection, ATCC, Chicago, IL, USA) 37 °C-on, 5%-os CO₂ szint mellett, RPMI-1640 tápoldatban (Roswell Park Memorial Institute-1640, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tenyésztettük, amelyet 10% FBS-sel és 2 mM glutaminnal egészítettünk ki. Két passzázst követően a sejteket zsírsavdeprivált tápoldatba helyeztük. A zsírsavdeprivált tápoldat készítéséhez lipidmentes, növekedési faktorokat tartalmazó, kémiaiailag definiált Optimem médiumot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk különböző mennyiségű (1%, 2,5%, 5%) FBS-sel kiegészítve. A sejteket egy hetes növesztési/passzálási periódust követően 60 mm-es Petri-csészébe osztottuk ki

400 000 sejt/csésze sejtszámmal. További 1 nap elteltével PBS-sel történő mosást követően tripszinnel emésztettük, szuszpendáltuk, majd 1,5 mL-es Eppendorf-csőbe mértük őket. Sejtszámolás után a sejteket további háromszor mostuk PBS-sel, és centrifugálás után a pelletet -80°C -on tároltuk a lipidextrakcióig (4.6.1. pont).

4.1.1.3. 4T1 szferoidok

A 4T1 sejteket felolvasztást követően 10% FBS-sel és 2 mM glutaminnal kiegészített RPMI-1640 tápoldatban vettük fel. A harmadik passzálást követően lecentrifugáltuk, majd újra felvettük őket a szérum és a glutamin mellett 1% antibiotikumot (penicillin, sztreptomycin, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) is tartalmazó RPMI-1640-ben. A sejtszuspenzióból 200 μL -es térfogatokat mértünk ki 96 lyukú sejttaszító felületű, „U”-aljú sejtenyésztő lemezbe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria) 2500 vagy 5000 sejt/lyuk kiosztási sejtszámmal. Ezután a mikrolemezt 5 percig 300 rcf sebességgel centrifugáltuk, majd 37°C -os inkubátorba helyeztük. A szferoidokat 7–14 napig növesztettük, amely idő alatt nem kaptak friss tápoldatot. Az inkubációs idő leteltével az egyedi szferoidokat külön fagyasztóedényben OCT-be (Optimal cutting temperature) ágyazva szárazjégen fagyasztottuk és felhasználásig -80°C -on tároltuk.

4.1.2. Egérszövetminták

A módszerfejlesztési vizsgálatokban használt C57BL/6 vad típusú egereket a 2010/63/EU irányelvben meghatározott előírásoknak megfelelően kezeltük, a kísérleteket az Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Főosztály (Csongrád megye, Magyarország; projekt engedély: XVI/766/2018) engedélyezte. Cervikális diszlokációt követően eltávolítottuk az egér máját, veséjét és agyát. A szerveket PBS pufferben ($\text{pH} = 7,4$) mostuk, majd szárazjégen, fagyasztó téglékben, OCT-be ágyazva lefagyasztottuk és további felhasználásig -80°C -os hűtőben tároltuk őket.

4.1.3. Egértumormodell

Az allograft modellek előállításához 8 hetes Balb/c nőstény egereket használtunk. Az állatokat, valamint a kísérletek megfelelő elvégzéséhez szükséges körülményeket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont állatháza biztosította. Kísérleteink során az állatokat állandó, kontrollált körülmények között (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 21°C tartási hőmérséklet, igény szerint hozzáférhető ivóvíz és rágcsálótáp) tartottuk. Az állatkísérletek elvégzéséhez szükséges engedélyünk száma: XVI/39/2018.

Az egerek oltásához 4T1 sejteket használtunk, amelyeket 10% FBS-sel és 2 mM glutaminnal kiegészített RPMI-1640 tápoldatban vettünk fel. Három passzálást követően a 80%-os konfluenciát mutató letapadt sejteket tripszinnel emésztettük, 1 millió sejt/mL koncentrációjú szuszpenziót készítettünk belőlük, amit még 2x mostunk és oltás előtt PBS-ben vettünk fel. Ebből a szuszpenzióból 100 μ L-t (azaz 100 000 sejtet) oltottunk az állatokba szubkután, intravénásan vagy lépbe. 22 nap elteltével cervikális diszlokációt végeztünk, a tumort és a tumoros szerveket PBS-ben mostuk, meghatározott orientációval OCT-be ágyazva szárazjégen fagyasztottuk és felhasználásig -80°C -on tároltuk őket.

4.2. Metszetkészítés

A metszéshez Leica CM1860 UV kriosztátot használtunk (Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA), amelynek penge- és kamrahőmérsékletét -18°C -ra állítottuk. A fagyasztott, OCT-be ágyazott szferoidot vagy szövetet 20 perccel a metszés megkezdése előtt behelyeztük a kriosztátba a hőmérséklet-kiegyenlítődés érdekében. Ezt követően 10 μm vastag párhuzamos metszeteket készítettünk, amelyeket a további vizsgálatoktól függően tárgylemezre vagy membránnal bevont tárgylemezre helyeztünk.

4.3. Hematoxilin–eozin (HE)-festés

A hisztológiai elemzéshez a metszeteket tárgylemezre (Superfrost Microscope Slide, VWR, Leuven, Belgium) helyeztük, majd a hőmérséklet-kiegyenlítődés érdekében néhány percig szobahőmérsékleten pihentettük. Ezt követően 30 percig fixáltuk 10%-os formalin oldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd desztillált vizes mosást követően szobahőmérsékleten szárítottuk őket. A magfestéshez a metszeteket 5 percre hematoxilin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatba tettük, majd 4 perc csapvizes mosást követően következett 2 perc eozin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatos festés és desztillált vizes mosás a citoplazma láthatóvá tételére. A metszetek dehidratálását felszálló alkoholsorban végeztük, végül egy xilol alapú médiummal (Shandin Consul-Mount, Thermo Scientific, Runcorn, Egyesült Királyság) fedtük le őket.

4.4. Nagy felbontású mikroszkópia és a kivágandó régiók kijelölése

A párhuzamos natív (autofluoreszcens) és HE-festett metszeteket Panoramic 250 Flash III szkennert (SYSMEX EUROPE SE, Sorderstedt, Németország) segítségével digitalizáltuk. A nagy felbontású képeket egy 20x/0.80 és egy 40x/0.95 objektív segítségével készítettük. A világos látóterű képek készítéséhez egy Adimec QUARTZ Q-12 A180 kamera, a fluoreszcens képek készítéséhez pedig egy sCMOS (pco.edge 4.2

bi) 8 bites kamera állt rendelkezésünkre. A folyamat során a megfelelő megvilágítást Lumencor SPECTRA III L fényforrás biztosította.

A natív metszetről készült világos látóterű és/vagy autofluoreszcens, valamint a HE-festett metszetről készült képek ko-regisztrációját követően a kivágandó régiók kijelölését patológus közreműködésével a Biology Image Analysis Software (BIAS, Single Cell Technologies, Szeged, Magyarország; (Mund és mtsai., 2022)) segítségével végeztük el.

4.5. Automatizált lézer-mikrodisszekció (LMD)

A lézer-mikrodisszekcióhoz (LMD) a szferoidokból, illetve az egérszövetekből készített metszeteket egy speciális, 2 μm vastagságú polietilén-naftalát (PEN) membránnal bevont tárgylemezre (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) helyeztük, amelyet előzetesen 254 nm hullámhosszú UV fénnel kezeltünk 30 percig. Az elkészült metszeteket az LMD-ig, illetve az azt követő omikai vizsgálatokig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk legfeljebb 2–3 napig.

Az analizálni kívánt minták kivágásához a módszerfejlesztés során egy Leica LMD6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország), majd később egy LMD7000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) típusú, állítható és flexibilis dióda-pumpált szilárdtest lézerrel (LMD6000: 355 nm, maximális impulzusenergia: 70 μJ , LMD7000: 394 nm, maximális impulzusenergia 120 μJ) felszerelt lézerdisszekciós mikroszkópot használtunk. Az LMD során a teljes kivágandó területet körbevágtuk az előre kijelölt határvonal mentén a nitrogénlézer segítségével. A lefelé kieső mintadarabokat egyenként fogtuk fel egy 96 lyukú mikrolemez (Eppendorf twin.tec, Merck) lyukaiban (lipidomikai mérésekhez) vagy 0,5 mL-es PCR-csővekben (Eppendorf Protein LoBind, Merck) (proteomikai és transzkriptomikai vizsgálatokhoz), ahogyan azt a **9B ábrán** korábban bemutattuk. A precíz kivágást mindkét mikroszkóp esetén HC PL FLUOTAR L 20x/0.40 99CORR, 40x/0.60 XT és 63x/0.70 CORR XT objektívekkel és Leica DFC7000 T CCD kamerával értük el. Az LMD rendszer irányítását az LMD6000 mikroszkópnál a Leica Laser Microdissection V 8.2.3.7603 szoftver, míg az LMD7000 mikroszkópnál a Leica Laser Microdissection V 8.3.1.8444 szoftver biztosította. A disszekált területek mérete 5000 és 160 000 μm^2 között változott. Az LMD minták további kezelése mintatranszfer nélkül történt a 4.6.2., illetve a 4.8. és 4.9. pontok szerint.

4.6. Lipidextrakció

4.6.1. 4T1 2D sejt kultúrák egyfázisú metanolos extrakciója

A 4.1.1.2. szerint készített sejt pelleteteket egyfázisú metanolos lipidextrakciónak vetettük alá (Péter és mtsai., 2017). A pelletre metanolt mértünk úgy, hogy a koncentráció 1 000 000 sejt/metanol mL legyen. 5 perc szonikálás, 5 perc síkrázás (1600 rpm-en), majd 5 perc centrifugálás (13 000 rpm-en) után a felülúszót tiszta Eppendorf-csőbe mértük és az MS analízisig -20°C -on tároltuk.

4.6.2. Lézerdisszekciót követő *in situ* lipidextrakció

Az LMD-t követően a szferoid-, illetve szövetmintákat tartalmazó mikrolemezt lecentrifugáltuk (4500 rpm, 5 perc), majd ugyanebben a mikrolemezben egy lépéses, egyfázisú lipidextrakciót végeztünk a doktori munkám során kifejlesztett szolvensrendszerrel (5.1.2. pont). A kloroform:metanol:izopropanol (CMP) = 1:2:1 (v/v/v) arányú oldószerkelet 0,5% dimetilformamidot (DMF) és 0,3 mM ammónium-kloridot, valamint a kvantitatív MS mérésekhez szükséges standardsorozatot is tartalmazott. Az oldószerkelet nemcsak extrakciós, hanem a shotgun MS mérésekhez szükséges infúziós szolvensnek is megfelelőnek bizonyult. Az extrakció során az extraktum koncentrációját 0,02–0,10 μg nedves tömeg/szolvens μL közötti értékre állítottuk be. A mikrolemezt a szolvens hozzáadása után záró fóliával fedtük, 5 percig ráztuk 300 rpm-en, majd az MS analízis előtt 1 órát hagytuk állni 8°C -on.

4.7. Shotgun lipidomikai analízis

A kvantitatív lipidomikai standardokat az Avanti Polar Lipids-től (Alabaster, AL, USA) szereztük be. Az extrakcióhoz/infúzióhoz használt oldószerek Optima LC-MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vagy LC minőségű (Merck, Darmstadt, Németország) termékek voltak, és a többi felhasznált vegyszerből is a piacon elérhető legjobb minőségű változatot (Sigma, Steinheim, Németország és Merck, Darmstadt, Németország) használtuk.

Az MS analíziseket robotizált nanoforrással (TriVersa NanoMate, Advion BioSciences, Ithaca, NY, USA) felszerelt Orbitrap Fusion Lumos tömegspektrométeren (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Németország) végeztük a következő paraméterbeállításokkal: a) elektrospay fúvóka átmérője 5,5 μm , b) szolvensáramlást biztosító háttérnyomás 1 psi, c) ionizációs feszültség pozitív ionmódban +1,3 kV, negatív ionmódban $-1,9$ kV, polaritásváltásos méréseknél $\pm 1,5$ kV, d) transzferkapilláris

hőmérséklete 260 °C, e) tömegfelbontás MS1 szkennelési módban $R = 240\,000$ ($m/z = 200$), MSn fragmentációs kísérleteknél $R = 30\,000$ ($m/z = 200$), f) vizsgált tömegtartomány $m/z = 400\text{--}1600$ és $m/z = 150\text{--}800$. Negatív ionmódban foszfatidilkolint (diacil PC és alkil-acil PC-O), foszfatidiletanolamint (diacil PE és alkenil-acil PE-P), foszfatidilinozított (PI), foszfatidilszerint (PS), foszfatidsavat (PA), foszfatidilglicerint (PG), illetve bisz(monoacilgliceril)foszfátot (BMP), kardiolipint (CL), lizolipideket (LPC, LPE, LPI, LPS, LPG és LCL), ceramidot (Cer), hexozilceramidot (HexCer), GM3 gangliozidot és szulfatidot (Sulf), míg pozitív ionmódban szfingomielint (SM), digliceridet (DG), trigliceridet (TG) és koleszteril-észtert (CE) detektáltunk és kvantitáltunk. A PC-t pozitív ionmódban is analizáltuk, a magasabb agyi gangliozidokat (GD3, GD1, GT1 és GQ1) pedig negatív ionmódban azonosítottuk és mértük.

4.7.1. Adatfeldolgozás, kiértékelés

A lipidspecieszek azonosításához a LipidXplorer 1.2.8.1 szoftvert használtuk (Herzog és mtsai., 2012). Az azonosítás során a program a monoizotópos csúcsok tömeg/töltés (m/z) értékeihez – bizonyos megszorításoknak eleget tevő – elemi összetételeket társít. A beállított tömegpontosság 2 ppm volt, a jelintenzitások pedig a beépített C13 izotópkorrektciók után kerültek integrálásra. A lipidspecieszek annotálásához az előbbieken kapott eredményfájlokat lipidosztály-specifikus LipidXplorer „query”-kel dolgoztuk fel. Az annotáció a legtöbb esetben az „összegképlet” formula szintjén történt (pl. PC(36:4)) a lipidek egyszerűsített nevezéktana alapján (ld. 2.8.4.). Fontos megjegyezni, hogy egy adott összegképlethez glicero(foszfo)lipidek esetében többféle zsírsavlánc-kombináció tartozhat, amelyek egymással izomer viszonyban vannak. Továbbá a PC/PE-O(x:y) (alkil-acil) és a PC/PE-P(x:y-1) (alkenil-acil) molekulák, valamint a PG/BMP specieszek ugyancsak egymás izomerjei. Mivel ezek a lehetséges lipidspeciesz-izomerek a shotgun technikával MS1 módban nem különböztethetők meg, a kvantitálás során együtt értékeltük ki őket. Ugyanakkor szeretnénk hangsúlyozni, hogy az alkalmazott platform lehetővé teszi fragmentációs kísérletek elvégzését, és ezáltal az izomer specieszek felbontását (ld. **11. ábra**).

Az adatok további feldolgozásához saját, Microsoft Excel-ben írt makrókat használtunk, amelyek képesek a nyers intenzitásadatok szűrésére, a minták csoportosítására, relatív és abszolút koncentrációadatok előállítására, számos összegző paraméter és alapstatisztikai adat automatikus számítására, valamint az eredmények

grafikus ábrázolására. A kvantitálás során az integrált intenzitásadatokat hasonlítottuk össze a megfelelő belső standardra vonatkozó értékekkel; a belső standardok mennyiségét és figyelembe vett ionformáját az **S1. táblázat** tartalmazza.

4.8. Proteomikai analízis

A 4T1 szferoid és 4T1 egér szubkután tumorból készült LMD minták proteomikai analízisét a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Kutatócsoportjával kooperációban valósítottuk meg.

Az PCR-csővekbe gyűjtött LMD mintákat lecentrifugáltuk (2 perc, 21 000 g), ráértünk 15 μ L, 1 mM ditiotreitolt tartalmazó 25 mM-os ammónium-bikarbonátot, 3 percig szonikáltuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk (10 másodperc) őket, és ezt kétszer megismételtük. Ezután az elegyhez hozzáadtunk 5 μ L, 0,02 μ g tripszint tartalmazó 25 mM-os ammónium-bikarbonátot és további 5 percig szonikáltuk, majd 5 μ L, 6,6 mM jódacetamidot tartalmazó 25 mM-os ammónium-bikarbonáttal 42 °C-on emésztettük 3 órán át. A reakciót 2 μ L 10%-os hangyasavval állítottuk le. Az emésztési elegyeket egyszer használatos csapdázó minioszlopra vittük (Evotip, Evosep, Odense, Denmark), majd Evosep One (Evosep)–Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) rendszerrel, adatfüggő LC-MS/MS módszerrel analizáltuk (beállítási paraméterek: LC módszer - 30 SPD, FAIMS kompenzációs feszültség 50 és 70 V, MS1 felbontás $R = 120\,000$ (Orbitrap), MS2 fragmentáció ioncsapdában nagy energiájú ütközéses bomlással (normalizált ütközési energia, $NCE = 35$)). Az adatkiértékelést és MS1 alapú kvantitálást a Proteome Discoverer 3.0 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) végeztük.

4.9. Transzkriptomika

A 4T1 szferoidokból készült transzkriptomikai analíziseket a Delta Bio 2000 Kft. molekuláris diagnosztikával és szekvenálással foglalkozó divíziója, a DeltaGene biztosította.

Az újgenerációs szekvenáláshoz a könyvtárkészítést közvetlenül a lézerdisszekciós mintákból végezték a SMART-Seq® mRNA LP (with UMIs) Kit (Takara Bio USA, Inc., San Jose, CA, USA) felhasználásával. Az alkalmazott kit rendkívül kis mennyiségű minták (pl. 1–1000 intakt sejt) teljes hosszúságú transzkriptom szekvenálását képes nagy pontossággal biztosítani az egyedi molekulaaazonosító (unique molecular identifier, UMI) alapú 5' RNS-számolás és az ultraérzékeny SMART-Seq

kémia kombinálásával. A szekvenálásra kész könyvtárak minőségellenőrzése BioAnalyzer 2100 műszerrel történt nagy érzékenységgű DNS chip felhasználásával (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Az újgenerációs szekvenálás NextSeq 500 szekvenáló rendszeren készült NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 ciklus) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) segítségével.

4.10. Statisztikai módszerek

A lipidomikai eredményeket vagy a membránlipidek mol%-ában fejeztük ki, ahol a membránlipideket a glicerofoszfo- és szfingolipidek összegeként definiáltuk, vagy pedig az abszolút lipidmennyiségeket határoztuk meg pmol-ban kifejezve; az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SD}$ ($n \leq 4$ esetén) vagy $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában ($n \geq 5$ esetén) adtuk meg.

A módszerválidálási kísérleteknél a pontosságot a variációs együttható (CV%) segítségével írtuk le, amit a $\text{CV\%} = \text{SD}/\text{átlag} \times 100$ képlettel számítottunk. A linearitást a determinációs együtthatóval (R^2) validáltuk. A lipidomikai adatok többváltozós statisztikai analíziséhez a MetaboAnalyst szoftvert használtuk (Pang és mtsai., 2021).

Az adatok páronkénti összehasonlításához kétmintás t -próbát alkalmaztunk; a szignifikanciát Storey és Tibshirani módszere szerint határoztuk meg (Storey & Tibshirani, 2003), és az $\text{FDR} < 0,05$ fals pozitív arányhoz (false discovery rate, FDR) tartozó p -értékeket fogadtuk el. A fehérjeadatok összehasonlításánál a $p < 0,05$, $q < 0,05$, illetve az $\text{abs}(\log_2\text{-fold}) \geq 0,3$ feltételek együttes teljesülését kívántuk meg.

Az eltérően expresszálódó fehérjék GO-kategóriák szerinti elemzése (funkcionális annotációja) esetén külön kezeltük a pozitívan, illetve negatívan regulálódott fehérjéket. A felülreprezentációs analízis esetén háttérként az összes mért fehérje listáját használtuk. Az elemzés a ShinyGO online szoftverrel történt (Ge és mtsai., 2020). Az útvonalelemzéseket fehérjék esetén a Pathview R kód felhasználásával (R Statistical Software (v4.3.1; R Core Team 2023)), a ShinyGO KEGG (Kanehisa & Goto, 2000) statisztikája alapján ábráztuk. A térképeket az összes fehérjeadat felhasználásával készítettük oly módon, hogy a mért, de a fenti feltételeket nem teljesítő fehérjék $\log_2\text{-fold}$ értékét 0-val tettük egyenlővé.

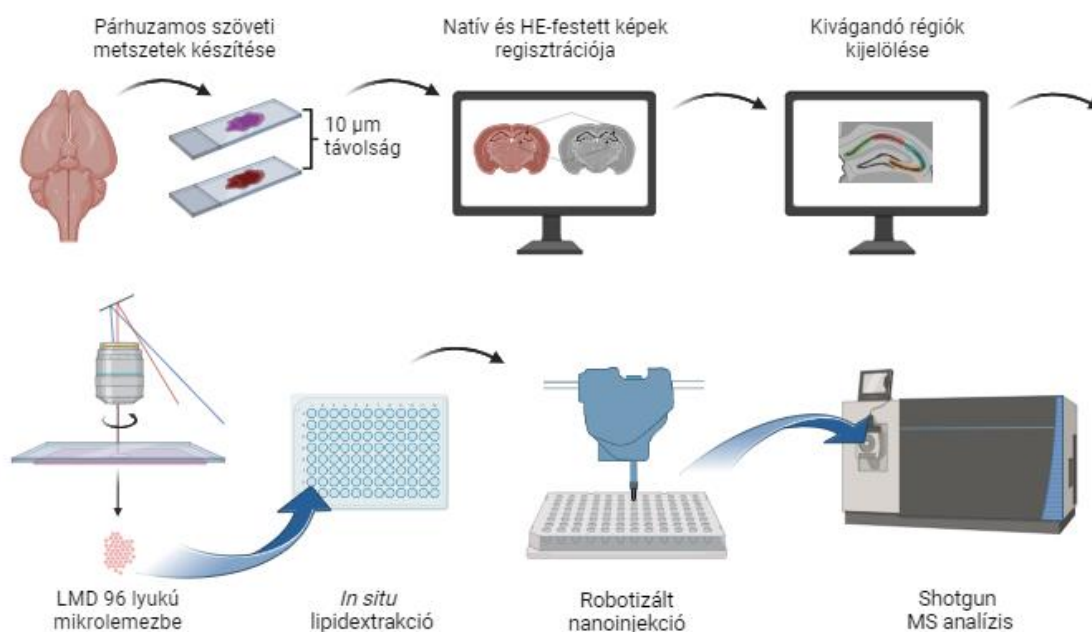
Az RNAseq adatokat a Reactome adatbázis és szoftver (Gillespie és mtsai., 2022) segítségével elemeztük a Camera (GSEA) eszközzel (Griss és mtsai., 2020) „trimmed mean of M values” (TMM) normalizációt (Robinson & Oshlack, 2010) követően.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Lézerdisszekcióval kapcsolt, kvantitatív shotgun lipidomikai platform fejlesztése

5.1.1. Áttekintés

Kifejlesztettünk és validáltunk egy új, LMD-vel kapcsolt shotgun lipidomikai platformot, ami a kvantitatív és nagy lefedettségű lipidomanalízist nagy térbeli felbontással kombinálja (Varga-Zsíros és mtsai., 2023). A módszer főbb lépései a következők (**10. ábra**): 1) párhuzamos natív és hematoxin–eozin-festett metszetek készítése, 2) a natív és festett metszetekről készült nagy felbontású mikroszkópos képek ko-regisztrációja, 3) patológiai elemzést követően a kivágandó régiók kijelölése, 4) a kijelölt területek lézeres kivágása közvetlenül egy 96 lyukú mikrolemezbe, 5) *in situ* lipidextrakció, 6) robotizált, nanoforrással történő közvetlen mintabevitel és 7) kvantitatív shotgun lipidomikai analízis.



10. ábra: Lézer-mikrodisszekcióval kapcsolt, kvantitatív shotgun lipidomikai módszer folyamatábrája (készült a BioRender.com alkalmazásával)

5.1.2. Módszerfejlesztés: extrakciós-infúziós szolvenselegye kidolgozása

Az új lipidomikai platform alapjául a korábban validált shotgun lipidomikai módszerünk szolgált, amelyben egyfázisú metanolos extrakcióval készült extraktumokat használunk (Péter és mtsai., 2017). Az eljárásban a minél nagyobb lefedettség biztosításához mindkét ionmódban végzünk méréseket, amihez az extraktumot hígítjuk

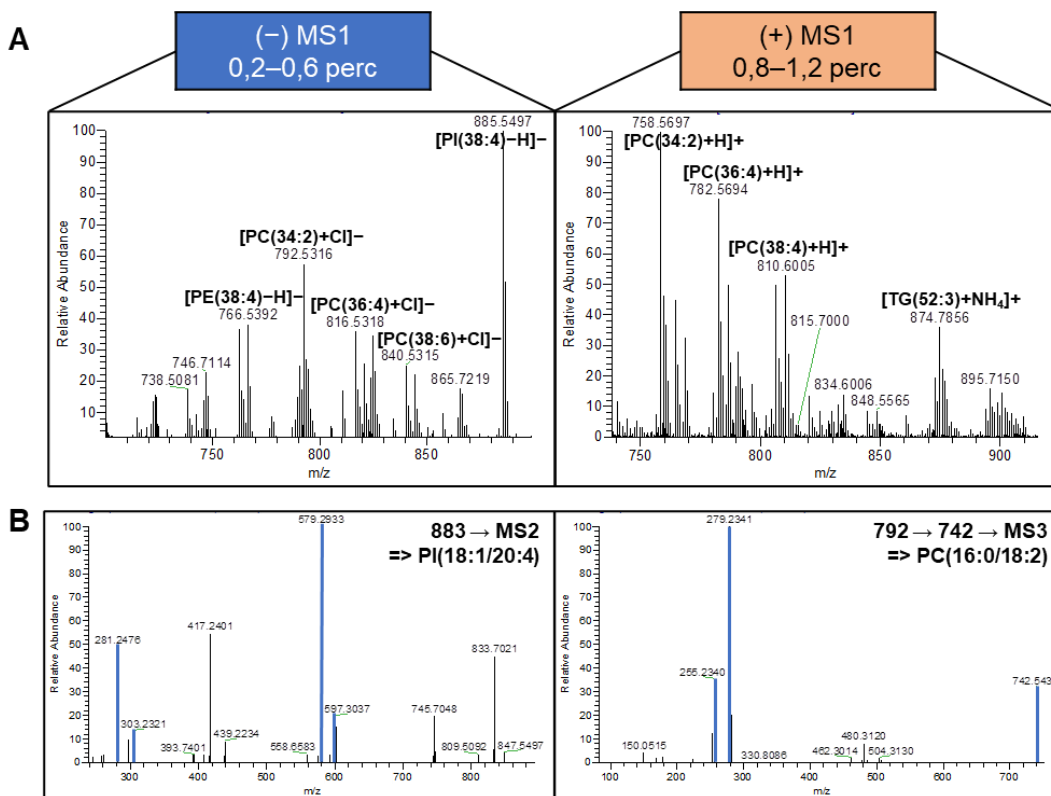
az infúziós szolvenseleggyel, majd a hígított extraktum kettéosztása után mindkét részlethez hozzáadjuk az ionmódspecifikus additívokat. Ezt követően az ionmódonkénti külön injektálások az additívokhoz optimalizált – egymástól eltérő – ionizációs feszültségeken történnek (Péter és mtsai., 2020, 2021; Tóth és mtsai., 2021).

Ezt a protokollt próbáltuk alkalmazni a mindössze néhány μL térfogatú LMD mintákra is. Az eleinte PCR-cső kupakjába gyűjtött disszekált mintadarab többszöri transzferálása azonban jelentősen rontotta az MS spektrumok jel-zaj viszonyát. Ezért úgy gondoltuk, hogy a transzferálási lépések minimalizálása és a polaritásváltással történő MS mérés megoldást jelenthet a problémára. Utóbbira a nagy felbontású tömegspektrométer azon tulajdonsága ad lehetőséget, hogy gyorsan képes polaritásváltásra ppm alatti tömegpontossággal. Ehhez találnunk kellett egy olyan infúziós szolvensösszetételt, ami jól porlasztható, stabil elektropsray-t biztosít, mindkét ionmódban megfelelő minőségű MS spektrumokat szolgáltat és kvantitatív extrakciót tesz lehetővé.

A fejlesztéshez az eddigi munkáinkban eredményesen alkalmazott kloroform:metanol:izopropanol (CMP) = 1:2:1 összetételű, negatív ionmódban 5% dimetilformamidot (DMF), pozitív ionmódban 3 mM ammónium-kloridot tartalmazó infúziós szolvens szolgált kiindulási pontként. Számolnunk kellett azonban azzal, hogy az alkalmazott robotizált mintabeviteli egység (NanoMate) polaritásváltásra egy adott feszültségen képes, vagyis az ionmódonként eltérő feszültségértékeket egy kompromisszumos értékre kell állítanunk. Az optimalizálás során változtattuk az infúziós elegy alapösszetételét (CMP 1:2:2, 1:2:4), az additívok mennyiségi arányát és koncentrációját (5% DMF/3 mM NH_4Cl , 0% DMF/3 mM NH_4Cl , 5% DMF/0 mM NH_4Cl kombinációk, továbbá 10x hígított koncentrációkkal az 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1 arányú összetételek) és az ionizációs feszültséget (1,3 – 1,9 kV). Az alkalmazott kvantitatív belső standardok relatív arányváltozásai alapján megfigyeltük, hogy i) alacsonyabb ionizációs feszültségen (1,3 kV) a negatív ionmódú jelek lényegesen kisebb intenzitásúak, ii) a nagyobb NH_4Cl koncentráció (3 mM) alacsonyabb feszültségnél (1,3 kV) is komoly klaszterképződést eredményez negatív ionmódban, iii) ugyanakkor 1,5 kV-on már a 0,3 mM mennyiségű NH_4Cl is hatékonyan segíti elő a PC ionizációját negatív ionmódban, miközben a többi negatív jel is elfogadható intenzitású, végül pedig iv) 1,5 kV-on a klaszterképződés egyik ionmódban sem zavaró mértékű.

5.1.3. Módszerválidálás: MS mérés polaritásváltással

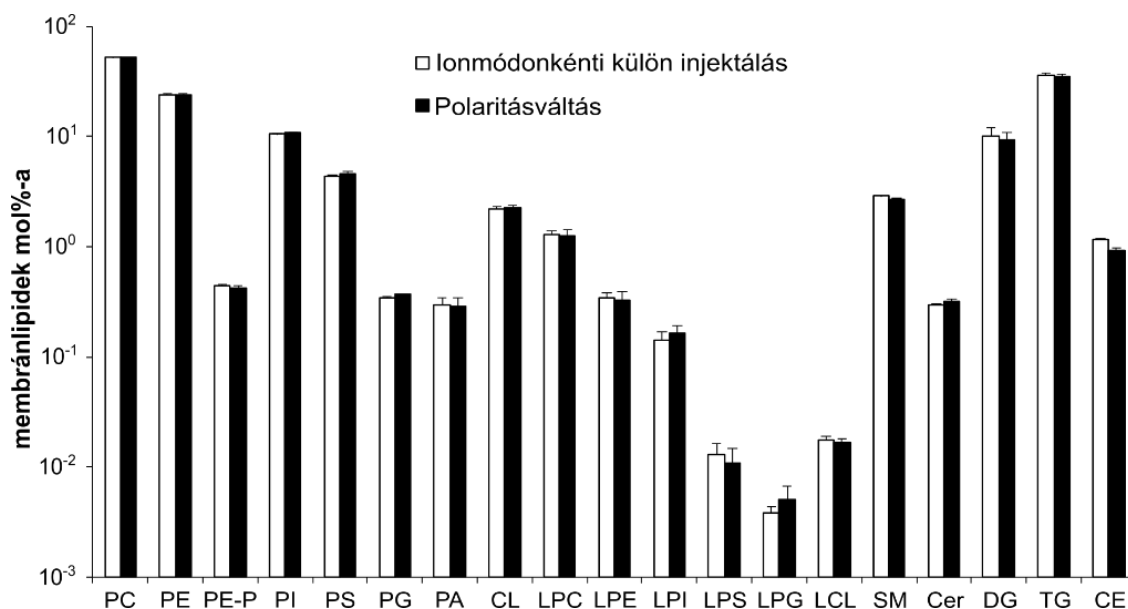
Fentiek alapján a CMP = 1:2:1 + 0,5% DMF + 0,3 mM NH₄Cl alkalmazása mellett döntöttünk. Ez a szolvensösszetétel mindkét polaritási módban jó minőségű spektrumokat eredményez (**11A ábra**), továbbá MS2 és MS3 fragmentációs analízisek (**11B ábra**) elvégzésére is lehetőség nyílik 2 perces futási időn belül.



11. ábra. Polaritásváltást tartalmazó MS adatgyűjtési program. (A) Reprezentatív MS1 spektrumok negatív és pozitív ionmódban. (B) MS2 ([PI(38:5)–H][–], m/z = 883) és MS3 [PC(34:2)+Cl][–], m/z = 792) fragmentációs kísérletek a zsírsavlábak összetételének meghatározására. Objektum: egérmáj LMD minta.

A polaritásváltásos és az ionmódonkénti külön mérések összehasonlításához 10 µm vastag nem-disszekált, teljes májmetsetekből készült extraktumokat használtunk; az analízisek a kétféle injektálási módszerrel kapott lipidprofilok jó egyezését mutatták ki (**12. ábra**). Előnyei mellett azonban néhány kritikai észrevételt is meg kell említenünk a polaritásváltásos méréssel kapcsolatban. Az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló membránlipidet, a PC-t, gyakran kvantitáljuk pozitív ionmódban. Korábban megmutattuk, hogy az NH₄Cl mM-os koncentrációban (3–10 mM) való alkalmazása hatékonyan szorítja vissza a PC nátriumadduktjának képződését a protonált formával szemben (~1%). Az NH₄Cl koncentrációjának 0,3 mM-ra történő csökkentése következtében a [PC+Na]⁺ mennyisége jelentősen megnőtt (~10%). Ez azért

probléma, mert egy adott PC speciesz nátriumadduktjának (pl.: [PC(34:2)+Na]⁺) és egy másik PC speciesz – amelyben további két CH₂ csoport és további 3 kettős kötés található – protonált formájának ([PC(36:5)+H]⁺) tömegkülönbsége mindössze $\Delta m/z = 0,0024$, ami nagy felbontású készülékekkel sem különböztethető meg, ezért ha az átfedés nem korrigált, kvantitálási hibát okoz. Az egyik korrekciós lehetőség, hogy a PC-t olyan ionformában is mérjük, ahol ilyen jellegű hibával nem kell számolni. Esetünkben ez jól alkalmazhatónak bizonyult, mert az NH₄Cl jelenléte elősegíti a [PC+Cl][–] képződését, amit negatív ionmódban megfelelően tudtunk detektálni. Egy másik lehetőség az izobár átfedések matematikailag pontos korrekciója, amit Höring és mtsai dolgoztak ki (Höring és mtsai., 2020). Az izobárok átfedésének problémáját sokszor figyelmen kívül hagyják, különösen MSI kísérletek során, és ez nemcsak kvantitálási hibához, hanem akár félreazonosításhoz is vezethet. Egy másik kritikai szempont, hogy az alacsonyabb NH₄Cl koncentráció jelentősen csökkenti a neutrális lipidek (DG, TG, CE) NH₄-adduktjainak képződését. Következésképpen ezen molekulák detekciós érzékenysége csökken, és az adott körülmények mellett csak akkor mérhetőek megbízhatóan, ha számottevő mennyiségben fordulnak elő az adott mintában (ilyenek például a májból (12. ábra), az izomból vagy a zsírszövetből készült extraktumok).



12. ábra: Polaritásváltással és ionmódonkénti külön injektációval felvett lipidprofilok. Az adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk ($n = 4$ metanolos extraktum a teljes májmetszetekből).

5.1.4. Módszervalidálás: reprodukálhatóság és extrakciós hatékonyság

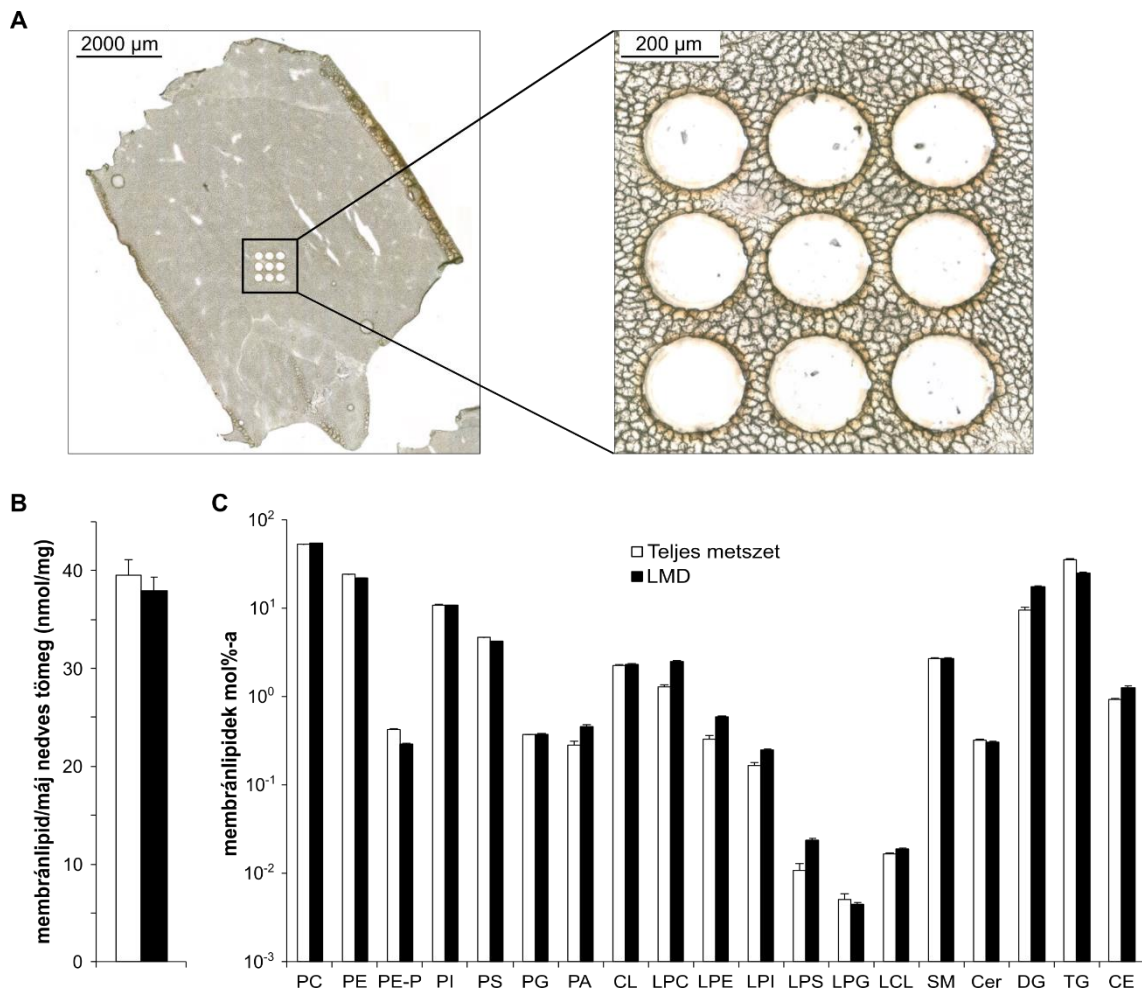
Ezek után azt kívántuk bemutatni, hogy az újonnan kidolgozott szolvenselegység biztosítja a lipidek hatékony és reprodukálható kivonását. Az extrakciós hatékonyságot

összevetettük mind kvantitatív, mind pedig az extrahált lipidek összetételének tekintetében az általunk korábban validált egyfázisú metanolos extrakcióval (Péter és mtsai., 2017). Ehhez egy kis darab egérmájából (7 mm x 7 mm, kb. 490 µg nedves tömeg) 10 µm vastag, egymástól 10 µm távolságra lévő párhuzamos metszeteket készítettünk. A metszetek egy részét (4 párhuzamos minta) kiextraháltuk 250 µL metanollal, másik részükből pedig 30 000 µm² méretű köröket vágunk ki lézerrel (összesen 24 db egyedi kör 3 párhuzamos metszetből, mindegyik kb. 0,3 µg nedves tömegű) a **13A ábrán** látható módon. A disszekált területek horizontális és vertikális közelsége biztosította a vizsgált szöveti régiók homogenitását. Az LMD mintákat az új oldószerleggyel a 4.6.2. pont szerint *in situ* extraháltuk, majd további mintatranszfer nélkül közvetlenül a tömegspektrométerbe injektáltuk. A teljes metszetekből készült metanolos extraktumokat az MS mérés előtt még hígítottuk infúziós szolvenssel úgy, hogy a disszekált és nem-disszekált szövetminták koncentrációja összemérhető legyen (0,06–0,10 µg nedves tömeg/infúziós szolvens µL).

Az LMD mintákból közel 200 lipidspeciest azonosítottunk és kvantitáltunk. A variációs együttható felső határát $CV\% = 30$ -as értéken rögzítettük. Ennek a peremfeltételnek 164 komponens felelt meg, amelyeknek 66%-a jó vagy kiváló $CV\%$ értékkel rendelkezett (≤ 20), ami igazolja a teljes munkafolyamat reprodukálhatóságát (**S2. táblázat**).

Az extrakciós hatékonyság megállapításához a nem-disszekált, teljes szöveti metszeteket használtuk kontrollként. A membránlipidek – GPL és SL – esetében az extrahált lipidek mennyisége és lipidprofilja egyaránt jó egyezést mutatott az LMD minták és a teljes metszetből származó extraktumok összevetésekor (**13B és C ábra**). Megjegyzendő, hogy az extrahált lipidtartalom ugyancsak jól egyezett az irodalomban korábban publikált egérmájadatokkal (Nelson, 1962; Norheim és mtsai., 2021). A kétféle minta összehasonlításakor a neutrális lipidek – DG, TG és CE – esetében detektált eltérések valószínűleg azzal magyarázhatóak, hogy a teljes metszet ezekre a lipidekre nézve heterogénebb eloszlású lehet, az LMD minták viszont annak csupán kis részét reprezentálják. Meg kell említenünk továbbá, hogy a lizolipidek és a PA relatív mennyisége nagyobb volt a disszekált mintákban, mint a teljes májmetszetben (3,8 vs. 2,1 mol%), ami a struktúrlipidek lézerabláció-okozta csekély degradációjára utalhat. Ugyanakkor éppen ez a kis mértékű eltérés igazolja, hogy a lézerhatás következtében komolyabb bomlással nem kell számolni, vagyis a módszer megbízhatóan alkalmazható lipidanalízisre. Ráadásul ezt a bomlási arányt a későbbi kísérleteink során tovább lehetett

csökkenteni egy újabb fejlesztésű, jobb vágási hatékonysággal rendelkező lézerdisszekciós mikroszkóp (LMD7000) beállításának köszönhetően.



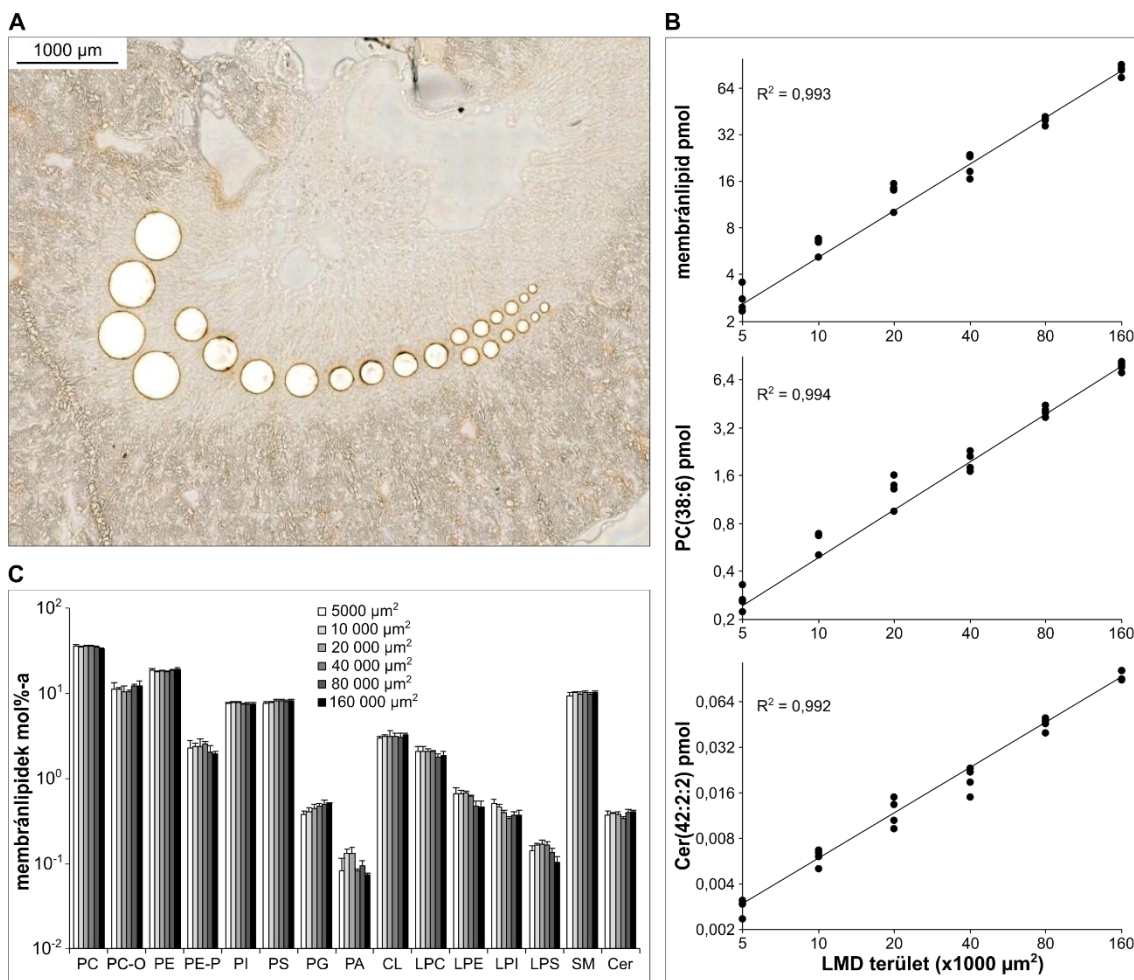
13. ábra: LMD-kapcsolt shotgun lipidomikai módszer validálása egérmájmetseten. (A) A reprezentatív, világos látóterű mikroszkópos képeken a kivágandó területek elhelyezkedése látszik LMD után a teljes metseten (bal), valamint nagyított nézetben (jobb). Nem-disszekált és disszekált minták (B) extrahált membránlipid mennyisége (nmol/mg nedves tömegben kifejezve) és (C) lipidosztály-összetétele (a membránlipidek mol%-ában kifejezve). Az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk ($n = 4$ teljes metset, mint kontroll; $n = 24$ LMD minta (3 párhuzamos metsetből 6–9 kör/metset)).

Mivel az alkalmazott oldószerrendszer egyszerre szolgál extrakciós és infúziós szolvensként, időt és energiát tudunk megtakarítani azzal, hogy elhagyhatunk a munkafolyamatból számos lépést, mint az extrakciós oldószer bepárlását, az extraktum megfelelő infúziós oldószerben való hígítását, valamint a polaritásfüggő oldószerösszetétel miatti kétszeres injekciót.

5.1.5. Módszervalidálás: a kvantitálás linearitása

5.1.5.1. Vesemetszet

A kvantitálás lineáris tartományának meghatározásához 10 μm vastag egérvesemetszet medulláris részéből vágunk ki különböző nagyságú területeket az 5000–160 000 μm^2 tartományban (**14A ábra**) úgy, hogy az extrakciós szolvens térfogatát a kivágott mintatömegekkel arányosan állítottuk be (0,02–0,08 μg /szolvens μL).



14. ábra: Egérvesemetszetből készült, LMD-kapcsolt shotgun lipidomikai analízis linearitása. (A) Reprezentatív, világos látóterű mikroszkópos kép LMD-t követően. (B) A kvantitálás linearitása a teljes membránlipid-tartalom (felül), az abundáns PC(38:6) (középen), valamint a kis mennyiségben előforduló Cer(42:2:2) (alul) esetében ($n = 4$). (C) Membránlipid-összetétel a vizsgált LMD tartományban (az adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk, $n = 4$ párhuzamos metszet).

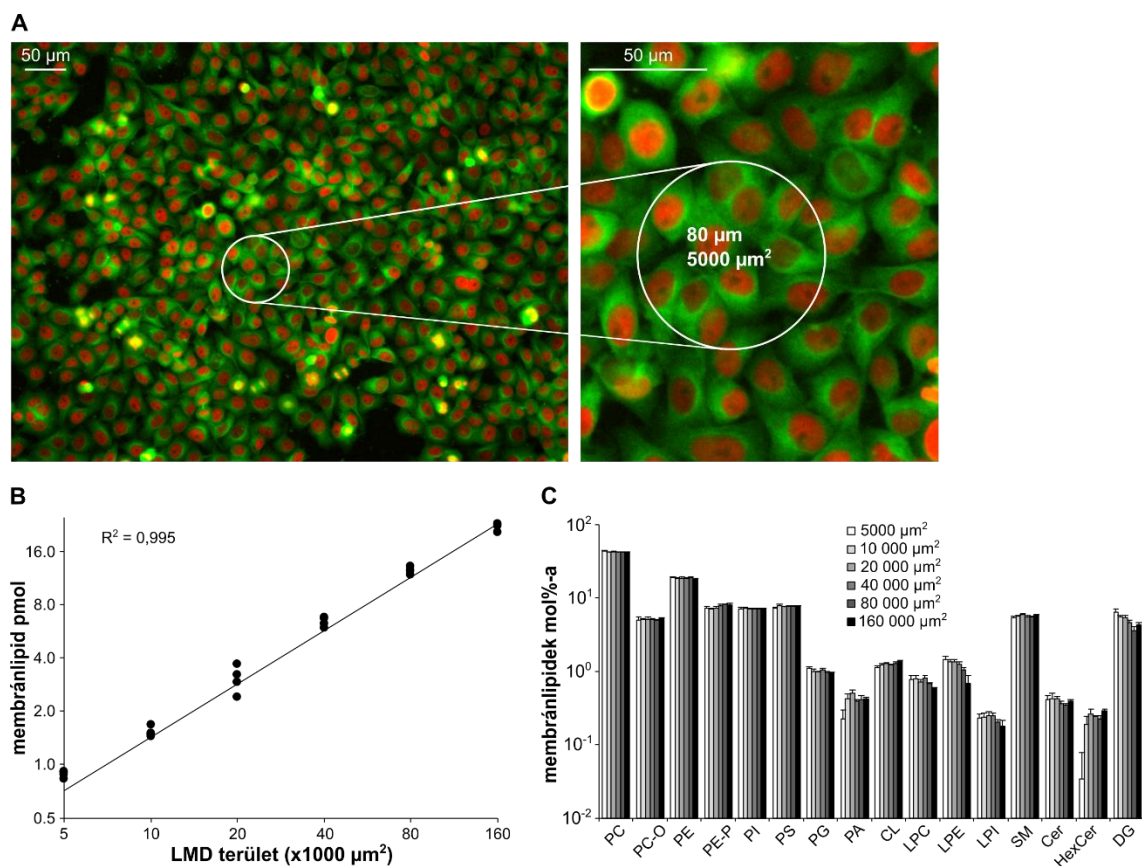
A teljes membránlipid-tartalom kiváló linearitást mutatott a vizsgált LMD tartományban ($R^2 = 0,993$; **14B ábra, fent**). Ugyancsak magas determinációs együtthatókat ($R^2 > 0,9$) állapítottunk meg a membránlipidom összes, a kiválasztási kritériumnak ($R^2 > 0,7$) eleget tevő komponensére (**S3. táblázat**), ahogyan ezt egy

abundáns membránlipid, a PC(38:6), valamint egy kis mennyiségben előforduló jelátviteli lipid, a Cer(42:2:2), példáján mutatjuk be (**14B ábra, középen és lent**).

A 10 μm vastag metszetből kb. 130 lipidspeciest tudunk kvantitálni a 10 000 μm^2 -os (és az afeletti) LMD területek esetében (**S3. táblázat**), ami 4000 μm^3 -os átlagos emlős sejtterfoggattal számolva nagyjából 25 sejt mennyiségi analízisét jelenti. A kvantitálható komponensek száma ($n = 115$) nem mutatott jelentős csökkenést az 5000 μm^2 -os LMD méret esetében sem. Fontos megjegyezni továbbá, hogy a kvantitálás linearitása mellett a lipidösszetétel is jól megtartott volt a vizsgált mérettartományban (**14C ábra**), és a kvantitált specieszek többségének variációs együtthatója $\text{CV}\% < 30$ értéket mutatott (**S4. táblázat**).

5.1.5.2. HeLa 2D sejt kultúra

A kifejlesztett LMD-kapcsolt shotgun lipidomikai módszert 2D emlős sejt kultúrán is teszteltük. HeLa sejteket növesztettünk fémkeretes PET membránon 80%-os konfluenciáig (**15A ábra**), majd különböző nagyságú területeket vágunk ki az 5000–160 000 μm^2 tartományban.



15. ábra: HeLa 2D sejt kultúrából készült, LMD-kapcsolt shotgun lipidomikai analízis linearitása. (A) 80%-os konfluenciájú, két fluoreszcens fehérjét stabilan expresszáló HeLa-Kyoto humán adenokarcinóma sejt kultúra reprezentatív képe. (B) A kvantitálás linearitása a teljes

membránlipid-tartalomra ($n = 4$). (C) Membránlipid-összetétel a vizsgált LMD tartományban (az adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk, $n = 4$).

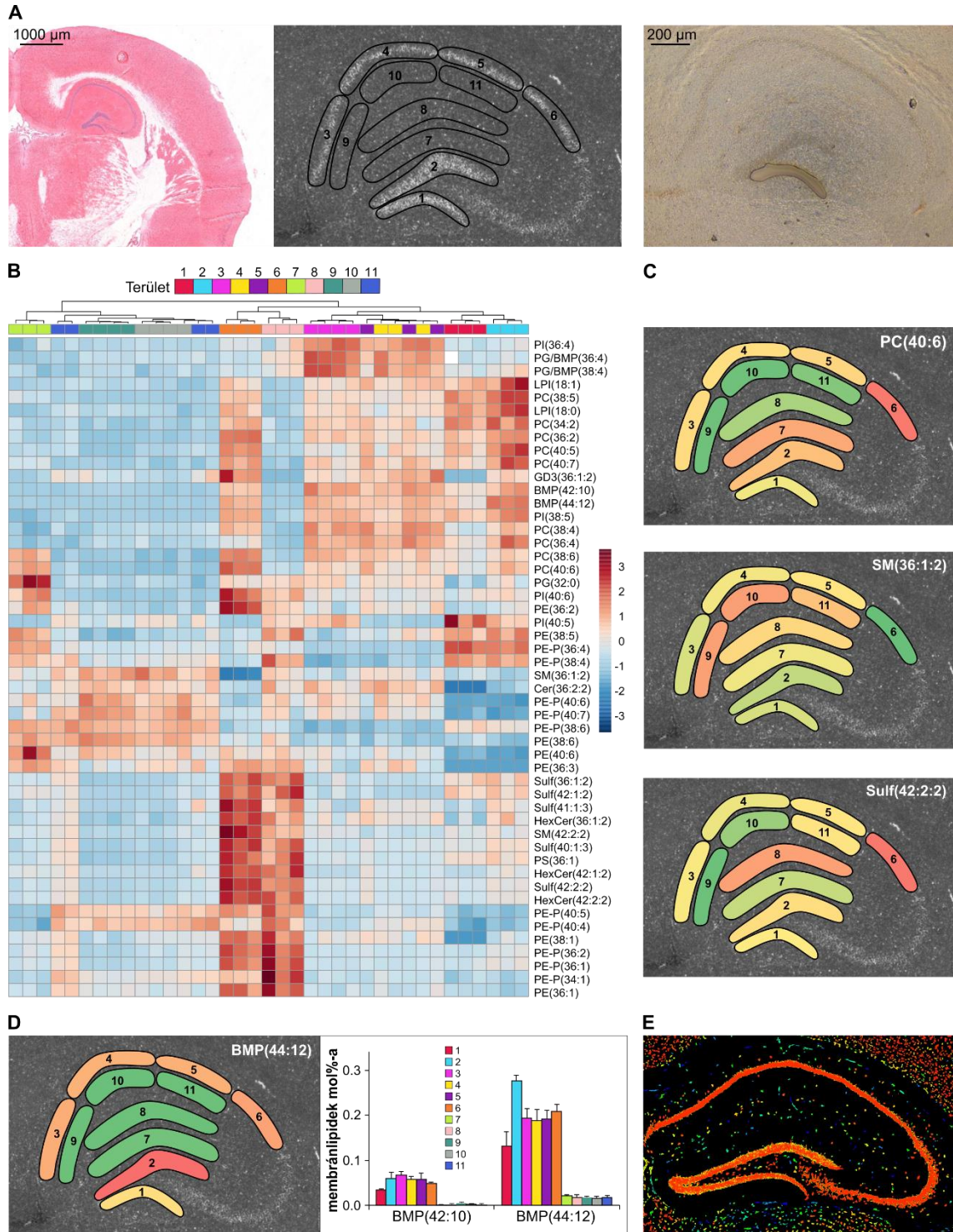
A szöveti példához hasonlóan itt is kiváló linearitást figyelhetünk meg a teljes membránlipid-tartalomra ($R^2 = 0,995$, **15B ábra**), valamint az egyedi lipidspecieszekre vonatkozóan ($R^2 > 0,9$, **S5. táblázat**) egyaránt. A 20 000 μm^2 és az afeletti LMD területekből mintegy 140 lipidkomponenst kvantitáltunk (**S5. táblázat**). Ez a szám 10 000 μm^2 esetében 120-ra csökkent, de még az 5000 μm^2 -os mintákból is – amelyek csupán 10 sejtnek felelnek meg és kevesebb, mint 1 pmol-os totál membránlipid-tartalommal rendelkeznek – 95 lipidspeciest tudunk kvantitálni (**15A és B ábra**). A lipidösszetétel ugyancsak megtartott volt a vizsgált LMD tartományban (**15C ábra**), és a legtöbb kvantitált speciest itt is $\text{CV}\% < 30$ értékkel jellemezhetjük még a legkisebb disszekált területek esetében is (**S6. táblázat**).

5.1.6. A módszer hatékonyságának bemutatása: a hippocampusz heterogenitása

A kidolgozott LMD-kapcsolt shotgun lipidomikai platform teljesítőképességét a szöveti heterogenitás kimutatásával teszteltük. Ehhez 10 μm vastag egér agymetszetek (3–4 párhuzamos metszet) hippocampusz régiójából összesen 11 különböző, 50 000 és 130 000 μm^2 közötti területet vágunk ki (**16A ábra**), amelyek a következők voltak: a gyrus dentatus granuláris sejtrétege (1 és 2) és molekuláris sejtrétege (7), valamint a különböző Cornu Ammonis (CA) régiók stratum pyramidale (3–6), stratum lacunosum-moleculare (8) és stratum radiatum (9–11) rétegei. A **16B ábrán** bemutatott klaszteranalízis-hő térkép szerint az anatómiailag hasonló struktúrák hasonló lipidomikai mintázattal rendelkeznek (pl. a gyrus dentatus granuláris sejtrétegei (1 és 2), a CA1 régió piramidális sejtrétege (3–5) vagy a CA1 régió stratum radiatum rétege (9–11)), míg az anatómiailag különbözőek eltérő lipidprofilot mutatnak. Érdekes módon a CA2 régió stratum pyramidale rétegében (6) nagyon specifikus lipidösszetételt detektáltunk a CA1 régió hasonló rétegeihez (3–5) képest. Ez az észrevétel összhangban van a CA2 terület különleges tulajdonságainak és funkcióinak újrafelfedezésével (Dudek és mtsai., 2016).

Agyi lipidspecieszek térbeli eloszlására láthatunk példákat a **16C ábrán** (a teljes hippocampusz adatsort az **S7. táblázat** tartalmazza), amelyek a hippocampális lipidom jellemző lipidosztályait képviselik, így a PC(40:6) a glicerofosfolipideket, az SM(36:1:2) a foszfoszíngolipideket, míg a Sulf(42:2:2) a savas glikoszíngolipideket reprezentálja. A PC(40:6) és a Sulf(42:2:2) térbeli eloszlása jelentős halmazódást

mutatott a CA2 régió stratum pyramidale rétegében (6), ugyanakkor az SM(36:1:2) itt alacsonyabb abundanciájú volt. Meg kell jegyeznünk, hogy a hippocampális PC(40:6) vagy SM(36:1:2) eloszlása jó egyezést mutatott nemrégiben publikált MSI adatokkal (Angerer és mtsai., 2022).



16. ábra: Az egérhippokampusz lipidomjának térbeli heterogenitása. (A) Félagyból készült HE-festett metszet reprezentatív képe (bal), autofluoreszcens kép a kivágandó régiók helyének jelölésével (középen) és a folyamatban lévő LMD (jobb). (B) Hierarchikus klaszteranalízis hő térképes megjelenítése; távolságmérték: euklideszi, klaszteralgoritmus: Ward, a színek

standardizált értékeket reprezentál (z-érték). (C) Válogatott lipidspecieszek térbeli eloszlása. (D) BMP(44:12) térbeli eloszlása (bal), valamint a BMP(44:12) és BMP(42:10) mennyiségi analízise (jobb; az adatokat átlag \pm SD formában ábrázoltuk, $n = 3-4$ párhuzamos metszet). (E) A katepszin B expressziójának referenciaképe az “Allen Brain Institute website atlas.brain-map.org”-ból átvéve. Kivágott területek megnevezései – 1 és 2: a gyrus dentatus granuláris sejtrétegei, 3–5: a CA1 régió stratum pyramidale rétege, 6: a CA2 régió stratum pyramidale rétege, 7: a gyrus dentatus molekuláris sejtrétege, 8: a CA1 régió stratum lacunosum-moleculare rétege és 9–11: a CA1 régió stratum radiatum rétege. PC, foszfatidilkolin; SM, szfingomielin; Sulf, szulfatid; BMP, bisz(monoacilgliceril)foszfát. A (C) és (D) paneleken a színskála jelentése: zöld – alacsony, piros – magas.

A **16D ábra** bal oldalán látható kép a BMP(44:12) lipidspeciesz neuronális rétegekben (1, 2 és 3–6) történő felhalmozódásáról tanúskodik. Ugyanezen ábra jobb oldalán az oszlopdiaagram az említett speciesz, továbbá a BMP(42:10) mennyiségi analízisének eredményeit mutatja. Ahogyan korábban már említettük, az izomer BMP és PG specieszeket nem tudjuk felbontani a shotgun módszerrel, irodalmi adatok szerint azonban a sokszorososan telítetlen specieszösszetétel a lizoszómális markerlipid BMP-re jellemző (X. Wang és mtsai., 2019). Hangsúlyozni szeretnénk, hogy ezen lizoszómális lipidspecieszek megfigyelt topológiája nagyon jól korrelál a katepszin B hippokampális eloszlási mintázatával (**16E ábra**; a képet az Allen Mouse Brain Atlas-ból vettük át (*Allen Reference Atlases :: Atlas Viewer*, é. n.)). A katepszin B egy hatékony lizoszómális proteáz, amit nemrég racionális gyógyszertervezési célpontként írtak le számos neurológiai betegségben (Hook és mtsai., 2022). Végül szeretnénk megjegyezni, hogy az egymást követő párhuzamos metszetek eredményei kitűnő reprodukálhatóságról adtak számot, ahogyan ezt a **16B ábra** hőterképén vagy a **16D ábra** diagramjain láthatjuk; utóbbi esetben ráadásul ez olyan lipidspecieszekre igaz, amelyek mennyisége a membránlipidom 0,3 mol%-át sem éri el.

5.2. Lipidomikai vizsgálatok 4T1 *in vitro* és *in vivo* tumormodelleken

Az 5.1. fejezetben bemutatott módszervalidálási folyamattal párhuzamosan megkezdtük a módszer alkalmazhatóságának tesztelését *in vitro* és *in vivo* tumormodelleken. Mivel kutatócsoportunkban rutinszerűen korábban nem folyt szferoidformálás, illetve nem dolgoztunk *in vivo* tumorokkal, ezen modellek előállítására is külön tanulási folyamat volt számunkra. Számos előkísérletet végeztünk: szferoidok esetében kipróbáltunk például különböző sejtvonalakat mono- és ko-kultúrában, változtattuk a kiosztási sejtszámot és növesztési időt, de teszteltük – *in vitro* és *in vivo* mintákon egyaránt – a fagyasztási körülményeket, a metszetvastagságot és az LMD méretet is. Ezen kísérletek alapján döntöttünk arról, hogy további vizsgálatainkban a 4T1

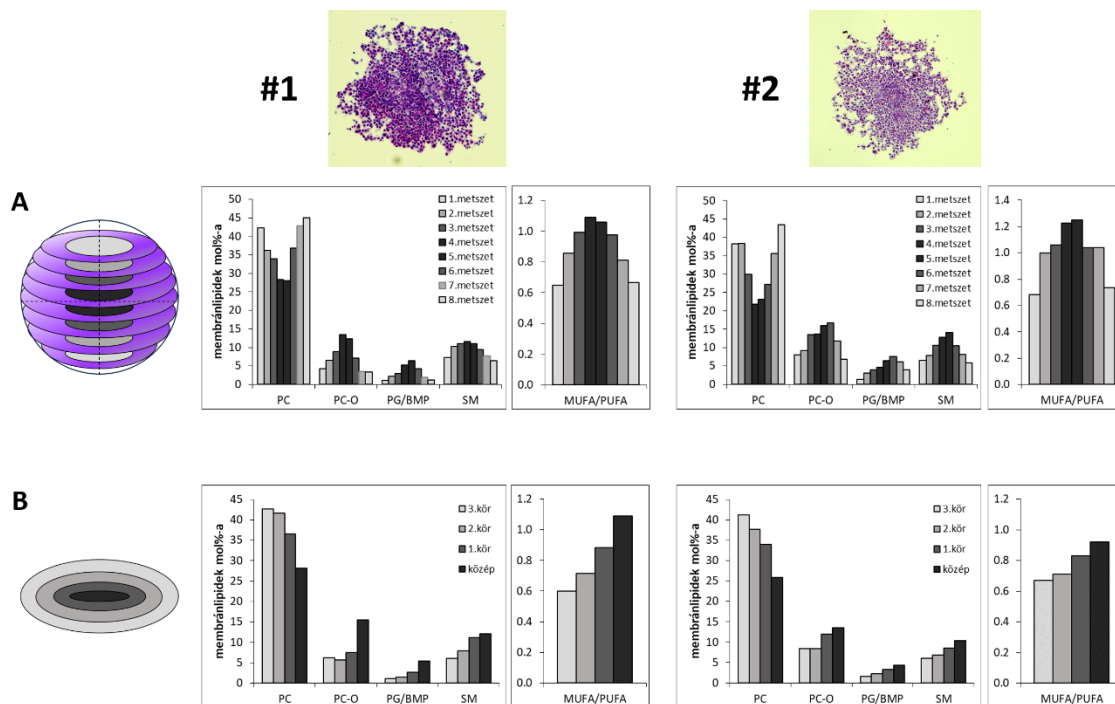
tripla-negatív, nagyon agresszív egéremlőtumor-sejtvonalat alkalmazunk, ami *in vitro* reprodukálható szferoidnövesztést, egérkísérletekben pedig rövid időn belül kifejlődő, jól vizsgálható tumorokat eredményez. Az alábbiakban szeretnénk bemutatni néhány eredményt a munkafolyamat „evolúciójának” érzékeltetésére, mert ezek a lépések vezettek az 5.3. fejezetben bemutatásra kerülő multiomikai kísérleti elrendezés kidolgozásához.

5.2.1. 4T1 szferoidok

A szferoidok esetében elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy ezek az *in vitro* 3D struktúrák mennyiben képesek modellezni az *in vivo* tumorokat. Feltételeztük, hogy az elegendően nagy szferoidméret ($d \sim 0,5$ mm) miatt már számolhatunk különböző, a szferoid széle és közepe között a lipidom szintjén kimutatható radiális gradiensekkel az eltérő tápanyag- és/vagy oxigénellátottság következtében.

Ennek a hipotézisnek a tesztelésére kétféle megközelítést is alkalmaztunk, amelyeket két reprezentatív szferoid példáján mutatunk be (**17. ábra**). Az első esetben az egyedi szferoidokból 15 μ m vastag metszeteket vágunk a szferoid teljes átmérője mentén, majd ezek közepéből 30 000 μ m² nagyságú köröket disszekáltunk (**17A ábra**). A lipidomikai analízis több lipidosztály (**17A ábra, lipidosztály panelek**), ill. számos lipidspeciesz esetében tárt fel jelentős változásokat a szferoid szélétől annak belseje felé haladva. A diacil PC relatív mennyisége jelentősen lecsökkent a szferoid közepe felé, ezzel párhuzamosan azonban az éter kötésű PC-O specieszek mennyisége megnőtt (**17A ábra, lipidosztály panelek**). Méréseink alapján elmondható, hogy a membránstabilizáló és raftalkotó SM szintje is radiális gradienst mutatott, és jelentősen emelkedett a szferoid magrégiójában. Ezen túlmenően figyelemre méltó növekedést láttunk kintről befelé haladva a PG/BMP esetében is.

Ismert, hogy az emlős sejtek nem képesek szintetizálni bizonyos politelítetlen lipidspecieszeket, PUFA igényüket így a tápoldatból kell fedezniük. Kimutattuk, hogy a polién lipidspecieszek mennyisége jelentősen csökkent a szferoid belseje felé haladva, míg a monoén specieszek mennyisége – amelyeket a sejt maga is képes szintetizálni – növekedett (**17A ábra, MUFA/PUFA panelek**). Megállapíthatjuk tehát, hogy a szferoidok jól képesek modellezni egy kisebb méretű, avaszkularizált tumor/mikrometasztázis korlátozott tápanyaghozzáférését.



17. ábra: 4T1 szferoidok (#1 és #2) lipidomjának gradiens típusú változásai. Szferoidok reprezentatív HE-festett képei (fent). Szeletelési és LMD séma (balra) és karakterisztikus lipidváltozások (jobbra) (A) a szferoid teljes átmérője mentén vágott szeletekből a középső körök kivágása esetén és (B) a legnagyobb rádiusz síkjában disszektált koncentrikus körök esetén. Szferoidformálás két független kísérletből; kiosztási sejtszám: 2500, növesztési idő: 14 nap, szferoidméret: kb. 500 μm , metszetvastagság: 15 μm , LMD méret: 30 000–60 000 μm^2 . PC és PC-O, diacil és alkil-acil foszfatidilkolin; PG, foszfatidilgliceril; BMP, bisz(monoacilgliceril)foszfát; SM, szfingomielin; MUFA, egyszeresen telítetlen zsírsav; PUFA, politeltetlen zsírsav.

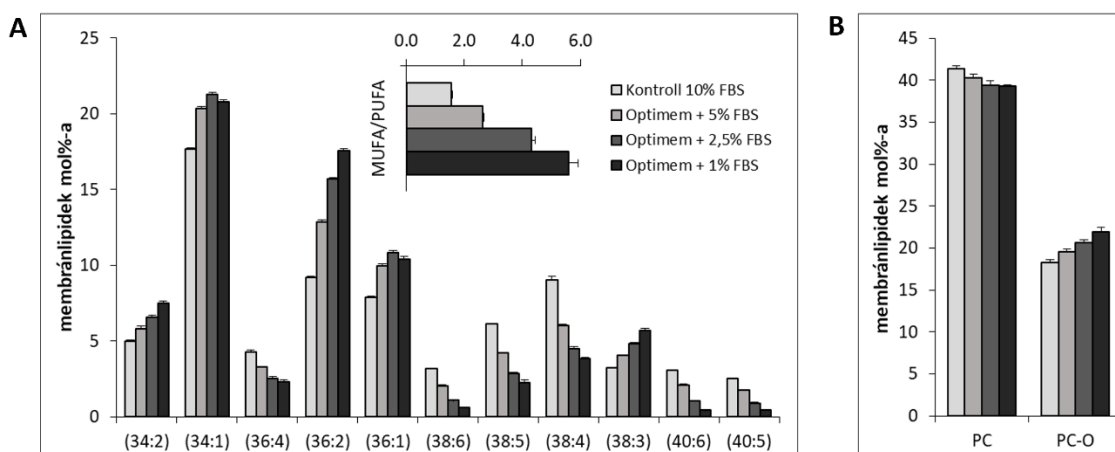
A **17B ábrán** a második kísérleti elrendezés látható, amelyben a legnagyobb rádiusszal rendelkező szferoidmetszetből koncentrikus köröket vágunk ki a szferoid belsejétől a széle felé haladva. Ezen minták lipidomikai analízise során is jól kimutathatóak voltak a fentebb leírt gradiensek.

5.2.2. 4T1 2D sejtkultúra a szferoid modellezésére

A 2D sejtkultúrák számos hátrányuk ellenére a mai napig elterjedtek tumormodellként könnyű kezelhetőségüknek és olcsóságuknak köszönhetően. A 3D kultúrákban jelentkező markáns, radiális lipidváltozások hátterének okát szeretnénk volna feltárni a 2D kultúrában előidézett zsírsavdeprivációval. Ehhez a sejteket lipidmentes, de növekedési faktorokat tartalmazó Optimem tápoldatban növesztettük, amit különböző mennyiségű szérummal egészítettünk ki (FBS 1%, 2,5% és 5%). A kontroll sejteket 10% szérummal szupplementált standard RPMI médiumban tartottuk.

A lipidomikai eredmények alapján ezzel a rendszerrel jól tudtuk modellezni a szferoidban kimutatott MUFA/PUFA gradienst (**18A ábra, inzert**), ami a

szérumkoncentráció csökkentése nyomán a polién lipidspecieszek (pl. (38:4, 18:0/20:4) vagy (40:6, 18:0/22:6)) relatív mennyiségében történő csökkenés és az ezzel párhuzamosan fellépő, a monoén lipidspecieszek (pl. (34:1, 16:0/18:1), (36:2, di18:1)) relatív mennyiségében bekövetkező növekedés következtében jött létre (**18A ábra**). Érdekes kiemelni a (38:3, 18:0/20:3) összetételű lipidspecieszek emelkedését, ami a PUFA-hiány kompenzálásaként fellépő Mead-sav szintézissel és beépüléssel magyarázható.



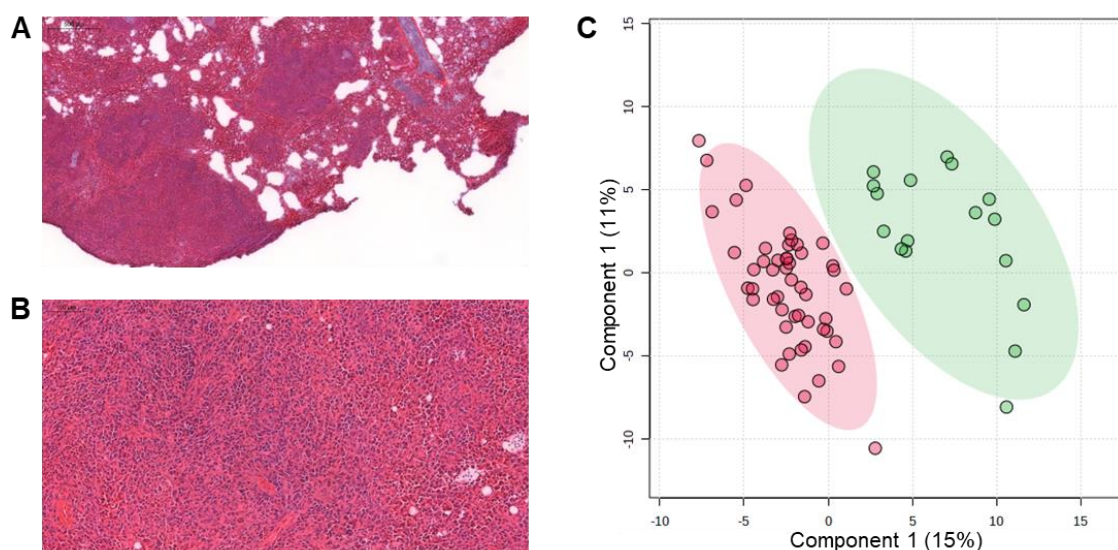
18. ábra: A szérummegvonás hatása 4T1 2D kultúra lipidösszetételére. (A) Átlagos foszfolipid specieszösszetétel, inzertben a MUFA/PUFA arány megjelenítésével. (B) PC és PC-O változásai a zsírsavdeprivációval. Az adatok átlag \pm SD értékeket reprezentálnak, $n = 3$. PC és PC-O, diacil és alkil-acil foszfatidilkolin; MUFA, egyszeresen telítetlen zsírsav; PUFA, politelítetlen zsírsav.

A szferoidnál bemutatott PC-O gradienst is sikerült modellezni, ugyan csak kisebb mértékű növekedést tapasztaltunk a zsírsavmegvonás növelésével (**18B ábra**). Érdekes azonban megjegyezni, hogy a proliferáló 2D sejt kultúrában a sejtek PC-O szintje eleve magasabb, mint a szferoid szélén proliferáló sejteké (18 vs. 5–7 mol%).

5.2.3. 4T1 tüdő és szubkután primer egértumorok

Az *in vivo* egértumormodellek előállításához 4T1 sejteket injektáltunk az egér farokvénájába (primer tüdő tumor, **19A ábra**), valamint az emlő zsírszövetébe (primer szubkután tumor, **19B ábra**). A lipidomikai analízishez a 10 μm vastag metszetekből 30 000 μm^2 -os területeket disszekáltunk. Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a primer tumorok lipidprofilja mennyiben tér el egymástól. A **19C ábrán** bemutatott részleges legkisebb négyzetek diszkriminancia-analízis (PLS-DA) „scores plot”-ján jól látható, hogy a tüdőben és az emlőszövetben kialakult primer tumorok (összesen 4 állatból, 2–2

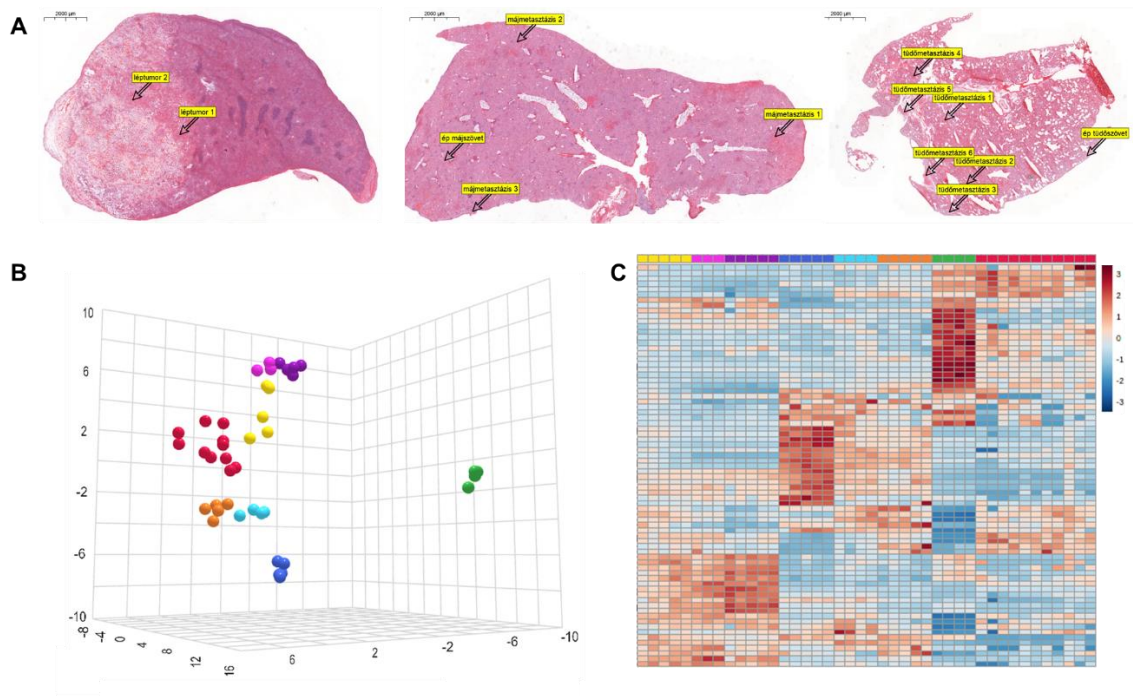
tumor) proliferatív régióiból kivágott LMD minták lipidomjai két egyértelműen elkülönülő klasztert alkotnak, vagyis lipidomjuk gazdaszerv-specifikus eltéréseket mutat.



19. ábra: 4T1 primer egértumorsek lipidomikája. (A) Intravénásan oltott 4T1 tüdőtümorek és (B) emlő zsírszövetébe oltott 4T1 szubkután tumor HE-festett képe. (C) PLS-DA "scores plot"; az oválisok a 95%-os konfidenciaintervallumot jelölik; validáló permutációs tesztben $p < 0,01$ ($n = 100$). Piros – tüdőtümorek ($n = 49$, 2 állatból), zöld – szubkután tumor ($n = 17$, 2 állatból).

5.2.4. Lépbe oltott 4T1 primer tumor metasztázisai a májban és a tüdőben

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy a primer tumor, valamint annak metasztázisai között van-e lipidomikai eltérés, vagyis, hogy a különböző célszervek tumor-mikrokörnyezetei befolyásolják-e a tumor lipidprofilját. Ehhez 4T1 sejteket oltottunk az egér lépébe. A primer tumor már 20 nap elteltével áttéteket adott a májba és a tüdőbe (**20A ábra**). Mindhárom szervből három darab, 10 μ m vastag párhuzamos metszetet készítettünk, és több különböző területet analizáltunk. A **20B és C ábrákon** a többváltozós statisztikai elemzések (főkomponens-analízis (PCA) és hierarchikus klaszteranalízis) eredményei jól mutatják, hogy a primer léptumor (piros), valamint a metasztázisok (máj: sötét- és világoskék, tüdő: sárga, narancs és lila) eltérő lipidprofillal rendelkeznek, sőt egy adott szervben belül is eltér a különböző tumoros területek lipidmintázata.

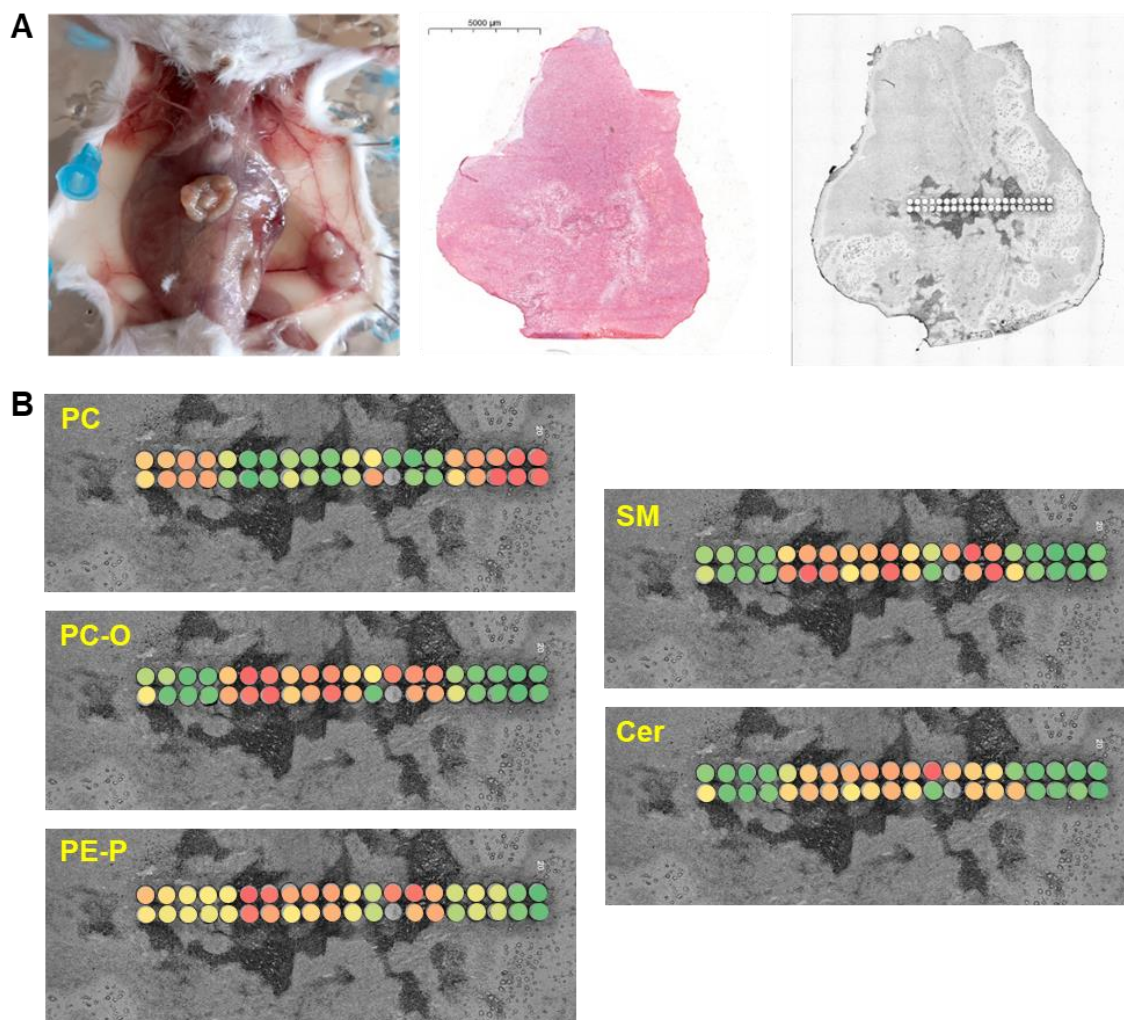


20. ábra: Egérlépbe oltott 4T1 primer tumor és metasztázisai. (A) HE-festett képek a disszekált területek jelölésével lépén (balra), májon (középen) és tüdön (jobbra). (B) PCA háromdimenziós „scores plot” és (C) hierarchikus klaszteranalízis hő térképes megjelenítése; távolságmérték: euklideszi, klaszteralgoritmus: Ward, a színek kód standardizált értékeket reprezentál (z-érték). A tumor régiók jelölései: piros – léptumor 1 és 2 (n = 11), zöld – ép májszövet (n = 4), sötétkék – májmetasztázis 1 (n = 5), világoskék – májmetasztázis 2 és 3 (n = 4), ciklámen – ép tüdőszövet (n = 3), sárga – tüdőmetasztázis 1, 2 és 3 (n = 5), lila – tüdőmetasztázis 4 (n = 5), narancs – tüdőmetasztázis 5 és 6 (n = 5).

5.2.5. 4T1 szubkután egértumor intratumorális heterogenitása

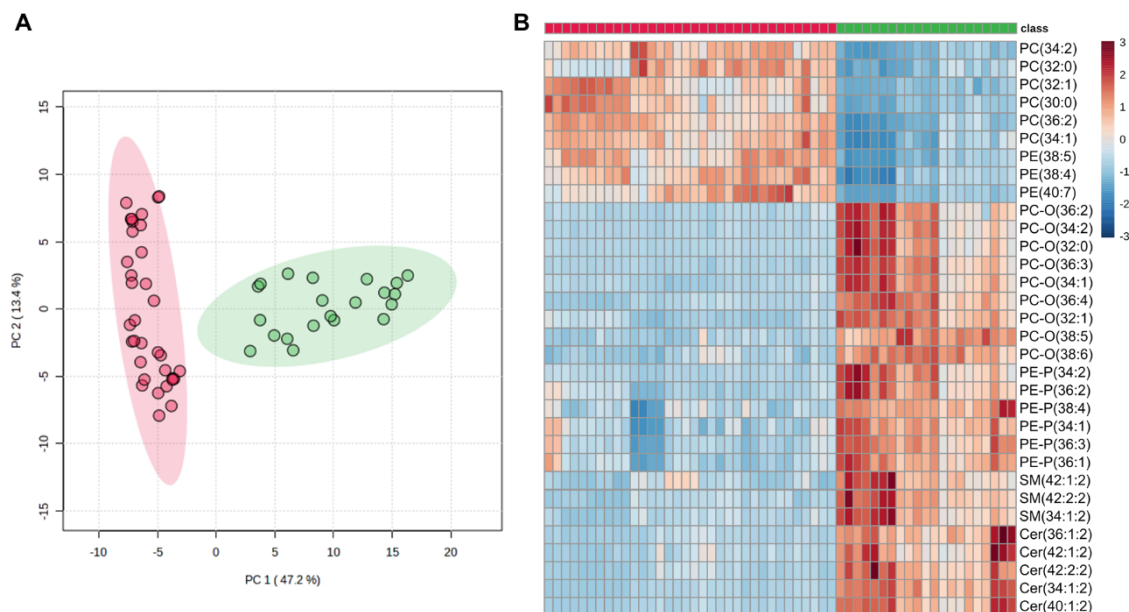
A lipidprofil-mintázatok fenti különbségei alapján a továbbiakban egy 22 napos szubkután tumor (**21A ábra, balra**) részletesebb topológiai elemzésére fókuszáltunk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a szferoidban kimutatott lipidomikai változások megjelennek-e egy *in vivo* tumorban. Ehhez a tumor olyan régióját választottuk ki, amelyben nekrotikus terület is található (**21A ábra, középen**), és egy 10 μm vastag metszetből 2 x 20 db, egymással párhuzamosan futó, 30 000 μm^2 -os LMD mintát vágunk ki (**21A ábra, jobbra**). A lipidomikai eredményeket a metszetképre vetített hő térképes megjelenítéssel mutatjuk be (**21B ábra**). A szferoidhoz hasonlóan a PC és a PC-O változásai egymással komplementer mintázatot mutatnak, vagyis ahol a PC relatív mennyisége alacsonyabb, ott a PC-O magasabb, és fordítva (**21B ábra**). Elmondható továbbá az is, hogy a szferoidoknál megfigyelt lipidváltozásokkal összhangban a magasabb PC-O tartalmú területek a nekrotikus (szferoid magjához hasonló), míg az alacsonyabbak a proliferatív (szferoid proliferatív külső rétegéhez hasonló) régiókra esnek. Az SM változásai szorosan követik a PC-O-ban detektált mintázatot, ami szintén

egy, a szferoidokban is megfigyelt jellemző. Megjegyezzük továbbá, hogy a tumorban a Cer és a PE-P szintértéke is hasonló a PC-O mintázatához (**21B ábra**).



21. ábra: 4T1 szubkután tumorallograft intratumorális heterogenitása. (A) Az egéremlő zsírszövetébe oltott szubkután tumor fényképe (balra), HE-festett metszet (középen) és LMD utáni állapot világos látóterű képen (jobbra). (B) Kiválasztott lipidosztályok topológiája hő térképes megjelenítésben; a színskála színei a feltüntetett lipidosztályok mol%-os értékeit reprezentálják a membránlipidek %-ában. Színskála: zöld – alacsony, piros – magas. Cer, ceramid; PC és PC-O, diacil és alkil-acil foszfatidilkolin; PE-P, alkenil-acil foszfatidiletanolamin; SM, szfingomielin.

Ezek után azt szeretnénk volna látni, hogy ez a markáns intratumorális heterogenitás vajon felülírja-e az egyedek közötti intertumorális heterogenitást. A **22A és B ábrákon** három különböző állatból származó szubkután tumor LMD mintáiból készült többváltozós statisztikai elemzések eredményeit tüntettük fel, amelyek a proliferatív és nekrotikus tumor régiók lipidomjainak egyértelmű elkülönüléséről tanúskodnak. Az előbbi megállapításokkal összhangban a nekrotikus régiókban PC-O, PE-P, SM és Cer halmozódott fel a proliferatív területekhez képest (**22B ábra**).

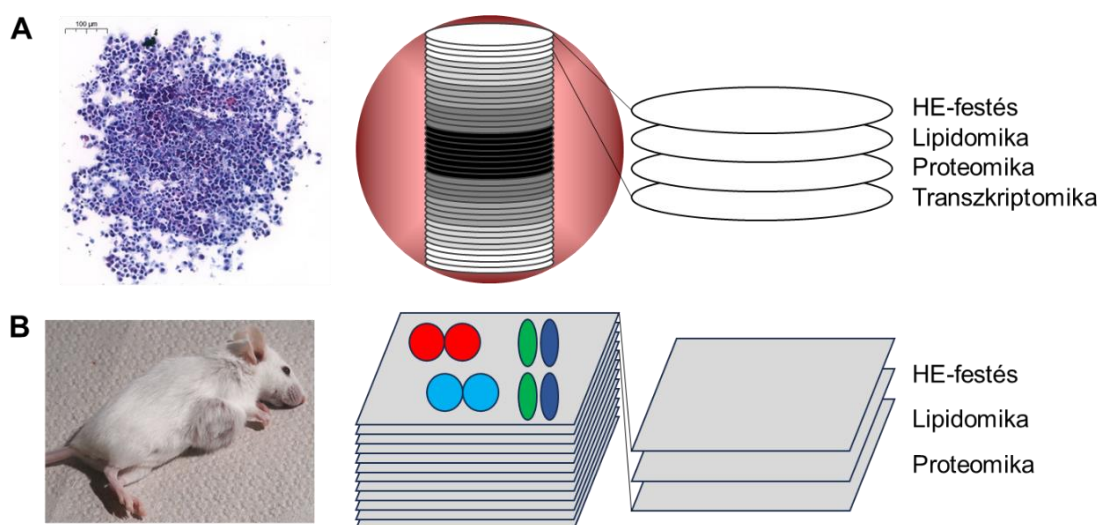


22. ábra: 4T1 szubkután tumorallograftok proliferatív és nekrotikus régióinak lipidomikai mintázata. (A) PCA „scores plot”; az oválisok a 95%-os konfidenciaintervallumot jelölik. (B) hierarchikus klaszteranalízis hő térképes megjelenítése. Színek: piros – proliferatív régió (n = 34, összesen 3 állatból), zöld – nekrotikus terület (n = 21, összesen 3 állatból).

5.3. 4T1 tumormodellek nagy térbeli felbontású multiomikai vizsgálata

5.3.1. Multiomikai kísérleti elrendezés áttekintése

A fenti kísérletek során kiderült, hogy párhuzamos metszetekből nagy lefedettségű és kiváló minőségű proteomikai analízis is végezhető. Ezért egy új kísérletsorozatban, a **23. ábrán** felvázolt séma szerint készítettük el az *in vitro* és *in vivo* 4T1 mintákat multiomikai feldolgozáshoz.



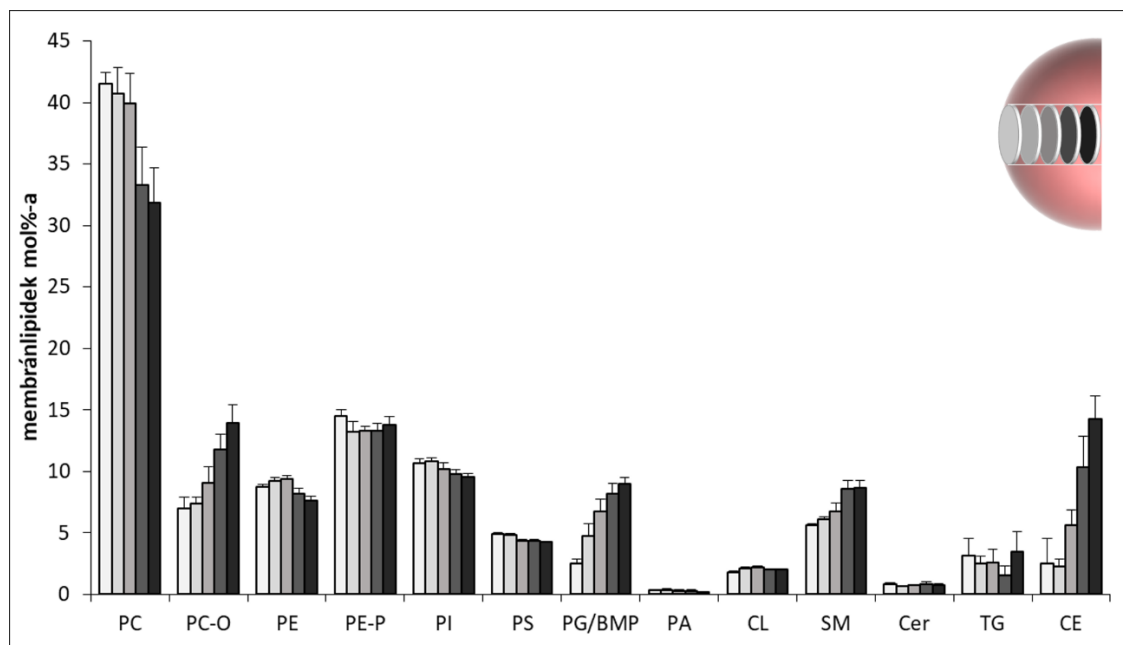
23. ábra: Multiomikai kísérleti elrendezés. Tumormodell reprezentatív képe (balra) és az omikai mintakészítés sematikus ábrázolása (jobbra). Metszetvastagság: 10 µm, metszettávolság: 10 µm. (A) 4T1 szferoid (3 szferoid, ~ 500 µm, 7-10 metszet/omika, LMD méret: 30 000 µm²,

középső körök). (B) 4T1 szubkután tumor (~ 15 mm, 3 metszet/omika, LMD méret: 30 000 μm^2 , 4 különböző tumorrégióból 2 LMD/tumorrégió/metszet).

5.3.2. 4T1 szferoid

5.3.2.1. A szferoidok lipidomikája

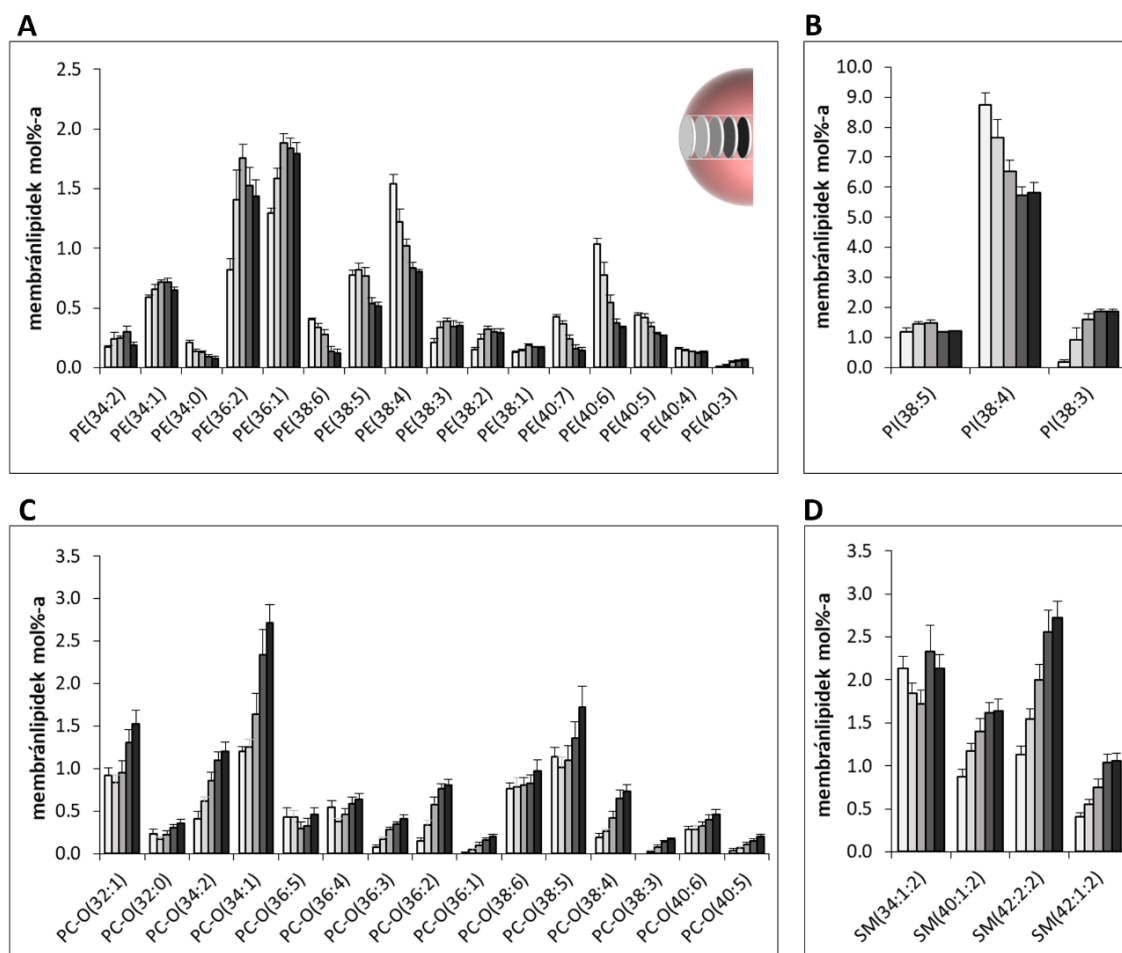
Három független szferoid lipidadataiból (összesen 30 metszet) a szélétől a közepe felé haladva szimmetrikusan átlagokat képeztünk (összesen 5 távolság, $n = 6/\text{távolság}$). Az így detektált lipidgradiensek nagyon jól egybecsengtek az 5.2.1. fejezetben bemutatott előzetes eredményeinkkel. A lipidosztályok változásai között (24. ábra) továbbra is a PC, PC-O, SM, ill. a PG/BMP gradiensei a legjellemzőbbek, de meg kell említeni a koleszteril-észter (CE) emelkedését is a szferoid magjában.



24. ábra: 4T1 szferoidok lipidosztály-összetétele a szferoid szélétől a belseje felé haladva. Szferoidonként a 10 metszetet a középponti távolságuk szerint páronként átlagoltuk; ilyen módon a szélétől (fehér) a közepe (fekete) felé haladva a diagram oszlopai 5 egymást követő távolságértéket reprezentálnak. Az ábrán átlag \pm SEM adatokat tüntettünk fel; $n = 6$, összesen 3 független szferoidból.

Annak szemléltetésére, hogy a MUFA/PUFA gradiens hogyan jön létre, két kismértékben változó lipidosztály, a PE és a PI molekulaszpeciezeit mutatjuk be (25A és B ábra). A PE esetén nagyon szembetűnő az AA-tartalmú PE(38:4, 18:0/20:4), valamint a DHA-tartalmú PE(38:6, 16:0/22:6), PE(40:6, 18:0/22:6) és PE(40:7, 18:1/22:6) specieszek csökkenése, illetve a monoéntartalmú PE(36:2, di18:1) és PE(36:1, 18:0/18:1) specieszek növekedése (25A ábra). A PI esetén a fő AA-tartalmú speciesz, a PI(38:4, 18:0/20:4) fogyását a Mead-savat (20:3 n-9) tartalmazó PI(38:3, 18:0/20:3)

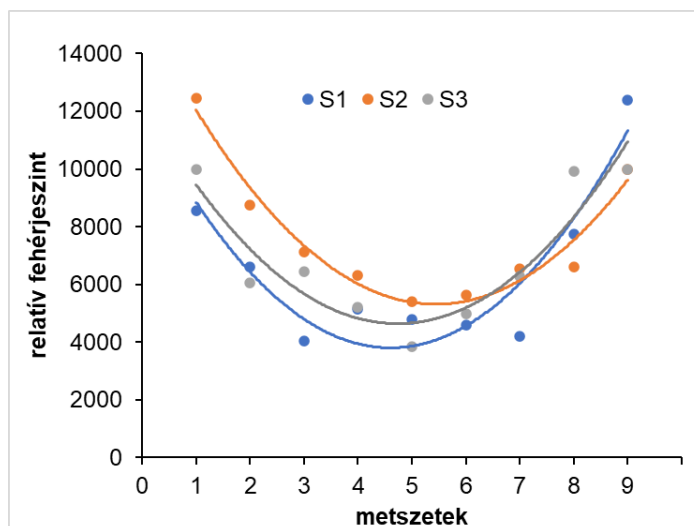
növekedése kompenzálja (**25B ábra**) (Péter és mtsai., 2012). A PC-O osztályszintű emelkedése minden egyedi specieszre kiterjed, és bár az abszolút értelemben vett emelkedés a legabundánsabb monoén komponens, a PC-O(34:1) esetében a legnagyobb (szélen 1,2 mol%, közepén 2,6 mol%), a globális PUFA-csökkenés itt felülíródik, és ezek a specieszek is növekednek (pl. PC-O(38:4)), vagyis a meglévő PUFA-k erre a szintézisútra irányítódnak. Az SM esetében detektált jelentős emelkedés a szferoid centrumában a hosszú szénláncú specieszeknek (pl. SM(42:2:2, d18:1/24:1) köszönhető (**25D ábra**).



25. ábra: Kiválasztott specieszek relatív koncentrációjának változása a szferoid szélétől a belseje felé haladva. (A) PE, (B) PI, (C) PC-O és (D) SM specieszek profilváltozása. Szferoidonként a 10 metszetet a középponti távolságuk szerint páronként átlagoltuk; ilyen módon a szélétől (fehér) a közepe (fekete) felé haladva a diagram oszlopai 5 egymást követő távolságértéket reprezentálnak. Az ábrán átlag \pm SEM adatokat tüntettünk fel; $n = 6$, összesen 3 független szferoidból. PE, foszfatidiletanolamin; PI, foszfatidilinozitol; PC-O, alkil foszfatidilkolin; SM, szfingomielin.

5.3.2.2. A szferoidok proteomikája

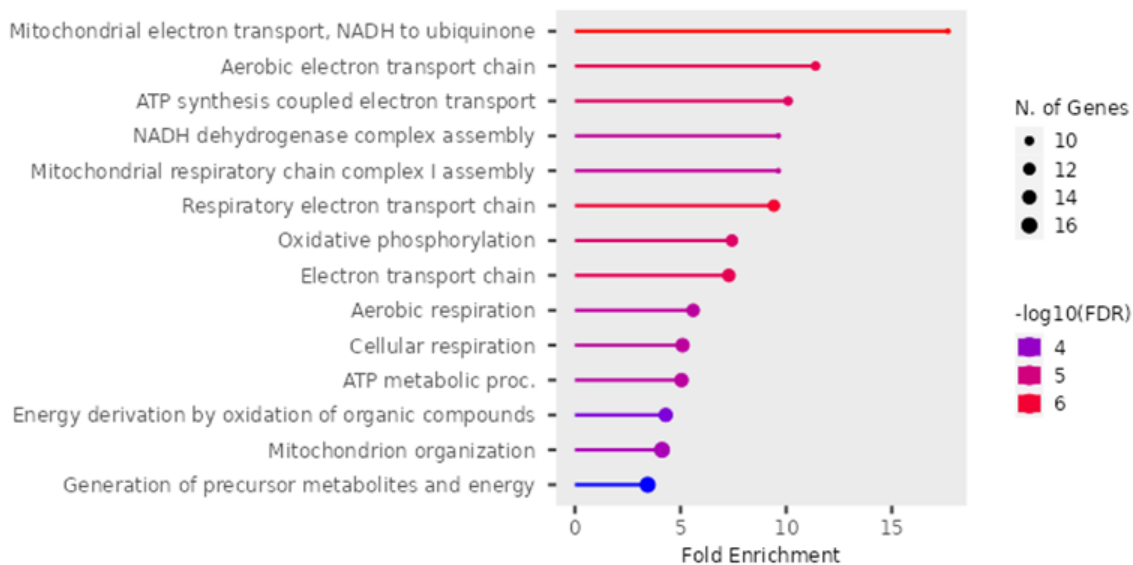
A három szferoid metszeteiből több mint 2000, mindhárom szferoidban detektált fehérje mennyiségét tudtuk mérni. Számos fehérje mutatott a lipidekhez hasonló, gradiens típusú viselkedést a szferoid centruma és széle között. Példaként a vimentin fehérje változását mutatjuk be (26. ábra).



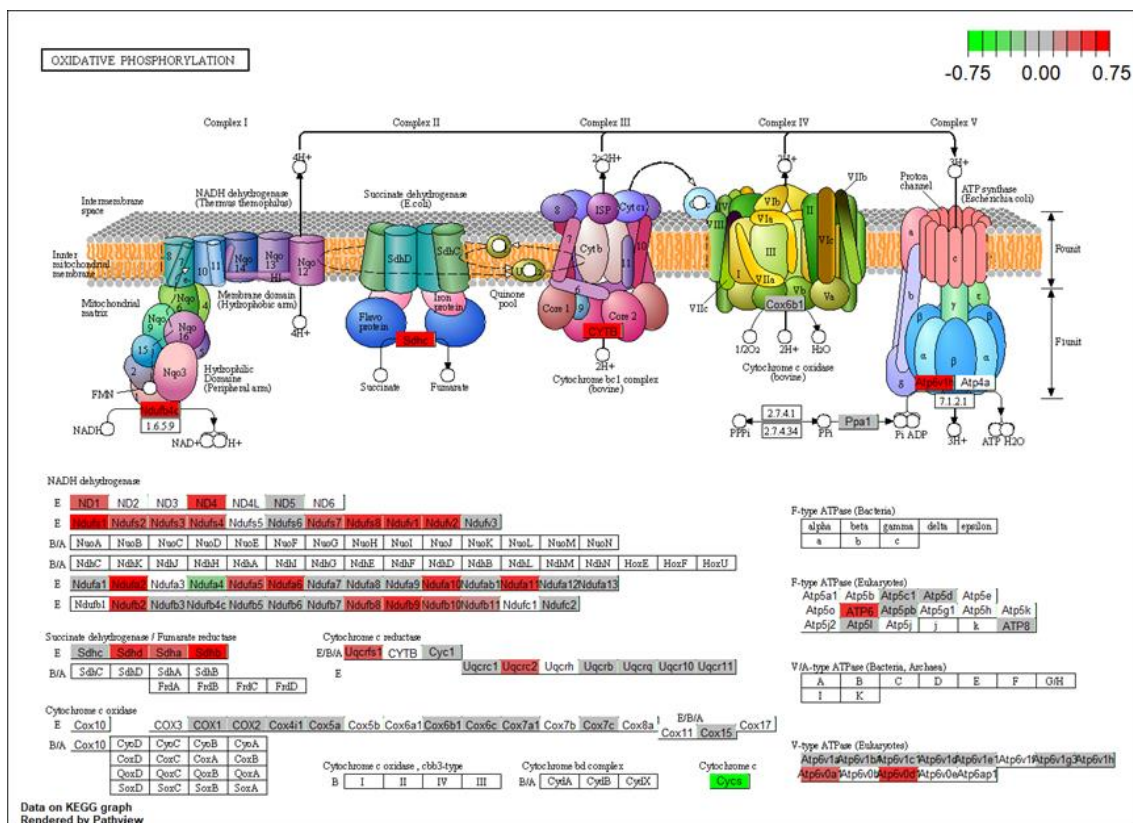
26. ábra: A vimentin fehérje mennyiségének változása a szferoid tengelye mentén. S1, S2, S3 az egyedi szferoidokat reprezentálja.

A további elemzésekhez a vimentin és a fibronectin görbéi alapján meghatároztuk a szferoid közepét, majd – a metszetszám függvényében – a szferoidok széleiről $n = 1-2$, a közepeikről pedig $n = 2-3$ adatot átlagoltunk. Így a három szferoidból 1 db széli és 1 db középi adatot kaptunk, amelyekből t -próbával a $p < 0,01$ és az ehhez tartozó $q < 0,05$ FDR-értékeket fogadtuk el szignifikánsnak. A \log_2 -fold küszöb $\text{abs}(\log_2\text{-fold}) \geq 0,3$ volt. A GO-kategóriaelemzés esetén külön kezeltük az emelkedést és a csökkenést mutató fehérjéket. A KEGG-útvonalelemzések ábrázolásához a \log_2 -fold változást 0-nak vettük azokra az értékekre, amelyek nem feleltek meg mindkét kritériumnak, ezek szürke színnel jelennek meg a következő ábrákon.

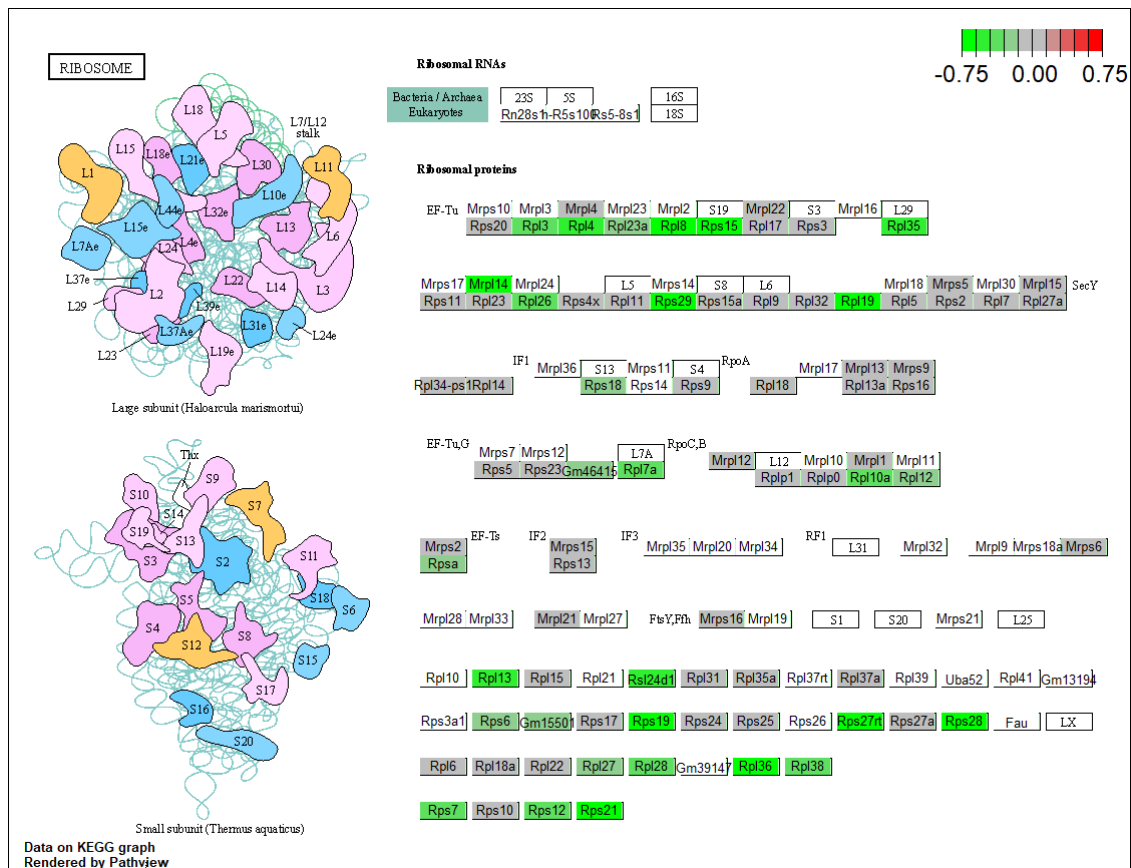
A szferoid centrumában – a széléhez képest – felülszabályozott fehérjék GO-kategória gazdagodását vizsgálva feltűnő, hogy a mitokondriális energetikai folyamatokban résztvevő fehérjék szintje emelkedett (27. ábra). A mitokondriális energetika KEGG-reprezentációjából az oxidatív foszforilációt (28. ábra) és a citrátciklust (29. ábra) mutatjuk be. Úgy tűnik, hogy a szferoid belsejében fokozódik a mitokondriális aktivitás a citrátciklus és az elektrontranszportlánc komponenseinek dúsulása által.



27. ábra: A szferoid centrumában megnövekedett fehérjék GO-kategória gazdagodásának reprezentációja a szferoid széléhez képest



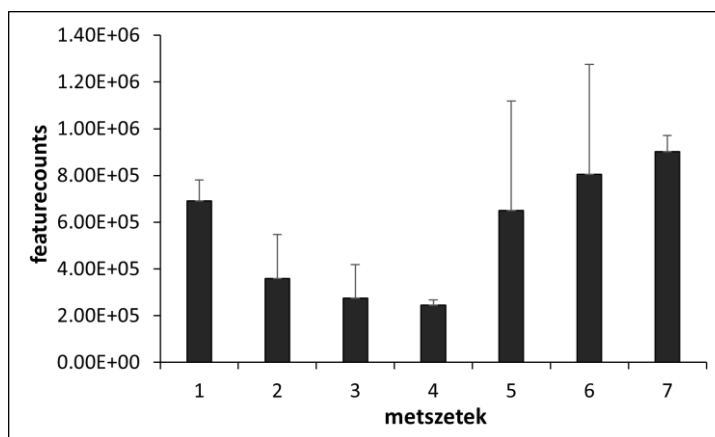
28. ábra: Az oxidatív foszforilációban érintett fehérjék szintjének változása a szferoid centrumában a széléhez képest (KEGG). Színskála: piros – emelkedés, zöld – csökkenés.



31. ábra: A riboszóma formálódásában résztvevő fehérjék szintjének alulszabályozottsága a szferoid centrumában a széléhez képest (KEGG). Színskála: piros – emelkedés, zöld – csökkenés.

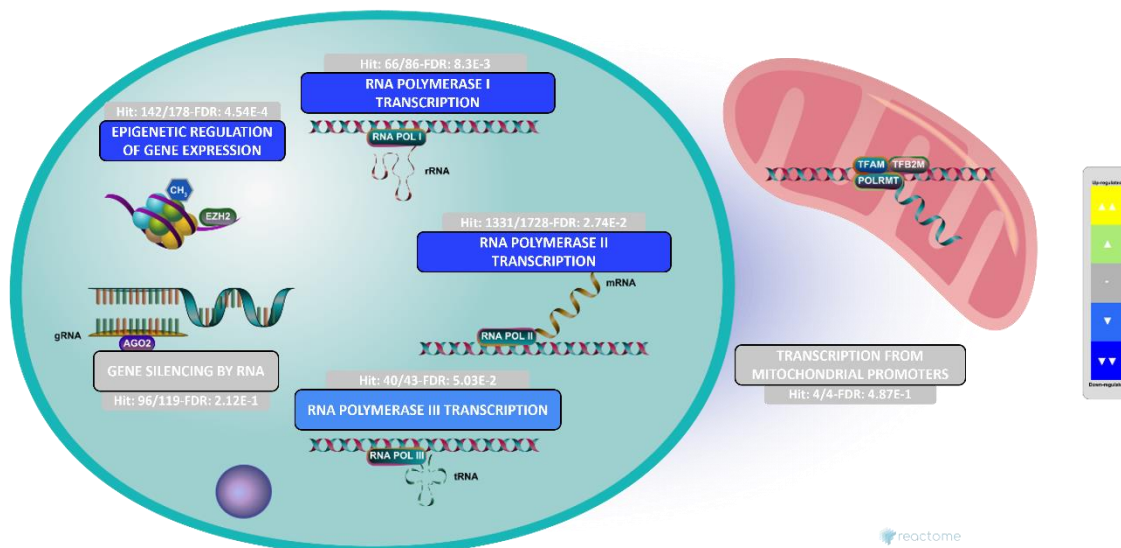
5.3.2.3. A szferoidok transzkriptomikája

A transzkriptomikai adatok elemzése során elsőként megvizsgáltuk az összes leolvasás eloszlását a szferoidok metszetei között (**32. ábra**). Ebből látható, hogy a szferoid közepén (metszetszám: 3 és 4) a totál RNS-mennyiség átlagosan alacsonyabb a széli értékeknél (metszetszám: 1 és 7).



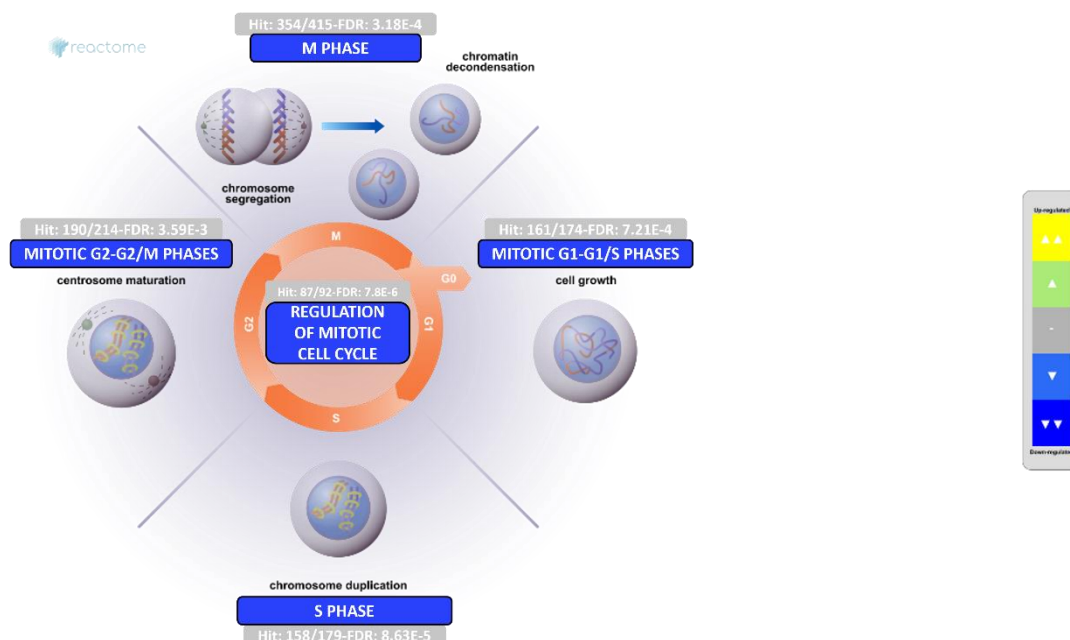
32. ábra: RNaseq adatok totál „featurecount” értékei. Az adatok metszetenként 2–3 szferoid átlag ± SD értékeit reprezentálják.

Az adatokat a háztartási gének geometriai átlagával előnormalizáltuk, majd a Reactome honlap analíziseszközével elemeztük. Elsőként kiemelnénk, hogy a génexpresszió szabályozása RNS-szinten is lehalkult (33. *ábra*).



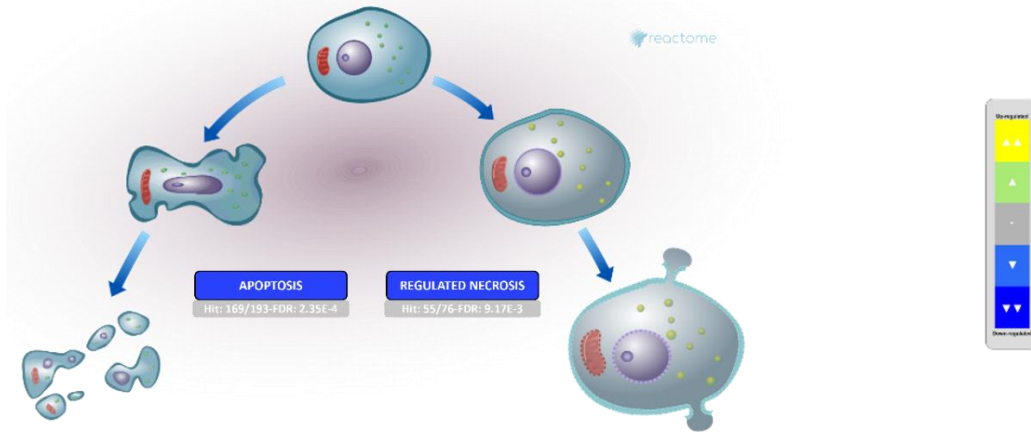
33. *ábra*: A transzkripció alulszabályozottsága a szferoid belsejében a széléhez képest (Reactome). Színskála: sárga – emelkedés, kék – csökkenés.

Az is fontos megállapítás, hogy az RNS-adatok alapján a sejtek osztódása a szferoid magjában rendkívül lelassult (34. *ábra*).



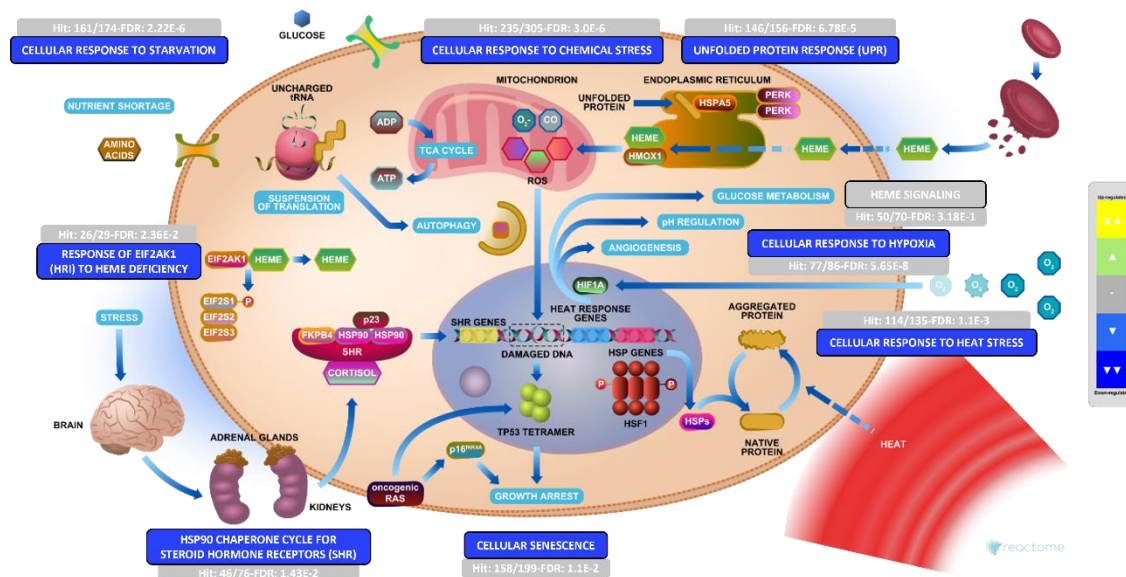
34. *ábra*: A szferoid centrumában elhelyezkedő sejtek mitotikus sejtosztódással kapcsolatos RNS expressziós mintázata a szferoid széléhez képest (Reactome). Színskála: sárga – emelkedés, kék – csökkenés.

Felmerül a kérdés, hogy a szferoid magjában – legalábbis lipidszinten – jelenlévő tápanyaghiány és az esetleges oxigénhiány vajon indukál-e sejthalál útvonalakat. A válasz meglepő: mind az apoptotikus, mind a szabályozott nekrotikus folyamatok lecsendesedtek a nyugalmi állapotba került centrális régióban (35. ábra).



35. ábra: Apoptotikus és szabályozott nekrotikus folyamatok génexpressziós mintázata a szferoid magjában a széléhez képest (Reactome). Színskála: sárga – emelkedés, kék – csökkenés.

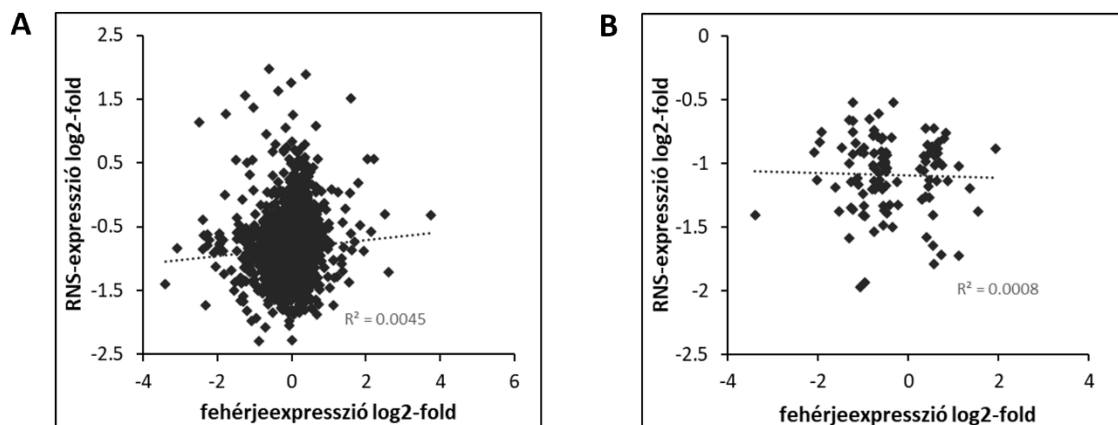
A következő kérdés, hogy vajon ezt az antiapoptotikus hatást a stresszfehérje rendszer felhangolásával érik-e el a centrálisan elhelyezkedő sejtek? A válasz ugyancsak meglepő, ugyanis általánosságban azt mondhatjuk, hogy a sejteknek nincs szüksége felerősített stresszválaszra, a főbb elemek mindegyike inkább lecsendesített állapotba került (36. ábra). Például az éhezésre, a kémiai stresszorokra, a hipoxiára és a hőstresszel analóg membránperturbációs stresszre adott válaszok lehalkultak, és a sejttöregedés szintén alulszabályozott.



36. ábra: A szferoid centrumában elhelyezkedő sejtek stresszválasszal kapcsolatos RNS-expressziós mintázata a szferoid széléhez képest (Reactome). Színskála: sárga – emelkedés, kék – csökkenés.

5.3.2.4. A szferoidok omikai mintázatainak összefüggései

A **37. ábra** az RNaseq és a proteomikai adatok közötti összefüggést mutatja be, pontosabban éppen azt, hogy ezen adatok között egyáltalán nincs korreláció (**37A ábra**, $r = 0,067$). Feltételeztük, hogy ennek oka a sok nem-szignifikánsan változó fehérje- és RNS-adat által generált szórás lehet, ezért kiválasztottuk a szignifikánsan változó fehérjékhez tartozó RNS-ek log2-fold értékeit, és azokat a **37B ábrán** ábrázoltuk. Látható, hogy ebben az esetben sem találtunk korrelációt ($r = 0,028$) a két adatsor között. Ez a megállapítás egybecseng irodalmi adatokkal, ahol sok esetben szintén rendkívül gyenge korrelációt találtak az RNS- és fehérjeexpresszió között (Koussounadis és mtsai., 2015).

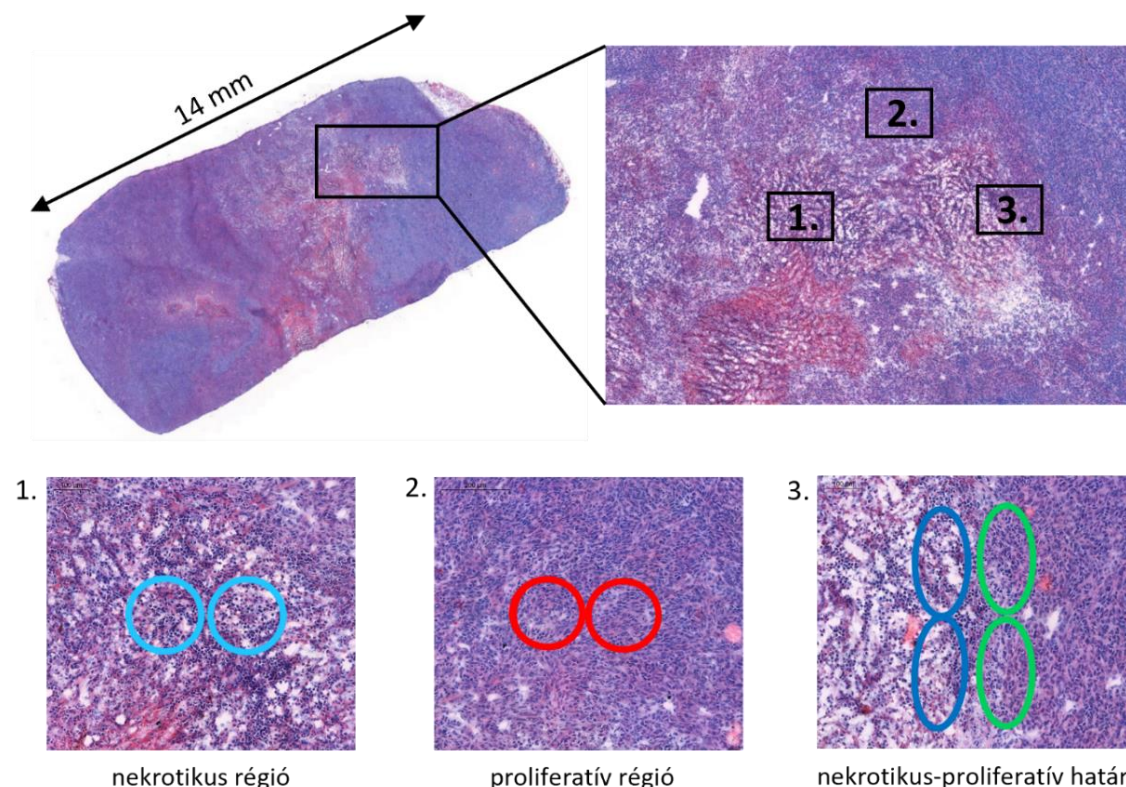


37. ábra: Korreláció a fehérje- és RNS-expresszió között 4T1 szferoidban. Korrelációs diagram (A) az összes fehérjeadathoz tartozó RNS-adat és (B) a szignifikánsan változó fehérjékhez tartozó RNS-adatok log2-fold értékei alapján.

5.3.3. 4T1 szubkután tumor

A szubkután tumorok 5.2.5. fejezetben bemutatott lipidomikai analízise során a proliferatív és nekrotikus területek között jelentős lipidváltozásokat detektáltunk. Ennek részletesebb feltérképezése érdekében jelen kísérlet során úgy vágtuk ki a régiókat, hogy a tisztán proliferatív és tisztán nekrotikus területek mellett a proliferatív-nekrotikus határ mindkét oldaláról gyűjtöttünk mintákat (**38. ábra**). A patológiai elemzés egyértelműen rávilágított arra, hogy ezeket a területeket tisztán tumorsejtek alkotják, a sztrómális komponensek hiányoznak. A nekrotikus régióban teljesen ép, szigetszerűen elhelyezkedő sejteket találunk, és a vér alakos elemei sem jelennek meg. A patológiai vizsgálat során bizonyítást nyert az is, hogy a proliferatív, valamint a határ menti proliferatív régiók nem különböznek jelentősen egymástól, mint ahogyan a tisztán nekrotikus és a határ menti

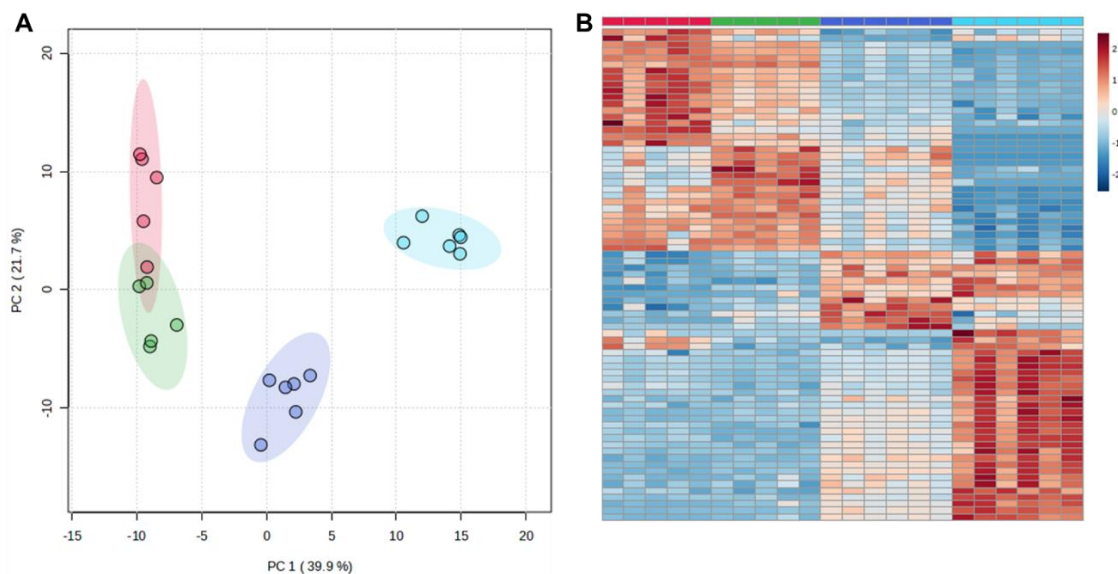
nekrotikus régiók sem. Ugyanakkor a proliferatív és a nekrotikus területek éles határvonal mentén különülnek el egymástól (38. ábra).



38. ábra: A kivágandó területek elhelyezkedése a különböző tumorrégiókban. 4T1 szubkután tumormetszet teljes HE-festett képe (fent, balra), a kivágandó területeket tartalmazó, hisztológiailag különböző régiók elhelyezkedése (fent, jobbra), valamint ezen régiókban az LMD területek kijelölése (lent).

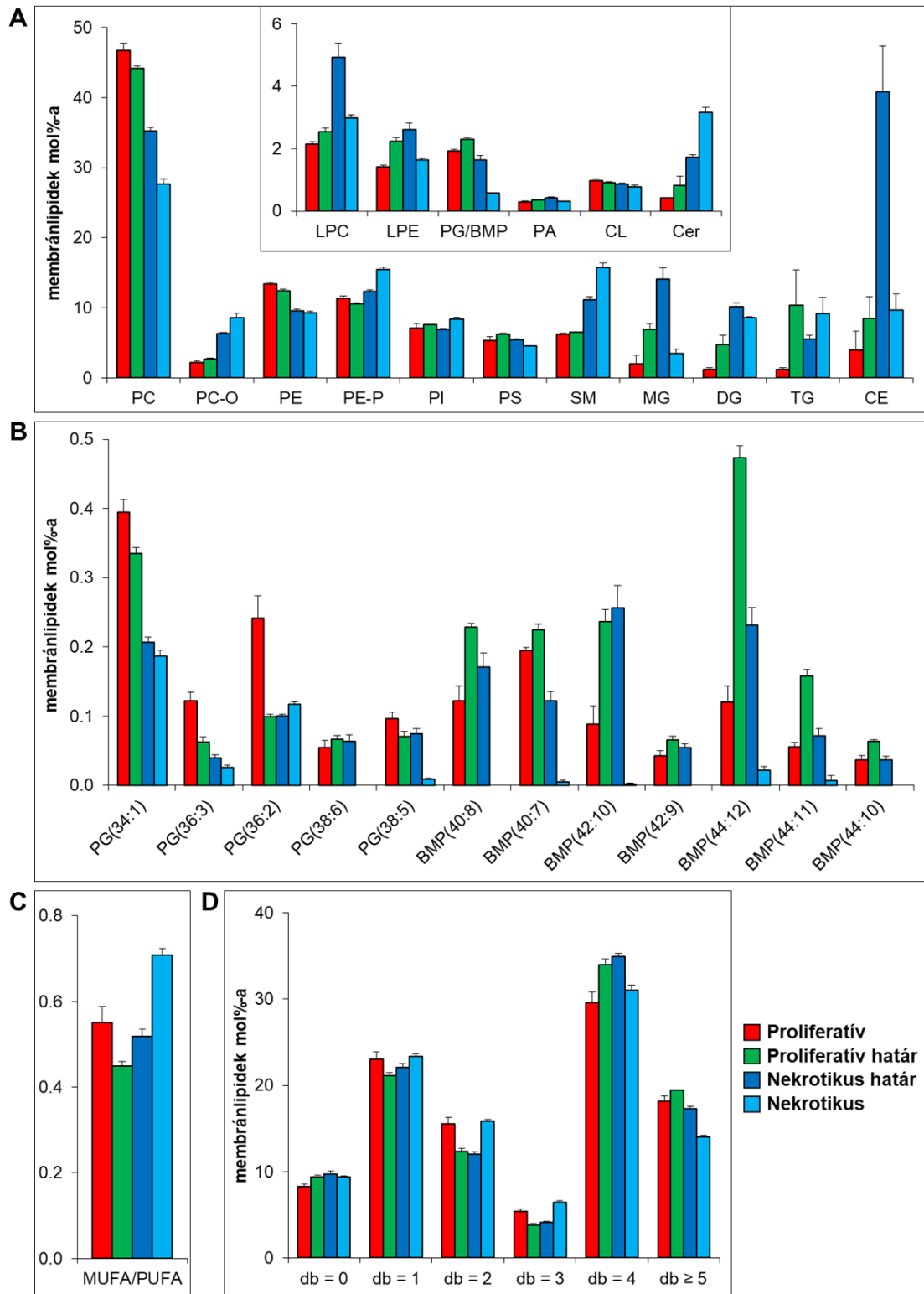
5.3.3.1. A szubkután tumor lipidomikája

A fentiek alapján felmerül, hogy a határon elhelyezkedő sejteket mindkét irányból érik hatások, így különleges (lipid)metabolikus helyzetben vannak. Valóban, a 39. ábrán bemutatott PCA és klaszteranalízis is igazolja az elkülönülő határ menti lipidprofilokat, és rámutat az ezzel kapcsolatos membránszerkezeti különbségekre. Nem meglepő, hogy a proliferatív határ lipidomja közelebb áll a tumor nagy tömegét kitevő sejtekéhez, míg az egy-két sejtsor távolságra levő nekrotikus határ – a morfológiai különbségekkel egybehangzóan – jelentősen eltérő lipidprofilot mutat. Felfedezhető továbbá a nekrotikus határ és a nekrotikus terület lipidmintázatbeli hasonlósága, valamint a nekrotikus területek egyedi lipidmintázata is (39. ábra).



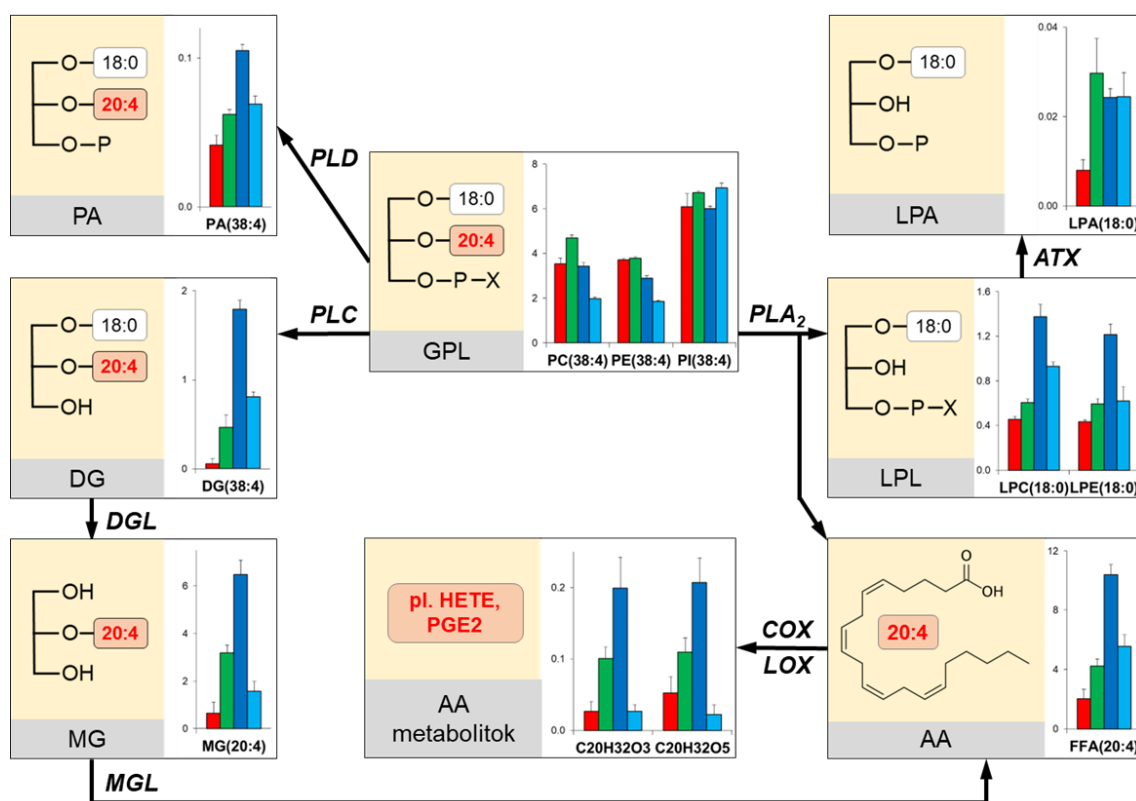
39. ábra: 4T1 szubkután tumorrégiók lipidomjának többváltozós statisztikai analízise. (A) PCA „scores plot”; az oválisok a 95%-os konfidenciaintervallumot jelölik. **(B)** Hierarchikus klaszteranalízis hő térképes megjelenítése. Piros – proliferatív régió, zöld – proliferatív határ, sötétkék – nekrotikus határ, világoskék – nekrotikus régió (n = 5–6, 3 párhuzamos tumormetszetből).

A részletes lipidváltozásokról a **40. és 41. ábra** ad számot. A proliferatív régiótól a nekrotikus felé haladva a PC csökkenését és ezzel párhuzamosan a PC-O növekedését látjuk (**40A ábra**). Ehhez hasonlóan a PE és a PE-P is komplementer viselkedést mutatott. Az SM és a Cer jelentősen nőtt a nekrotikus irányban (**40A ábra és inzert**). A lizolipidek (LPC, LPE) szintje a nekrotikus határon volt a legmagasabb, és ez szintén igaz az MG, DG és CE lipidosztályokra is (**40A ábra és inzert**). A PG/BMP specieszei szembetűnő profilkülönbséget mutattak a telítetlenség függvényében (**40B ábra**). Az $n \leq 6$ kettős kötést tartalmazó – valószínűsíthetően inkább PG – specieszek (pl. (34:1)) relatív értékei a proliferatív régióban a legmagasabbak, míg a sokszorosan telítetlen ($n \geq 7$) – valószínűleg BMP – specieszek (pl. (44:12)) jelentősen feldúsultak a határregiókban, különösen a proliferatív oldalon (**40B ábra**). A teljes membránlipid-összetétel szintjén detektálható MUFA/PUFA arány – a szferoidhoz hasonlóan – itt is növekedést mutatott a nekrotikus régióban a proliferatívhoz képest (**40C ábra**). A szabályozás azonban a tumorban bonyolultabbnak tűnik, mert például az elsősorban AA-tartalmú specieszek (**40D ábra**, db = 4) összes mennyisége nem változott szignifikánsan, emögött azonban a diacil PC(38:4) és PE(38:4) csökkenését, a PI(38:4) változatlanságát, valamint az éterspecieszek (PC-O(38:4) vagy PE-P(38:4)) relatív szintjének növekedését találjuk (**41. ábra és S8. táblázat**). Ugyanakkor a Mead-savat tartalmazó db = 3 specieszek szignifikáns növekedése és a db ≥ 5 politelítetlen specieszek markáns csökkenése mégiscsak korlátozott tápanyag-hozzáférhetőségről tanúskodik (**40D ábra**).



40. ábra: 4T1 szubkután tumorrégiók lipidváltozásai. (A) Lipidosztály-összetétel, (B) PG/BMP specieszek változásai, (C) MUFA/PUFA arány és (D) a membránlipidek profilja a kettős kötések száma szerint. Az adatok átlag ± SEM értékeket jelölnek ($n = 5-6$, 3 párhuzamos tumormetszetből). MUFA, egyszeresen telítetlen zsírsav; PUFA, politelítetlen zsírsav; db, kettős kötések száma.

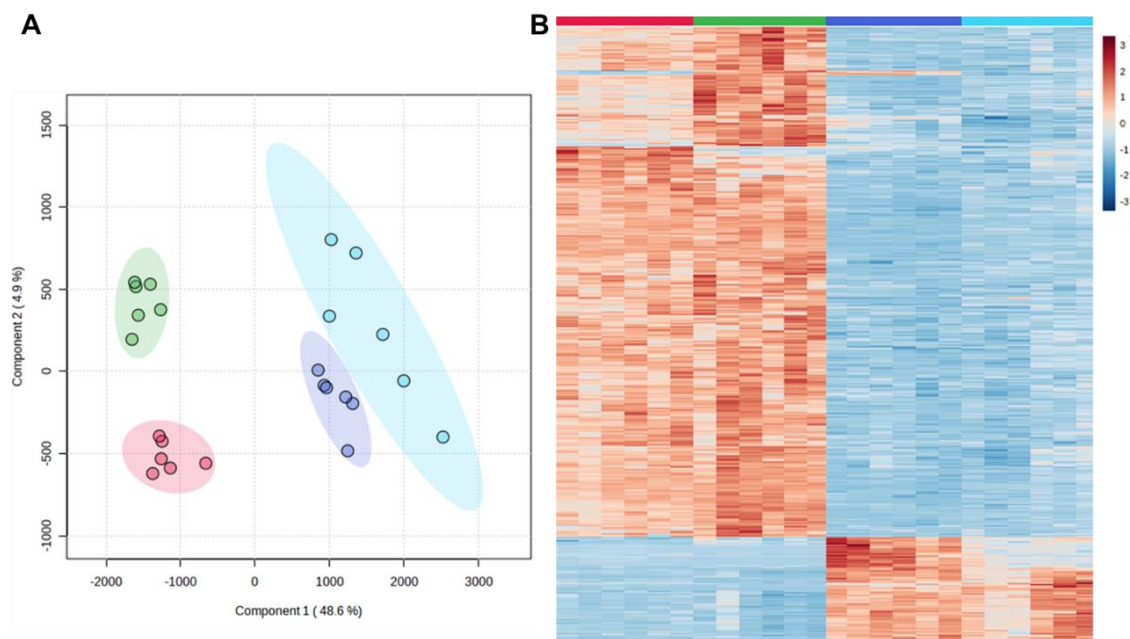
A 41. ábrán az AA-jelátvitel komponenseinek változásait mutatjuk be a fő diacil GPL(38:4, 18:0/20:4) specieszek (PC(38:4), PE(38:4) és PI(38:4)) példáján. A különböző lipázok által termelt szignállipidek, mint a PA(38:4), a DG(38:4), az MG(20:4) és a szabad AA, valamint a PLA₂ bontása révén az AA-val egyidejűleg képződő 18:0-tartalmú LPL-ek mind a határ régiókban, főleg annak nekrotikus oldalán dúsultak fel. A szintén itt megemelkedő eikozanoidokat csak összegképlet szintjén tudtuk detektálni, a C₂₀H₃₂O₃ képletű sorozatba tartoznak pl. a hidroxieikozatetraénsavak (HETE), míg a C₂₀H₃₂O₅ sorozatban találjuk a prosztoglandinokat (pl. PGE₂). Említésre méltó az LPA(18:0) emelkedése is, amely LPC-ből képződhet az autotaxin (ATX) révén.



41. ábra: Az arachidonsav-jelátvitel változása 4T1 szubkután tumor régióiban. Piros – proliferatív régió, zöld – proliferatív határ, sötétkék – nekrotikus határ, világoskék – nekrotikus régió. Az adatok átlag \pm SEM értékeket jelölnek ($n = 5-6$, 3 párhuzamos tumormetszetből). ATX, autotaxin; COX/LOX, ciklooxygenáz/lipoxigenáz; DGL/MGL, di-/monoglicerid-lipáz; PLA₂/PLC/PLD, foszfolipáz A₂/C/D. AA, arachidonsav; DG, diglicerid; HETE, hidroxieikozatetraénsav; GPL, glicerofoszfolipid; LPA, lizofoszfatisav; LPL, lizofoszfolipid; MG, monoglicerid; PA, foszfatisav; PGE₂, prosztoglandin E₂.

5.3.3.2. A szubkután tumor proteomikája

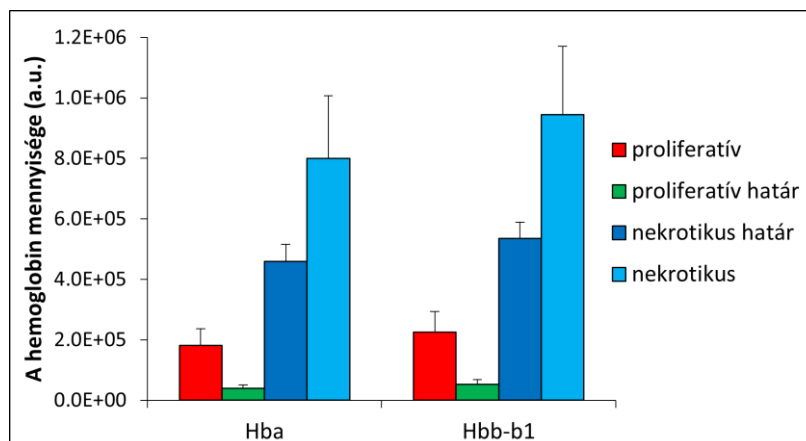
A proteomikai eredmények többváltozós statisztikai analízise ugyancsak arról tudósít, hogy a vizsgált régiók mind jól elkülöníthetőek a proteom összetétele szerint (**42A és B ábra**). A klaszteranalízis alapján a proteomikai mintázatprofilban is nagyon hangsúlyosan megmutatkozik a határ menti régiók éles különbsége (**42B ábra**).



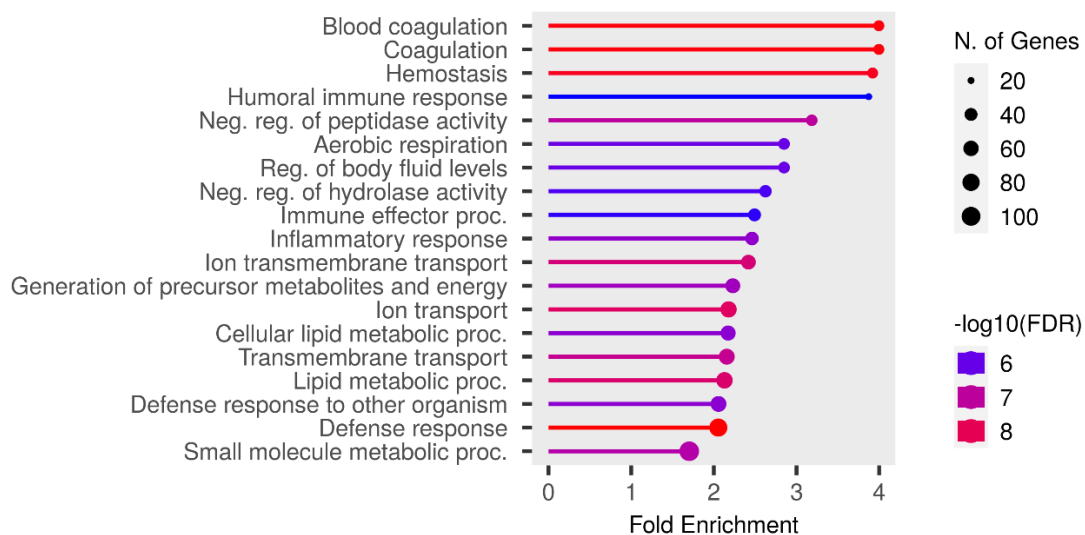
42. ábra: 4T1 szubkután tumorrégiók proteomjának többváltozós statisztikai analízise. (A) PLS-DA "scores plot"; az oválisok a 95%-os konfidenciaintervallumot jelölik; validáló permutációs teszt $p < 0,01$ ($n = 100$). (B) Hierarchikus klaszteranalízis hő térképes megjelenítése. Piros – proliferatív régió, zöld – proliferatív határ, sötétkék – nekrotikus határ, világoskék – nekrotikus régió ($n = 5-6$, 3 párhuzamos tumormetszetből).

A négyféle analizált régió számos összehasonlításra ad lehetőséget. Ezek közül – a dolgozat terjedelmi korlátja miatt, de a kétféle modell összevethetőségét szem előtt tartva – a proliferatív terület és a nekrotikus területek közötti eredményeket emeljük ki.

A nekrotikus határ vizsgálata rendkívül fontos, mivel itt a sejtek közvetlen érintkezésben vannak azzal a területtel, ahonnan könnyen elindulhatnak a vér- vagy a nyirokkeringés felé, és ezáltal áttéteket képezhetnek. Mint fentebb említettük, a HE-festés nem mutatott ki vér alakos elemeket a nekrotikus területeken. Mégis megemelkedett a hemoglobin mennyisége ezekben a régiókban (**43. ábra**), tehát nagy valószínűséggel itt kitágult, degenerálódott erek lehettek/lehetnek jelen már lizálódott vörösvértestekkel. Ezt támasztják alá a megnövekedett fehérjék GO-kategória dúsulásának eredményei között megjelenő, a véralvadással kapcsolható kategóriák (**44. ábra**).

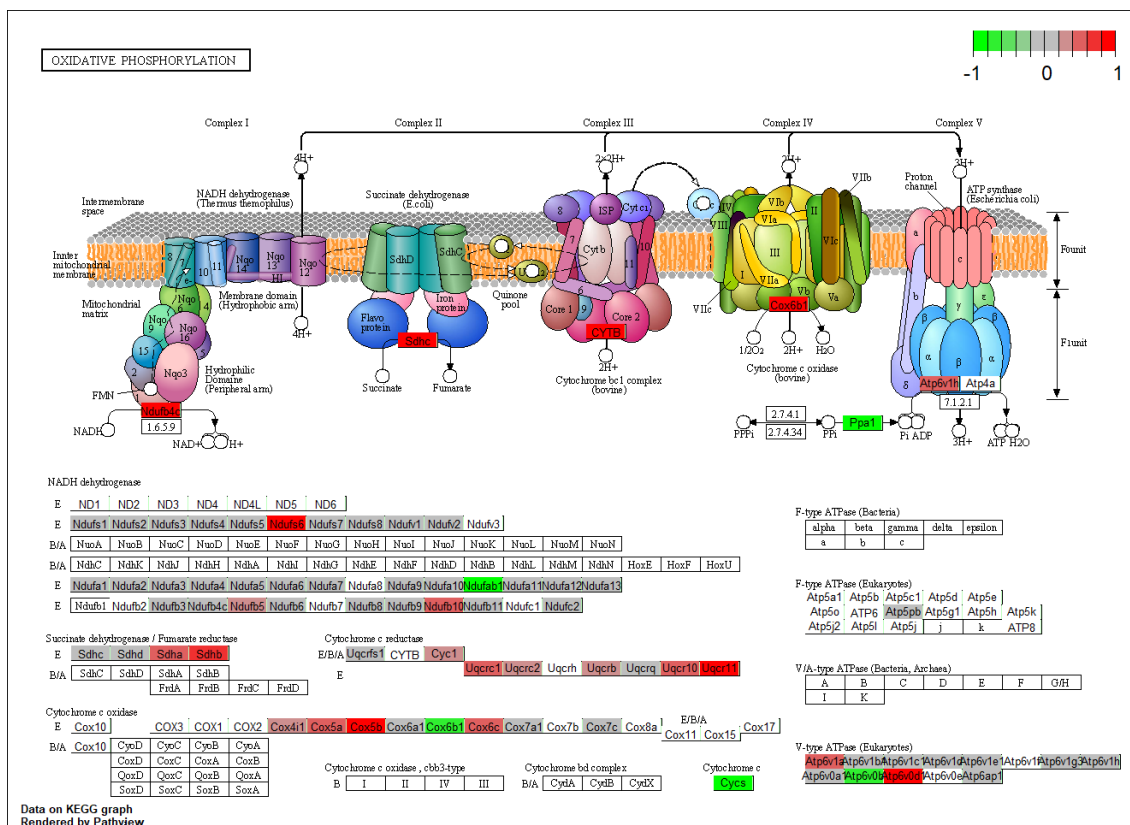


43. ábra: A hemoglobin (Hba és Hbb-b1) mennyisége a tumorrégiókban. Az adatok átlag \pm SEM értékeket reprezentálnak ($n = 6$, 3 párhuzamos tumormetszetből).



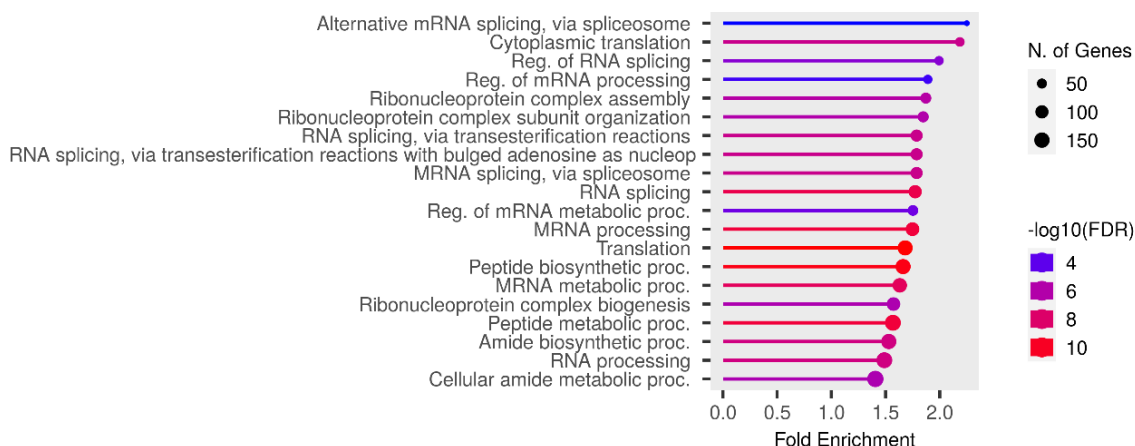
44. ábra: A nekrotikus határrégióban megnövekedett fehérjék GO-kategória gazdagodásának reprezentációja a proliferatív régióhoz hasonlítva

A 45. ábrán bemutatott KEGG-reprezentáció az energetikai folyamatok közül az oxidatív foszforiláció nekrotikus határrégióban detektált felülszabályozottságát szemlélteti a proliferatív területhez képest. Figyelemre méltó továbbá, hogy apoptózissal, nekrozissal összefüggő dúsulást nem találtunk, ugyanakkor a korábban bekövetkezett, részleges sejthalál akár ferroptózis által is létrejöhetett (hemoxigenáz-1 \log_2 -fold = 8,8).

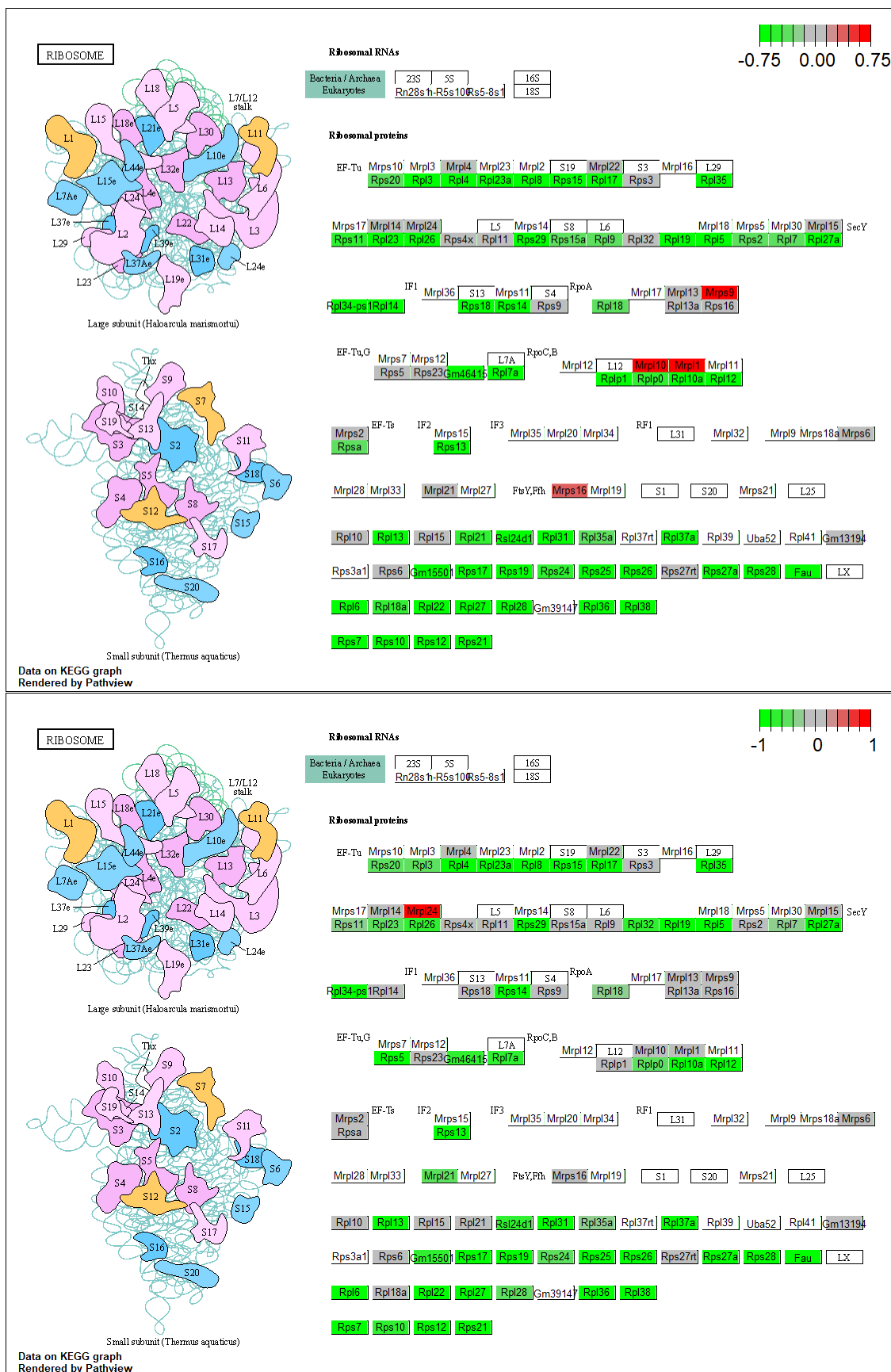


45. ábra: Az oxidatív foszforilációban érintett fehérjék szintjének változása a tumor nekrotikus határrégiójában a proliferatív régióhoz képest (KEGG). Színskála: piros – emelkedés, zöld – csökkenés.

A halkulást mutató fehérjék GO-reprezentációja a szferoid belsejéhez hasonlóan az RNS-processzálás és a transzláció jelentős csökkenéséről ad számot a nekrotikus területeken (**46. ábra**, nekrotikus határrégió), amit a riboszóma komponenseinek szinte teljes alulszabályozódása valóban alá is támaszt (**47. ábra**, fent – nekrotikus határ, lent – nekrotikus).



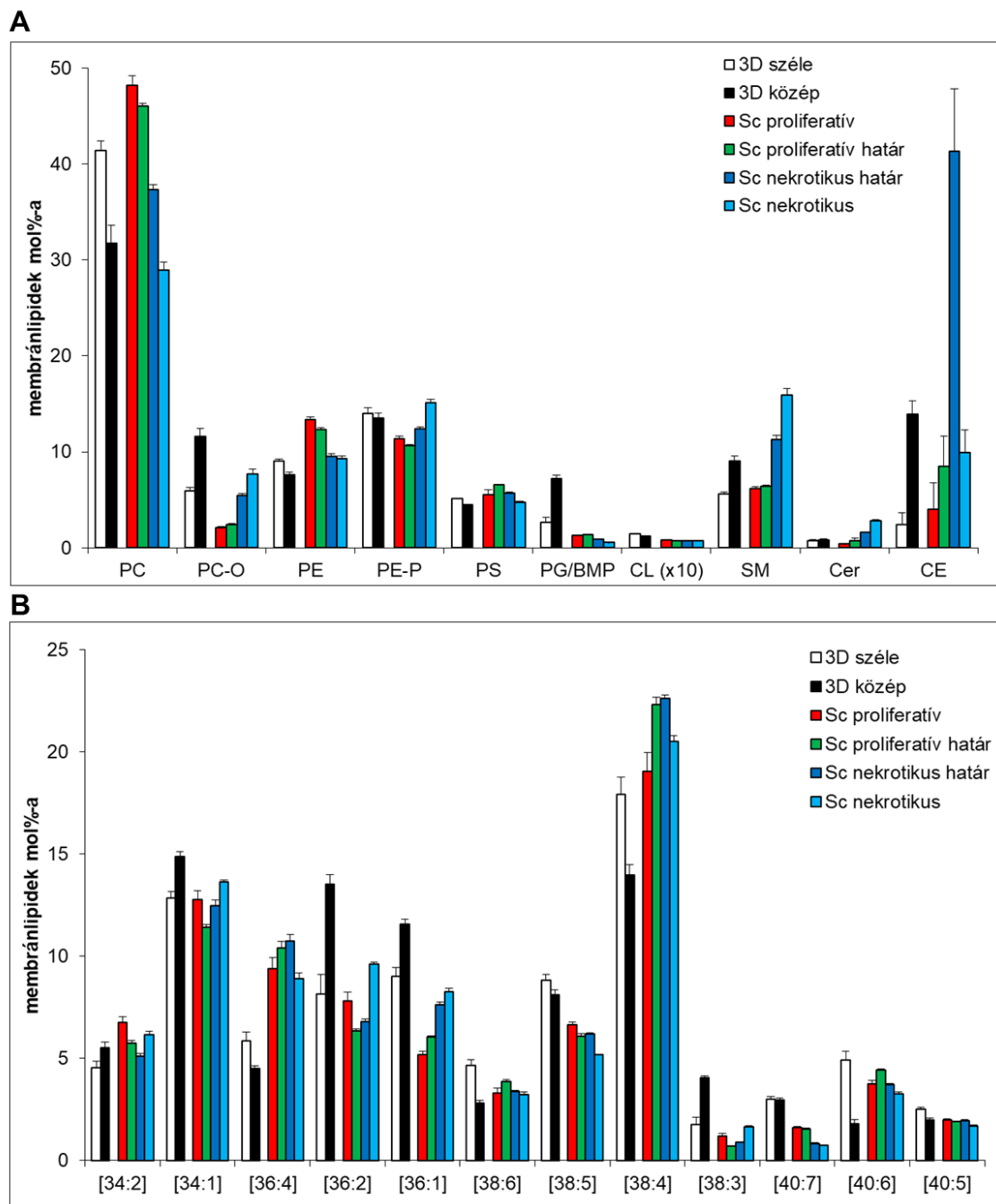
46. ábra: A nekrotikus határrégióban lecsökkent fehérjék GO-kategória gazdagodásának reprezentációja a proliferatív régióhoz hasonlítva



47. ábra: A riboszóma formálódásban résztvevő fehérjék szintjének változása a nekrotikus határrégióban (fent) és a nekrotikus régióban (lent) a proliferatív régióhoz képest (KEGG). Színskála: piros – emelkedés, zöld – csökkenés.

5.3.4. A szferoid és a tumor összehasonlítása

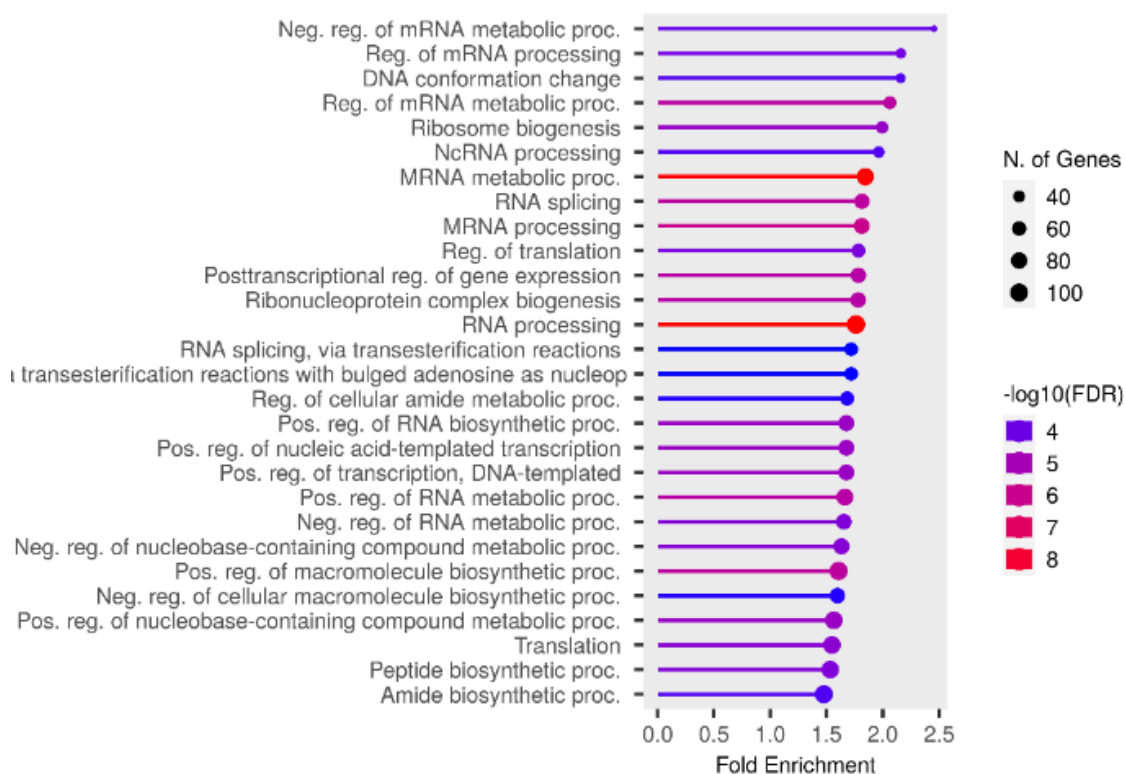
A szferoid és a tumor lipidomikai összevetését mutatja a **48. ábra**. Mindenekelőtt szeretnénk megjegyezni, hogy a 4T1 3D és 4T1 allograft modellek lipidomja mind osztály- (**48A ábra**), mind specieszszinten (**48B ábra**) meglepően nagy hasonlóságot mutat annak ellenére, hogy a szferoidot hígított borjúsérum veszi körül, míg a tumort az egér által biztosított tápanyagok és faktorok. Felfedezhetünk azonban különbségeket is, mint pl. a szferoidban a tumorhoz képest magasabb PG/BMP és CL szinteket.



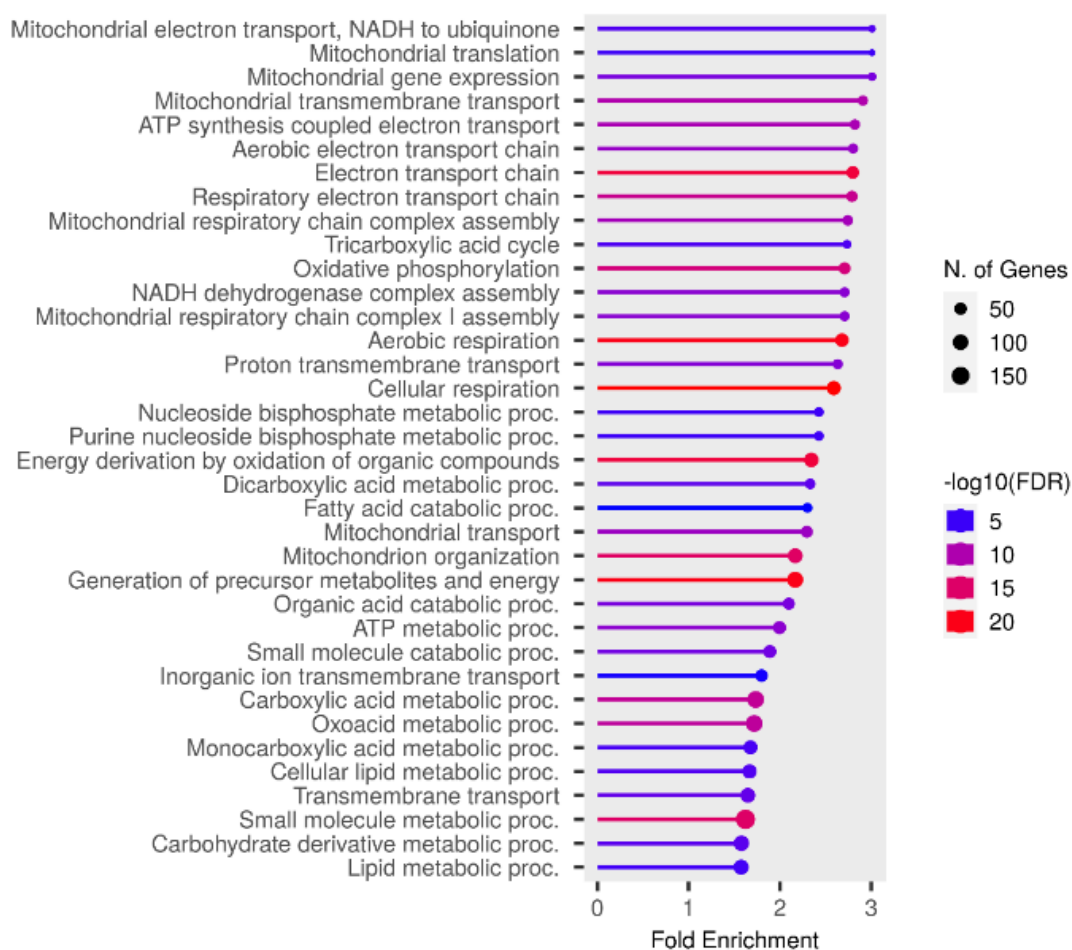
48. ábra: 4T1 szferoid és szubkután emlőtumor régióinak lipidomja. (A) Lipidosztály-összetétel és (B) a membrán átlagos specieszprofilja. Átlag \pm SEM, $n = 10$ (szferoid) és $n = 5-6$ (tumorregiók). 3D – 4T1 szferoid, Sc – 4T1 szubkután tumor.

A szferoid közepe, illetve a tumor nekrotikus területe felé haladva a legfontosabb egybecsengő változások a lipidosztályok szintjén a PC csökkenése, valamint a PC-O, az SM és a CE növekedése (**48A ábra**). Lipidspecieszek szintjén a (36:1), (36:2) és (38:3) specieszek növekedése, illetve számos PUFA-tartalmú speciesz (pl. (38:5) és (40:6)) csökkenése figyelhető meg a szferoid széle és közepe, illetve a tumor proliferatív és nekrotikus területe között. Ugyanakkor az abundáns (38:4) speciesz szabályozása eltér a két modellben (**48B ábra**).

A két tumormodell proteomikai adatainak összevetéséből az egyik legszembevetőbb topológiai hasonlóság a transzláció lehalkulása a szferoid magjában (**30., 31. és 33. ábra**), illetve a tumor nekrotikus területein (**46. és 47. ábra**) a megfelelő proliferatív régiókhoz képest. Ugyanebben az összehasonlításban szintén figyelemre méltó az oxidatív foszforiláció megnövekedett szintje a szferoid centrumában (**28. ábra**), illetve a tumor nekrotikus határterületén (**45. ábra**). A két modell hasonló régióinak összehasonlító elemzéséből pedig az derül ki, hogy a szferoid külső, proliferatív tartományához képest a tumor legjelentősebb részét kitevő proliferatív régió fokozott RNS szintetikus aktivitással bír, fokozott az RNS-processzálas és a transzláció (**49. ábra**). Mindezekhez az energiaigényes folyamatokhoz alacsonyabb metabolikus fehérjeszint (pl. oxidatív foszforiláció, citrátciklus) társul (**50. ábra**).



49. ábra: A tumor proliferatív régiójában megemelkedett fehérjék GO-kategória gazdagodásának reprezentációja a szferoid széléhez képest



50. ábra: A tumor proliferatív régiójában lecsökkent fehérjék GO-kategória gazdagodásának reprezentációja a szferoid széléhez képest

6. DISZKUSSZIÓ

6.1. Módszerfejlesztés

A lipidomikai analízisekre különösen igaz, hogy a kvantitatív analitikai módszer térbeli felbontással történő kombinálása kihívást jelent, és valóban kevés irodalmi példát találhatunk erre. A modern MSI technikák ugyan nagy térbeli felbontás elérésére képesek, de sok esetben „csak” kvalitatív képet szolgáltatnak a szöveti összetevőkről (Lanekoff & Laskin, 2017; Qi és mtsai., 2021; Unsihuay és mtsai., 2021).

Jelen dolgozatban bemutattuk egy LMD-vel kapcsolt shotgun lipidomikai platform kidolgozását, validálását és különböző tumormodelleken történő alkalmazását. Módszerünk egyszerű, gyors, kvantitatív, jó lefedettségű (kb. 200 lipidspeciesz) és nagy térbeli felbontást biztosít (~ 80 µm).

A kifejlesztett extrakciós-infúziós oldószerlegyenek köszönhetően analíziseink során a lehető legkevesebb lépésben tudtuk megvalósítani a lipidextrakciót és MS mérést. Módszerünk ezért egyszerűbb és gyorsabb, mint pl. Knittelfelder és munkatársainak LMD-kapcsolt lipidomikai eljárása, akik a hasonló lefedettséget mintegy tízszer nagyobb mintaterületek kivágásával tudták elérni, és az extrakciós és infúziós lépések is jóval idő- és munkaigényesebbek voltak (Knittelfelder és mtsai., 2018).

Az új platform fontos potenciáljának érezzük annak flexibilitását, többoldalú továbbfejleszthetőségét: 1) A lipidomikai eljárás érzékenysége fragmentációs és kiválasztott ionmonitorozási kísérletek beépítésével, illetve ún. spektrumillesztéses módszer (Knittelfelder és mtsai., 2018) alkalmazásával tovább növelhető. 2) A rendszer tökéletesen kompatibilis ionmobilitási feltétellel, ami ugyancsak az érzékenységet és az azonosítási megbízhatóságot fokozhatja. 3) Az egyfázisú lipidextrakciónak köszönhetően lehetőségünk van a kifejezetten poláris, magasabb agyi gangliozidok analízisére is, amelyek a hagyományos kétfázisú extrakciók során a vizes fázisba extrahálódnak, így vagy egyszerűen kidobásra kerülnek, vagy igen nehézkes a visszanyerésük (Porter és mtsai., 2021). Ennek különösen a neurodegeneratív szöveti elváltozások feltárásában lehet jelentősége. 4) Ugyancsak az egyfázisú lipidextrakciónak köszönhetően az extraktum polárisabb kismolekulákat, mint például szerves savakat, cukrokat, lipidanyagcsere-termékeket is tartalmaz; ezen molekulák validált mérése jelenleg fejlesztés alatt áll munkacsoportunkban. 5) Ahogyan azt a jelen munkában be is mutattuk, a párhuzamos metszetkészítésnek és a rendelkezésre álló nagy hatékonyságú proteomikai (kb. 3000 fehérje azonosítása és kvantitálása) és transzkriptomikai (több 10000

transzkript) módszereknek köszönhetően eljárásunk multiomikai platformmá bővíthető. Az omikai, valamint különböző festett metszetekből származó morfológiai, patológiai és biokémiai információk integrálása kétségtelenül a szöveti heterogenitás jobb megértését szolgálja. 6) Végül meg kell említenünk, hogy a nagy felbontású mikroszkópiával kombinált automatizált LMD tekintetében rendelkezésünkre áll egy mesterséges intelligencia által vezérelt egysejt szintű képfelismerési, fenotipizálási módszer (BIAS, Single Cell Technologies, Szeged, Magyarország), amit nemrégiben sikeresen alkalmaztak proteomikával kombinálva (Mund és mtsai., 2021). Ennek integrálása minden tekintetben biztosított az általunk kifejlesztett platformon.

6.2. Tumormodellek az omikai eredmények tükrében

A 2. táblázatban a legfontosabb lipidomikai és proteomikai eredményeket hasonlítottuk össze a 4T1 szferoid és szubkután tumor vonatkozásában.

2. táblázat: 4T1 szferoid és egér szubkután tumor legfontosabb omikai változásai

Analizált biomolekula		Szabályozott folyamat	Változás			
			a szferoid széléhez képest a magban	a tumor proliferatív régiójához képest		
				a proliferatív határon	a nekrotikus határon	a nekrotikus régióban
Lipid	PC-O	migráció, invázió	↑↑ (17., 24.)	–	↑↑ (40.)	↑↑↑ (21., 22., 40.)
	PE-P	raftképződés, antioxidáns kapacitás	–	–	–	↑ (21., 22., 40.)
	SM	membrán-stabilizálás, raftképződés	↑ (17., 24.)	–	↑ (40.)	↑↑ (21., 22., 40.)
	CE	zsírsav- és koleszterin-többlet raktározása	↑↑ (24.)	↑ (40.)	↑↑↑ (40.)	↑ (40.)
	PG/BMP	mitokondriális/lizoszómális folyamatok	↑↑ (17., 24.)	↓/↑↑↑ (40. PG/BMP)	↓/↑↑ (40. PG/BMP)	↓↓ (40.)
	Cer	proliferáció-gátlás	–	↑ (40.)	↑↑ (40.)	↑↑↑ (21., 22., 40.)
	AA-tartalmú szignál-lipidek	AA-jelátvitel	n.a.	↑ (41.)	↑↑ (41.)	↑ (41.)
	MUFA/PUFA	tápanyaghiány	↑↑ (17., 25.)	↓ (40.)	–	↑ (40.)
Fehérje	transzláció		↓ (30–31.)	–	↓ (46–47.)	↓ (47.)
	oxidatív foszforiláció		↑ (27–28.)	–	↑ (44–45.)	–

A zárójelben a változásokat bemutató ábraszámok láthatóak. ↑, növekedés; ↓, csökkenés, –, nincs változás; n.a., nincs adat. Szürke háttérrel jelöltük azokat a jellemzőket, amelyek hasonlóan változtak a szferoid magjában, illetve a tumor nekrotikus területein a megfelelő proliferatív régiókhoz képest.

Ahogy az a táblázatból is látható, a 4T1 szferoid magjában és a szubkután tumor nekrotikus területén megfigyelt változások számos hasonlóságot mutattak a megfelelő proliferatív régiókhoz képest. A diacil PC részleges lecserélődése PC-O specieszekre nagyon markánsan jelent meg mindkét rendszerben. Irodalmi adatok szerint az AGPS-expresszió, és ezen keresztül az éterlipidek szintje (5. *ábra*) szoros korrelációt mutat a tumor agresszivitásával (Blomme és mtsai., 2022; Stazi és mtsai., 2019). Az AGPS kiütése sejtkultúrában csökkentette a rákos sejtek túlélését, proliferációját és migrációját, *in vivo* pedig a tumor méretét és növekedési sebességét. Az AGPS túltermelése kevésbé agresszív rákos sejteknél egy agresszívabb fenotípust, míg *in vivo* nagyobb méretű tumort eredményezett (Benjamin és mtsai., 2013). Az agresszív, erősen áttétképző tumorok kezelésére AGPS-gátló molekulajelölteket teszteltek. Ezek hatékonynak bizonyultak az enzimgátlásban és ezáltal az éterlipidszint csökkentésében (Stazi és mtsai., 2019), továbbá redukálták az onkogén alkil-LPA, a vérlemezke aktiváló faktor és az eikozanoidok szintjét, valamint a tumornövekedést xenograft egereken (Benjamin és mtsai., 2013). Az éterlipidek jelentőségét erősíti a mitokondriális glicerín-3-foszfát-dehidrogenáz-2 (GPD2) új, nem bioenergetikai, hanem lipidanabolikus szerepének feltárása (Oh és mtsai., 2023). A GPD2 szabályozza a DHAP-termelést (5. *ábra*), és ezen keresztül az éterlipidszintézist 4T1 sejtekben, sőt, ezen keresztül aktiválja a PI3K-AKT útvonalat, így végül a tumornövekedést.

Az SM a PC-O-hoz hasonló viselkedést mutatott mindkét modellben. Mint azt a bevezetőben (2.6. fejezet) említettük, a plazmamembránban az SM növekedése erősíti a membrán fizikai ellenállóképességét, valamint raftalkotóként részt vesz a szignálplatformok formálódásában. Ezzel összhangban van a PE-P specieszek emelkedése a tumor nekrotikus régiójának irányában, hiszen a PE-P a plazmamembrán lipidtutajok belső rétegében helyezkedik el (PIKE, 2004). A PE-P ezenkívül részt vesz a reaktív oxigénszármazékok eltakarításában (Oh és mtsai., 2023).

A CE növekedése ugyancsak tetten érhető volt mindkét modellben. Számos tumorban kimutatták ezen raktározó lipid szintjének emelkedését, aminek szerepe a *de novo* lipogenezis következtében jelenlévő szabad zsírsav- és koleszterintöbblet citotoxikus hatásának csökkentése lehet (Darwish és mtsai., 2024; Vasseur & Guillaumond, 2022). Valóban, a koleszterint CE-vé észterező aciltranszferáz inhibíciójával sikerült csökkenteni a glioblasztóma növekedését (Geng és mtsai., 2016), prosztatarákban pedig a tumorsejtek migrációs és áttétképző képességének drámai romlását tapasztalták (Lee és mtsai., 2018).

A PG/BMP emelkedése a szferoid magja felé, ill. a BMP feldúsulása a proliferatív határon lizoszómális aktivitásnövekedést feltételez, de ezt fehérjeadatokkal nem tudtuk egyértelműen alátámasztani, így a jelenség magyarázatára pl. immunfestést tervezünk végezni.

A Cer emelkedése a tumor nekrotikus területén a mi esetünkben valószínűleg nem apoptotikus folyamattal társítható, hiszen sem morfológiai, sem fehérjeszintű apoptózis/nekrózis jeleket nem láttunk a szigetszerűen elhelyezkedő sejtekben. Az apoptózis vagy a szabad hemoglobin által mediált ferroptózis már a mintavétel pillanatfelvétele előtt lejátszódhatott, és a nekrotikus területeken található sejtek kialakíthatták a megfelelő védelmet (pl. a hemoxigenáz fokozott kifejezése által), a Cer pedig a proliferációgátlás irányában hathatott (lsd. 2.5. fejezet). Ezt támasztja alá a sejtek csökkent transzkripcióval és transzlációval kapcsolatos aktivitása.

Az AA-tartalmú jelképző lipidmediátorok növekedését figyelhettük meg a tumor nekrotikus régióiban, különösen a nekrotikus határterületen. A foszfolipázok közül a PLA₂ enzimek felelősek a lizolipidek dúsulásáért, miközben jelentős mennyiségű szabad AA-t szabadítanak fel. Az LPC emelkedett szintje indukálhatja az LPC-ATX-LPA útvonalat, amely proliferációs, inváziós és metasztatikus folyamatokat segít elő. A PLD PA-t generál (Wolf és mtsai., 2023), míg a PLC a DG színjét emeli meg. A DG-lipáz 2-AG-t, az endokannabinoid jelátvitel egyik mediátorát állítja elő. A 2-AG tovább degradálódhat MG-lipáz révén, amely a glicerinnel együtt ugyancsak szabad AA-t termel (Balogh és mtsai., 2010). Valóban, az MG-lipáz megnövekedett aktivitása számos agresszív ráktípus (pl. melanóma, mellrák) közös jellemzője (Nomura és mtsai., 2010).

A proteom, illetve a transzkriptom szintjén megfigyelt csökkent transzkripciós és/vagy transzlációs aktivitás, az apoptózisra/nekroptózisra utaló jelek hiánya fehérje- és lipidszinten egyaránt, valamint a lehalkult stresszválasz mind arra engednek következtetni, hogy a szferoidok magjában és a tumor nekrotikus régióiban a sejtek nyugalmi állapotban vannak, nem osztódnak. Ugyanakkor a proteomikai elemzések alapján bennük megfigyelt emelkedett metabolikus enzimszintek (pl. az oxidatív foszforiláció elemei) azt jelzik, hogy elegendő metabolikus aktivitást tartanak fenn ennek a nyugalmi állapotnak a biztosításához. A fentebb elemzett, a tumorfejlődést és áttétképzést segítő lipidszignálok (lsd. részletesebben a 2.5. fejezetben) a tumor nekrotikus régióiban elősegíthetik, hogy egyes sejtek kikerüljenek a nyugvó állapotból és migrációba kezdjenek. Különösen fontosak ezek az eredmények annak fényében, hogy egy friss kutatás szerint a keringő tumorsejtek száma nem a tumor, hanem a nekrotikus

mag nagyságával korrelál (Yamamoto és mtsai., 2023). A nekrotikus magban – a szerzők megfigyelése alapján – kitágult, abnormális erek találhatóak, és ezek száma szintén összefügg a metasztatikus potenciállal. Az általunk a nekrotikus magban detektált megemelkedett hemoglobinszint arra utalhat, hogy itt rosszul működő, kitágult, részlegesen vagy teljesen elzáródott erek lehetnek jelen. Valószínű, hogy éppen egy ilyen részlegesen elzáródott ér biztosíthat lehetőséget a migrációt promótáló lipidszignálokkal és egyéb jelátviteli molekulákkal stimulált sejteknek arra, hogy meg is tegyék az első lépést, és kijussanak a keringésbe.

Végül szeretnénk megjegyezni, hogy a szferoidban a proteom és a transzkriptom adatai közötti korreláció hiánya nem jelenti, hogy azok ellentmondának egymásnak. A fehérjeváltozásokhoz hasonlóan az RNS-szint változásai is a környezeti változásokra adott válaszokat reprezentálnak, ugyanakkor azt, hogy valójában milyen fehérjeexpressziós változások történnek a rendelkezésre álló RNS-készlet alapján, nem pusztán az RNS-szintek határozzák meg. A szferoid esetében mind a transzkripció, mind a transláció lehalkult, ami arra utal, hogy a legfontosabb transzlálódó RNS-ek kiválasztása és tartósan a riboszómához való kötődése fontosabb lehet magánál az RNS-szintnél. Hasonló jelenséget figyeltünk meg pl. a hősokkfehérjék stresszindukálta aktiválódásakor, amikor a fehérjetermelődés csak jóval az mRNS-képződés maximuma (2–4 h) után, annak lecsengési fázisában indul el (Balogh és mtsai., 2013).

Összességében megállapíthatjuk, hogy a szferoid számos *in vivo* tumorjellegzetességet képes volt modellezni, ugyanakkor a tumor – nem meglepő módon – komplexebb heterogenitást mutatott. A jelen munkában alkalmazott 4T1 tumormodellek nagy térbeli felbontású multiomikai vizsgálata igazolta azon várakozásainkat, hogy ezzel a módszerrel olyan új információkhoz juthatunk, amelyek feltáró jellegükből adódóan megalapozzák további kutatásainkat.

7. HIVATKOZÁSOK

1. Aiello, S., & Casiraghi, F. (2021). Lysophosphatidic Acid: Promoter of Cancer Progression and of Tumor Microenvironment Development. A Promising Target for Anticancer Therapies? *Cells*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061390>
2. Åkerfelt, M., Morimoto, R. I., & Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
3. Albert, D. H., & Anderson, C. E. (1977). Ether-linked glycerolipids in human brain tumors. *Lipids*, 12(2), 188–192. <https://doi.org/10.1007/BF02533292>
4. Ali, O., & Szabó, A. (2023). Review of Eukaryote Cellular Membrane Lipid Composition, with Special Attention to the Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms242115693>
5. *Allen Reference Atlases: Atlas Viewer*. (é. n.). Elérés 2023. október 30., forrás <https://atlas.brain-map.org/>
6. Amini, P., Ettlin, J., Opitz, L., Clementi, E., Malbon, A., & Markkanen, E. (2017). An optimised protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissue amenable for next-generation sequencing. *BMC Molecular Biology*, 18, 22. <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0099-7>
7. Angerer, T. B., Bour, J., Biagi, J.-L., Moskovets, E., & Frache, G. (2022). Evaluation of 6 MALDI-Matrices for 10 µm Lipid Imaging and On-Tissue MSn with AP-MALDI-Orbitrap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 33(5), 760–771. <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00327>
8. Antal, O., Péter, M., Hackler, L., Mán, I., Szebeni, G., Ayaydin, F., Hideghéty, K., Vigh, L., Kitajka, K., Balogh, G., & Puskás, L. G. (2015). Lipidomic analysis reveals a radiosensitizing role of gamma-linolenic acid in glioma cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1851(9), 1271–1282. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.06.003>
9. Auciello, F. R., Bulusu, V., Oon, C., Tait-Mulder, J., Berry, M., Bhattacharyya, S., Tumanov, S., Allen-Petersen, B. L., Link, J., Kendersky, N. D., Vringer, E., Schug, M., Novo, D., Hwang, R. F., Evans, R. M., Nixon, C., Dorrell, C., Morton, J. P., Norman, J. C., ... Sherman, M. H. (2019). A Stromal Lysolipid–Autotaxin Signaling Axis Promotes Pancreatic Tumor Progression. *Cancer Discovery*, 9(5), 617–627. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1212>
10. Balogh, G., Horváth, I., Nagy, E., Hoyk, Z., Benkő, S., Bensaude, O., & Vigh, L. (2005). The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response: Membrane fluidity and heat shock response. *FEBS Journal*, 272(23), 6077–6086. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04999.x>
11. Balogh, G., Maulucci, G., Gombos, I., Horváth, I., Török, Z., Péter, M., Fodor, E., Páli, T., Benko, S., Parasassi, T., De Spirito, M., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2011). Heat stress causes spatially-distinct membrane re-modelling in K562 leukemia cells. *PloS One*, 6(6), e21182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021182>
12. Balogh, G., Péter, M., Glatz, A., Gombos, I., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2013). Key role of lipids in heat stress management. *FEBS Letters*, 587(13), 1970–1980. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.016>
13. Balogh, G., Péter, M., Liebis, G., Horváth, I., Török, Z., Nagy, E., Maslyanko, A., Benko, S., Schmitz, G., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2010). Lipidomics reveals membrane lipid remodelling and release of potential lipid mediators during early stress responses in a murine melanoma cell line. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1801(9), 1036–1047. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.04.011>

14. Balogi, Z., Multhoff, G., Jensen, T. K., Lloyd-Evans, E., Yamashima, T., Jäättelä, M., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2019). Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. *Progress in Lipid Research*, 74, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.004>
15. Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., & Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, 24(41), 6314–6322. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208773>
16. Benjamin, D. I., Cozzo, A., Ji, X., Roberts, L. S., Louie, S. M., Mulvihill, M. M., Luo, K., & Nomura, D. K. (2013). Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), 14912–14917. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310894110>
17. Bernardes, N., & Fialho, A. M. (2018). Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3871. <https://doi.org/10.3390/ijms19123871>
18. Bian, X., Liu, R., Meng, Y., Xing, D., Xu, D., & Lu, Z. (2020). Lipid metabolism and cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 218(1), e20201606. <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>
19. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
20. Blomme, A., Peter, C., Mui, E., Rodriguez Blanco, G., An, N., Mason, L. M., Jamieson, L. E., McGregor, G. H., Lilla, S., Ntala, C., Patel, R., Thiry, M., Kung, S. H. Y., Leclercq, M., Ford, C. A., Rushworth, L. K., McGarry, D. J., Mason, S., Repiscak, P., ... Leung, H. Y. (2022). THEM6-mediated reprogramming of lipid metabolism supports treatment resistance in prostate cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 14(3), e14764. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114764>
21. Bos, P. D., Nguyen, D. X., & Massagué, J. (2010). Modeling metastasis in the mouse. *Current opinion in pharmacology*, 10(5), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.06.003>
22. Brameshuber, M., Weghuber, J., Ruprecht, V., Gombos, I., Horváth, I., Vigh, L., Eckerstorfer, P., Kiss, E., Stockinger, H., & Schütz, G. J. (2010). Imaging of mobile long-lived nanoplateforms in the live cell plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41765–41771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182121>
23. Brasko, C., Smith, K., Molnar, C., Farago, N., Hegedus, L., Balind, A., Balassa, T., Szkalisity, A., Sukosd, F., Kocsis, K., Balint, B., Paavolainen, L., Enyedi, M. Z., Nagy, I., Puskas, L. G., Haracska, L., Tamas, G., & Horvath, P. (2018). Intelligent image-based in situ single-cell isolation. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02628-4>
24. Bromberg, Z., & Weiss, Y. (2016). The Role of the Membrane-Initiated Heat Shock Response in Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2016.00012>
25. Casares, D., Escribá, P. V., & Rosselló, C. A. (2019). Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
26. Cendrowicz, E., Sas, Z., Bremer, E., & Rygiel, T. P. (2021). The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy. *Cancers*, 13(8), 1946. <https://doi.org/10.3390/cancers13081946>
27. Chang, W.-H., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. (2021). Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2174, 143–170. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0759-6_10

28. Chiurchiù, V., Leuti, A., & Maccarrone, M. (2018). Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00038>
29. Chulpanova, D. S., Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Mouse Tumor Models for Advanced Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms21114118>
30. Chung, T.-W., Choi, H.-J., Park, M.-J., Choi, H.-J., Lee, S.-O., Kim, K.-J., Kim, C.-H., Hong, C., Kim, K.-H., Joo, M., & Ha, K.-T. (2016). The function of cancer-shed gangliosides in macrophage phenotype: Involvement with angiogenesis. *Oncotarget*, 8(3), 4436–4448. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13878>
31. Cooke, M., & Kazanietz, M. G. (2022). Overarching roles of diacylglycerol signaling in cancer development and antitumor immunity. *Science Signaling*, 15(729), eabo0264. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abo0264>
32. Corn, K. C., Windham, M. A., & Rafat, M. (2020). Lipids in the tumor microenvironment: From cancer progression to treatment. *Progress in Lipid Research*, 80, 101055. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101055>
33. Coscia, F., Doll, S., Bech, J. M., Schweizer, L., Mund, A., Lengyel, E., Lindebjerg, J., Madsen, G. I., Moreira, J. M., & Mann, M. (2020). A streamlined mass spectrometry-based proteomics workflow for large-scale FFPE tissue analysis. *The Journal of Pathology*, 251(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/path.5420>
34. Crul, T., Toth, N., Piotto, S., Literati-Nagy, P., Tory, K., Haldimann, P., Kalmar, B., Greensmith, L., Torok, Z., Balogh, G., Gombos, I., Campana, F., Concilio, S., Gallyas, F., Nagy, G., Berente, Z., Gungor, B., Peter, M., Glatz, A., ... Vigh, L. (2013). Hydroximic acid derivatives: Pleiotropic HSP co-inducers restoring homeostasis and robustness. *Current Pharmaceutical Design*, 19(3), 309–346. <https://doi.org/10.2174/138161213804143716>
35. Csoboz, B., Gombos, I., Tatrai, E., Tovari, J., Kiss, A. L., Horvath, I., & Vigh, L. (2018). Chemotherapy induced PRL3 expression promotes cancer growth via plasma membrane remodeling and specific alterations of caveolae-associated signaling. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 16(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0264-8>
36. Dadhich, R., & Kapoor, S. (2022). Lipidomic and Membrane Mechanical Signatures in Triple-Negative Breast Cancer: Scope for Membrane-Based Theranostics. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(11), 2507–2528. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04459-4>
37. Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
38. Darwish, A., Pammer, M., Gallyas, F., Vigh, L., Balogi, Z., & Juhász, K. (2024). Emerging Lipid Targets in Glioblastoma. *Cancers*, 16(2), 397. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16020397>
39. Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D., Ivanek, R., Turrini, E., Drosier, R. A., Zajac, P., Fimognari, C., Spagnoli, G. C., Iezzi, G., Mele, V., & Muraro, M. G. (2017). Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*, 8(1), 1725–1736. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13857>
40. De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 17(8), 457–474. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51>
41. Deberardinis, R. J., Lum, J. J., & Thompson, C. B. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37372–37380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608372200>

42. Dilillo, M., Pellegrini, D., Ait-Belkacem, R., de Graaf, E. L., Caleo, M., & McDonnell, L. A. (2017). Mass Spectrometry Imaging, Laser Capture Microdissection, and LC-MS/MS of the Same Tissue Section. *Journal of Proteome Research*, 16(8), 2993–3001. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00284>
43. Dudek, S. M., Alexander, G. M., & Farris, S. (2016). Rediscovering area CA2: Unique properties and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.22>
44. Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>
45. Elebiyo, T. C., Rotimi, D., Evbuomwan, I. O., Maimako, R. F., Iyobhebhe, M., Ojo, O. A., Oluba, O. M., & Adeyemi, O. S. (2022). Reassessing vascular endothelial growth factor (VEGF) in anti-angiogenic cancer therapy. *Cancer Treatment and Research Communications*, 32, 100620. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100620>
46. Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 606–619. <https://doi.org/10.1038/nrg1879>
47. Escribá, P. V., Busquets, X., Inokuchi, J., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2015). Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Progress in Lipid Research*, 59, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.003>
48. Espaillet, M. P., Shamseddine, A. A., Adada, M. M., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2015). Ceramide and sphingosine-1-phosphate in cancer, two faces of the sphinx. *Translational Cancer Research*, 4(5). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.10.01>
49. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
50. Fei, W., Yan, J., Wu, X., Yang, S., Zhang, X., Wang, R., Chen, Y., Xu, J., & Zheng, C. (2023). Perturbing plasma membrane lipid: A new paradigm for tumor nanotherapeutics. *Theranostics*, 13(8), 2471–2491. <https://doi.org/10.7150/thno.82189>
51. Feng, W. W., Wilkins, O., Bang, S., Ung, M., Li, J., An, J., Del Genio, C., Canfield, K., DiRenzo, J., Wells, W., Gaur, A., Robey, R. B., Guo, J. Y., Powles, R. L., Sotiriou, C., Pusztai, L., Febbraio, M., Cheng, C., Kinlaw, W. B., & Kurokawa, M. (2019). CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Reports*, 29(11), 3405–3420.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.008>
52. Fishbein, A., Hammock, B. D., Serhan, C. N., & Panigrahy, D. (2021). Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? *Pharmacology & Therapeutics*, 218, 107670. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107670>
53. Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
54. Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
55. Geng, F., Cheng, X., Wu, X., Yoo, J. Y., Cheng, C., Guo, J. Y., Mo, X., Ru, P., Hurwitz, B., Kim, S. H., Otero, J., Puduvalli, V., Lefai, E., Ma, J., Nakano, I., Horbinski, C., Kaur, B., Chakravarti, A., & Guo, D. (2016). Inhibition of SOAT1 suppresses glioblastoma growth via

blocking SREBP-1-mediated lipogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(21), 5337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2973>

56. Ghalehbandi, S., Yuzugulen, J., Pranjol, M. Z. I., & Pourgholami, M. H. (2023). The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *European Journal of Pharmacology*, 949, 175586. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586>

57. Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., ... D'Eustachio, P. (2022). The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>

58. Gillet, J.-P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7), 452–458. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>

59. Gombos, I., Crul, T., Piotto, S., Güngör, B., Török, Z., Balogh, G., Péter, M., Slotte, J. P., Campana, F., Pilbat, A.-M., Hunya, A., Tóth, N., Literati-Nagy, Z., Vigh, L., Glatz, A., Brameshuber, M., Schütz, G. J., Hevener, A., Febbraio, M. A., ... Vigh, L. (2011). Membrane-lipid therapy in operation: The HSP co-inducer BGP-15 activates stress signal transduction pathways by remodeling plasma membrane rafts. *PloS One*, 6(12), e28818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028818>

60. Gomez-Larrauri, A., Gangoiti, P., Camacho, L., Presa, N., Martin, C., & Gomez-Muñoz, A. (2023). Phosphatidic Acid Stimulates Lung Cancer Cell Migration through Interaction with the LPA1 Receptor and Subsequent Activation of MAP Kinases and STAT3. *Biomedicines*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071804>

61. Gout, S., & Huot, J. (2008). Role of cancer microenvironment in metastasis: Focus on colon cancer. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 1(1), 69–83. <https://doi.org/10.1007/s12307-008-0007-2>

62. Greco, F., Quercioli, L., Pucci, A., Rocchiccioli, S., Ferrari, M., Recchia, F. A., & McDonnell, L. A. (2021). Mass Spectrometry Imaging as a Tool to Investigate Region Specific Lipid Alterations in Symptomatic Human Carotid Atherosclerotic Plaques. *Metabolites*, 11(4), 250. <https://doi.org/10.3390/metabo11040250>

63. Greenlee, J. D., Subramanian, T., Liu, K., & King, M. R. (2021). Rafting Down the Metastatic Cascade: The Role of Lipid Rafts in Cancer Metastasis, Cell Death, and Clinical Outcomes. *Cancer Research*, 81(1), 5–17. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2199>

64. Griss, J., Viteri, G., Sidiropoulos, K., Nguyen, V., Fabregat, A., & Hermjakob, H. (2020). ReactomeGSA - Efficient Multi-Omics Comparative Pathway Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 19(12), 2115–2124. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR120.002155>

65. Gungor, B., Gombos, I., Crul, T., Ayaydin, F., Szabó, L., Török, Z., Mátés, L., Vigh, L., & Horváth, I. (2014). Rac1 participates in thermally induced alterations of the cytoskeleton, cell morphology and lipid rafts, and regulates the expression of heat shock proteins in B16F10 melanoma cells. *PloS One*, 9(2), e89136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089136>

66. Guo, Y.-X., Ma, Y.-J., Han, L., Wang, Y.-J., Han, J.-A., & Zhu, Y. (2015). Role of sphingosine 1-phosphate in human pancreatic cancer cells proliferation and migration. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20349–20354.

67. Han, S. J., Kwon, S., & Kim, K. S. (2021). Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*, 21(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>

68. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

69. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
70. Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
71. Hason, M., & Bartůňek, P. (2019). Zebrafish Models of Cancer—New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes*, 10(11), 935. <https://doi.org/10.3390/genes10110935>
72. Hebbar, S., Schulz, W. D., Sauer, U., & Schwudke, D. (2014). Laser Capture Microdissection Coupled with On-Column Extraction LC-MSⁿ Enables Lipidomics of Fluorescently Labeled *Drosophila* Neurons. *Analytical Chemistry*, 86(11), 5345–5352. <https://doi.org/10.1021/ac500276r>
73. Herzog, R., Schuhmann, K., Schwudke, D., Sampaio, J. L., Bornstein, S. R., Schroeder, M., & Shevchenko, A. (2012). LipidXplorer: A software for consensual cross-platform lipidomics. *PloS One*, 7(1), e29851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029851>
74. Hisano, Y., & Hla, T. (2019). Bioactive lysolipids in cancer and angiogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 193, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.006>
75. Hlatky, L., Tsionou, C., Hahnfeldt, P., & Coleman, C. N. (1994). Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Research*, 54(23), 6083–6086.
76. Holčápek, M., Liebisch, G., & Ekroos, K. (2018). Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*, 90(7), 4249–4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>
77. Hook, G., Reinheckel, T., Ni, J., Wu, Z., Kindy, M., Peters, C., & Hook, V. (2022). Cathepsin B Gene Knockout Improves Behavioral Deficits and Reduces Pathology in Models of Neurologic Disorders. *Pharmacological Reviews*, 74(3), 600–629. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000527>
78. Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Vigh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1778(7–8), 1653–1664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012>
79. Hosain, S. B., Khiste, S. K., Uddin, M. B., Vorubindi, V., Ingram, C., Zhang, S., Hill, R. A., Gu, X., & Liu, Y.-Y. (2016). Inhibition of glucosylceramide synthase eliminates the oncogenic function of p53 R273H mutant in the epithelial-mesenchymal transition and induced pluripotency of colon cancer cells. *Oncotarget*, 7(37), 60575–60592. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11169>
80. Howard, B. V., Morris, H. P., & Bailey, J. M. (1972). Ether-lipids, -glycerol phosphate dehydrogenase, and growth rate in tumors and cultured cells. *Cancer Research*, 32(7), 1533–1538.
81. Höring, M., Ekroos, K., Baker, P. R. S., Connell, L., Stadler, S. C., Burkhardt, R., & Liebisch, G. (2020). Correction of Isobaric Overlap Resulting from Sodiated Ions in Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 92(16), 10966–10970. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02408>
82. Hu, C., Duan, Q., & Han, X. (2020). Strategies to Improve/Eliminate the Limitations in Shotgun Lipidomics. *PROTEOMICS*, 20(11), 1900070. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900070>
83. Huch, M., & Koo, B.-K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*, 142(18), 3113–3125. <https://doi.org/10.1242/dev.118570>
84. Imparato, G., Urciuolo, F., & Netti, P. A. (2022). Organ on Chip Technology to Model Cancer Growth and Metastasis. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 9(1), 28. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010028>

85. Ireson, C. R., Alavijeh, M. S., Palmer, A. M., Fowler, E. R., & Jones, H. J. (2019). The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *British Journal of Cancer*, 121(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0495-5>
86. Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J., & Swanton, C. (2015). Translational Implications of Tumor Heterogeneity. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(6), 1258–1266. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1429>
87. Jin, K., Du, W., Lan, H., Liu, Y., Mao, C., Du, J., & Mou, X. (2021). Development of humanized mouse with patient-derived xenografts for cancer immunotherapy studies: A comprehensive review. *Cancer Science*, 112(7), 2592–2606. <https://doi.org/10.1111/cas.14934>
88. Jung, J. (2014). Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. *Toxicological Research*, 30(1), 1–5. <https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.1.001>
89. Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
90. Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
91. Kasza, Á., Hunya, Á., Frank, Z., Fülöp, F., Török, Z., Balogh, G., Sántha, M., Bálint, Á., Bernáth, S., Blundell, K. L. I. M., Prodromou, C., Horváth, I., Zeiler, H.-J., Hooper, P. L., Vigh, L., & Penke, B. (2016). Dihydropyridine Derivatives Modulate Heat Shock Responses and have a Neuroprotective Effect in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 53(2), 557–571. <https://doi.org/10.3233/JAD-150860>
92. Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
93. Kim, M., Mun, H., Sung, C. O., Cho, E. J., Jeon, H.-J., Chun, S.-M., Jung, D. J., Shin, T. H., Jeong, G. S., Kim, D. K., Choi, E. K., Jeong, S.-Y., Taylor, A. M., Jain, S., Meyerson, M., & Jang, S. J. (2019). Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature Communications*, 10(1), 3991. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11867-6>
94. Knittelfelder, O., Traikov, S., Vvedenskaya, O., Schuhmann, A., Segeletz, S., Shevchenko, A., & Shevchenko, A. (2018). Shotgun Lipidomics Combined with Laser Capture Microdissection: A Tool To Analyze Histological Zones in Cryosections of Tissues. *Analytical Chemistry*, 90(16), 9868–9878. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02004>
95. Kompauer, M., Heiles, S., & Spengler, B. (2017). Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4-μm lateral resolution. *Nature Methods*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4071>
96. Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep10775>
97. Köfeler, H. C., Ahrends, R., Baker, E. S., Ekroos, K., Han, X., Hoffmann, N., Holčapek, M., Wenk, M. R., & Liebisch, G. (2021). Recommendations for good practice in MS-based lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 62, 100138. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100138>
98. Kudo, K., Miki, Y., Carreras, J., Nakayama, S., Nakamoto, Y., Ito, M., Nagashima, E., Yamamoto, K., Higuchi, H., Morita, S., Inoue, A., Aoki, J., Ando, K., Nakamura, N., Murakami, M., & Kotani, A. (2022). Secreted phospholipase A2 modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma. *Cell Metabolism*, 34(4), 615–633.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.02.011>

99. Lanekoff, I., & Laskin, J. (2017). Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Molecules in Biological Systems. In E. Grushka & N. Grinberg (Szerk.), *Advances in Chromatography* (1. kiad., o. 43–72). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315116372-2>
100. Lang, Z., Guerrero, M., Li, R., & Ladisch, S. (2001). Ganglioside GD1a Enhances VEGF-Induced Endothelial Cell Proliferation and Migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(4), 1031–1037. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4630>
101. Lee, H. J., Li, J., Vickman, R. E., Li, J., Liu, R., Durkes, A. C., Elzey, B. D., Yue, S., Liu, X., Ratliff, T. L., & Cheng, J. X. (2018). Cholesterol Esterification Inhibition Suppresses Prostate Cancer Metastasis by Impairing the Wnt/ β -catenin Pathway. *Molecular cancer research : MCR*, 16(6), 974–985. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0665>
102. Liebisch, G., Vizcaíno, J. A., Köfeler, H., Trötz Müller, M., Griffiths, W. J., Schmitz, G., Spener, F., & Wakelam, M. J. O. (2013). Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 54(6), 1523–1530. <https://doi.org/10.1194/jlr.M033506>
103. Liu, J., Dang, H., & Wang, X. W. (2018). The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.165>
104. Liu, Y., Wu, W., Cai, C., Zhang, H., Shen, H., & Han, Y. (2023). Patient-derived xenograft models in cancer therapy: Technologies and applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 160. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01419-2>
105. Lopez, J., Lai-Kwon, J., Molife, R., Welsh, L., Tunariu, N., Roda, D., Fernández-García, P., Lladó, V., McNicholl, A. G., Rosselló, C. A., Taylor, R. J., Azaro, A., Rodón, J., Sludden, J., Veal, G. J., Plummer, R., Urruticoechea, A., Lahuerta, A., Mujika, K., & Escibá, P. V. (2023). A Phase 1/2A trial of idroxiolic acid: First-in-class sphingolipid regulator and glioma cell autophagy inducer with antitumor activity in refractory glioma. *British Journal of Cancer*, 129(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02356-1>
106. Løvendorf, M. B., Mitsui, H., Zibert, J. R., Røpke, M. A., Hafner, M., Dyring-Andersen, B., Bonefeld, C. M., Krueger, J. G., & Skov, L. (2015). Laser capture microdissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis. *Experimental Dermatology*, 24(3), 187–193. <https://doi.org/10.1111/exd.12604>
107. Manduca, N., Maccafeo, E., De Maria, R., Sistigu, A., & Musella, M. (2023). 3D cancer models: One step closer to in vitro human studies. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1175503>
108. Martinek, J., Wu, T.-C., Sun, L., Lin, J., Kim, K. I., Marches, F., Robson, P., George, J., & Palucka, K. (2022). Multiplex immunofluorescence-guided laser capture microdissection for spatial transcriptomics of metastatic melanoma tissues. *STAR Protocols*, 3(4), 101698. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101698>
109. McMillin, D. W., Negri, J. M., & Mitsiades, C. S. (2013). The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: Challenges and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 12(3), 217–228. <https://doi.org/10.1038/nrd3870>
110. Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 164(2), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
111. Mishra, K., Péter, M., Nardiello, A. M., Keller, G., Llado, V., Fernandez-Garcia, P., Kahlert, U. D., Barasch, D., Saada, A., Török, Z., Balogh, G., Escibá, P. V., Piotto, S., & Kakhlon, O. (2022). Multifaceted Analyses of Isolated Mitochondria Establish the Anticancer

- Drug 2-Hydroxyoleic Acid as an Inhibitor of Substrate Oxidation and an Activator of Complex IV-Dependent State 3 Respiration. *Cells*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells11030578>
112. Molendijk, J., Robinson, H., Djuric, Z., & Hill, M. M. (2020). Lipid mechanisms in hallmarks of cancer. *Molecular omics*, 16(1), 6–18. <https://doi.org/10.1039/c9mo00128j>
113. Mollee, P., Boros, S., Loo, D., Ruelcke, J. E., Lakis, V. A., Cao, K.-A. L., Renaut, P., & Hill, M. M. (2016). Implementation and evaluation of amyloidosis subtyping by laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Clinical Proteomics*, 13, 30. <https://doi.org/10.1186/s12014-016-9133-x>
114. Mollinedo, F., & Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Advances in Biological Regulation*, 57, 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.003>
115. Moro, K., Nagahashi, M., Gabriel, E., Takabe, K., & Wakai, T. (2019). Clinical application of ceramide in cancer treatment. *Breast Cancer*, 26(4), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s12282-019-00953-8>
116. Morton, J. J., Bird, G., Refaeli, Y., & Jimeno, A. (2016). Humanized mouse xenograft models: Narrowing the tumor-microenvironment gap. *Cancer research*, 76(21), 6153–6158. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1260>
117. Mullen, T. D., & Obeid, L. M. (2012). Ceramide and apoptosis: Exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(4), 340–363. <https://doi.org/10.2174/187152012800228661>
118. Mund, A., Coscia, F., Hollandi, R., Kovács, F., Kriston, A., Brunner, A.-D., Bzorek, M., Naimy, S., Rahbek Gjerdrum, L. M., Dyring-Andersen, B., Bulkescher, J., Lukas, C., Gnann, C., Lundberg, E., Horvath, P., & Mann, M. (2021). *AI-driven Deep Visual Proteomics defines cell identity and heterogeneity* [Preprint]. *Systems Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.427969>
119. Mund, A., Coscia, F., Kriston, A., Hollandi, R., Kovács, F., Brunner, A.-D., Migh, E., Schweizer, L., Santos, A., Bzorek, M., Naimy, S., Rahbek-Gjerdrum, L. M., Dyring-Andersen, B., Bulkescher, J., Lukas, C., Eckert, M. A., Lengyel, E., Gnann, C., Lundberg, E., ... Mann, M. (2022). Deep Visual Proteomics defines single-cell identity and heterogeneity. *Nature Biotechnology*, 40(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01302-5>
120. Nagy, E., Balogi, Z., Gombos, I., Akerfelt, M., Björkbom, A., Balogh, G., Török, Z., Maslyanko, A., Fiszer-Kierzkowska, A., Lisowska, K., Slotte, P. J., Sistonen, L., Horváth, I., & Vigh, L. (2007). Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 7945–7950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702557104>
121. Neal, J. T., Li, X., Zhu, J., Giangarra, V., Grzeskowiak, C. L., Ju, J., Liu, I. H., Chiou, S.-H., Salahudeen, A. A., Smith, A. R., Deutsch, B. C., Liao, L., Zemek, A. J., Zhao, F., Karlsson, K., Schultz, L. M., Metzner, T. J., Nadauld, L. D., Tseng, Y.-Y., ... Kuo, C. J. (2018). Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*, 175(7), 1972–1988.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.021>
122. Nelson, G. J. (1962). The lipid composition of normal mouse liver. *Journal of Lipid Research*, 3(2), 256–262. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40438-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40438-9)
123. Ni, Z., Wölk, M., Jukes, G., Mendivelso Espinosa, K., Ahrends, R., Aimo, L., Alvarez-Jarreta, J., Andrews, S., Andrews, R., Bridge, A., Clair, G. C., Conroy, M. J., Fahy, E., Gaud, C., Goracci, L., Hartler, J., Hoffmann, N., Kopczyński, D., Korf, A., ... Fedorova, M. (2023). Guiding the choice of informatics software and tools for lipidomics research applications. *Nature Methods*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01710-0>

124. Nicolson, G. L. (1982). Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 695(2), 113–176. [https://doi.org/10.1016/0304-419x\(82\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0304-419x(82)90020-8)
125. Nilsson, A., Goodwin, R. J. A., Swales, J. G., Gallagher, R., Shankaran, H., Sathe, A., Pradeepan, S., Xue, A., Keirstead, N., Sasaki, J. C., Andren, P. E., & Gupta, A. (2015). Investigating Nephrotoxicity of Polymyxin Derivatives by Mapping Renal Distribution Using Mass Spectrometry Imaging. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), 1823–1830. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00262>
126. Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S. W., & Cravatt, B. F. (2010). Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell*, 140(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.11.027>
127. Norheim, F., Chella Krishnan, K., Bjellaas, T., Vergnes, L., Pan, C., Parks, B. W., Meng, Y., Lang, J., Ward, J. A., Reue, K., Mehrabian, M., Gundersen, T. E., Péterfy, M., Dalen, K. T., Drevon, C. A., Hui, S. T., Lusi, A. J., & Seldin, M. M. (2021). Genetic regulation of liver lipids in a mouse model of insulin resistance and hepatic steatosis. *Molecular Systems Biology*, 17(1), e9684. <https://doi.org/10.15252/msb.20209684>
128. Odenkirk, M. T., Horman, B. M., Dodds, J. N., Patisaul, H. B., & Baker, E. S. (2022). Combining Micropunch Histology and Multidimensional Lipidomic Measurements for In-Depth Tissue Mapping. *ACS measurement science Au*, 2(1), 67–75. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.1c00035>
129. Oh, S., Jo, S., Bajzikova, M., Kim, H. S., Dao, T. T. P., Rohlena, J., Kim, J.-M., Neuzil, J., & Park, S. (2023). Non-bioenergetic roles of mitochondrial GPD2 promote tumor progression. *Theranostics*, 13(2), 438–457. <https://doi.org/10.7150/thno.75973>
130. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T., & Patnai, A. (2018). Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer discovery*, 8(11), 1358–1365. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0044>
131. Onimaru, M., & Yonemitsu, Y. (2011). Angiogenic and lymphangiogenic cascades in the tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3(1), 216–225. <https://doi.org/10.2741/s146>
132. Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.-É., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388–W396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
133. Papaevangelou, E., Almeida, G. S., Box, C., deSouza, N. M., & Chung, Y.-L. (2018). The effect of FASN inhibition on the growth and metabolism of a cisplatin-resistant ovarian carcinoma model. *International Journal of Cancer*, 143(4), 992–1002. <https://doi.org/10.1002/ijc.31392>
134. Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C. S.-O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J. A., Bescós, C., Di Croce, L., & Benitah, S. A. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 541(7635), Article 7635. <https://doi.org/10.1038/nature20791>
135. Patel, D., & Witt, S. N. (2017). Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, e4829180. <https://doi.org/10.1155/2017/4829180>
136. Peksel, B., Gombos, I., Péter, M., Vigh, L., Tiszlavicz, Á., Brameshuber, M., Balogh, G., Schütz, G. J., Horváth, I., Vigh, L., & Török, Z. (2017). Mild heat induces a distinct „eustress” response in Chinese Hamster Ovary cells but does not induce heat shock protein synthesis. *Scientific Reports*, 7(1), 15643. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15821-8>
137. Péter, M., Balogh, G., Gombos, I., Liebisch, G., Horváth, I., Török, Z., Nagy, E., Maslyanko, A., Benkő, S., Schmitz, G., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2012). Nutritional lipid

- supply can control the heat shock response of B16 melanoma cells in culture. *Molecular Membrane Biology*, 29(7), 274–289. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.680203>
138. Péter, M., Glatz, A., Gudmann, P., Gombos, I., Török, Z., Horváth, I., Vigh, L., & Balogh, G. (2017). Metabolic crosstalk between membrane and storage lipids facilitates heat stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE*, 12(3), e0173739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173739>
139. Péter, M., Gudmann, P., Kóta, Z., Török, Z., Vigh, L., Glatz, A., & Balogh, G. (2021). Lipids and Trehalose Actively Cooperate in Heat Stress Management of *Schizosaccharomyces pombe*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13272. <https://doi.org/10.3390/ijms222413272>
140. Péter, M., Török, W., Petrovics-Balog, A., Vigh, L., Vécsei, L., & Balogh, G. (2020). Cerebrospinal fluid lipidomic biomarker signatures of demyelination for multiple sclerosis and Guillain–Barré syndrome. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75502-x>
141. PIKE, L. J. (2004). Lipid rafts: Heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal*, 378(2), 281–292. <https://doi.org/10.1042/bj20031672>
142. Podgorny, O. V., & Lazarev, V. N. (2017). Laser microdissection: A promising tool for exploring microorganisms and their interactions with hosts. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.001>
143. Porter, M. J., Zhang, G.-L., & Schnaar, R. L. (2021). Ganglioside Extraction, Purification and Profiling. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 169. <https://doi.org/10.3791/62385>
144. Qi, K., Wu, L., Liu, C., & Pan, Y. (2021). Recent Advances of Ambient Mass Spectrometry Imaging and Its Applications in Lipid and Metabolite Analysis. *Metabolites*, 11(11), 780. <https://doi.org/10.3390/metabo11110780>
145. Ran, H., Zhu, Y., Deng, R., Zhang, Q., Liu, X., Feng, M., Zhong, J., Lin, S., Tong, X., & Su, Q. (2018). Stearoyl-CoA desaturase-1 promotes colorectal cancer metastasis in response to glucose by suppressing PTEN. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0711-9>
146. Róbert A., & János S. G. (2015). A háromdimenziós in vitro tumormodellek jelentősége a rákkutatásban és diagnosztikában. *Magyar Onkológia*.
147. Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
148. Roos, D. S., & Choppin, P. W. (1984). Tumorigenicity of cell lines with altered lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(23), 7622–7626. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.23.7622>
149. Roy, A., & Patra, S. K. (2023). Lipid Raft Facilitated Receptor Organization and Signaling: A Functional Rheostat in Embryonic Development, Stem Cell Biology and Cancer. *Stem Cell Reviews and Reports*, 19(1), 2–25. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10448-3>
150. Sajjad, H., Imtiaz, S., Noor, T., Siddiqui, Y. H., Sajjad, A., & Zia, M. (2021). Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(2), 87–103. <https://doi.org/10.1002/ame2.12165>
151. Shackelford, D. B., & Shaw, R. J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: Metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews. Cancer*, 9(8), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrc2676>
152. Sharma, S. V., Haber, D. A., & Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews. Cancer*, 10(4), 241–253. <https://doi.org/10.1038/nrc2820>

153. Shiravand, Y., Khodadadi, F., Kashani, S. M. A., Hosseini-Fard, S. R., Hosseini, S., Sadeghirad, H., Ladwa, R., O'Byrne, K., & Kulasinghe, A. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Oncology*, 29(5), 3044–3060. <https://doi.org/10.3390/curroncol29050247>
154. Snyder, F., & Wood, R. (1969). Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. *Cancer Research*, 29(1), 251–257.
155. Stazi, G., Battistelli, C., Piano, V., Mazzone, R., Marrocco, B., Marchese, S., Louie, S. M., Zwergel, C., Antonini, L., Patsilnakos, A., Ragno, R., Viviano, M., Sbardella, G., Ciogli, A., Fabrizi, G., Cirilli, R., Strippoli, R., Marchetti, A., Tripodi, M., ... Valente, S. (2019). Development of alkyl glycerone phosphate synthase inhibitors: Structure-activity relationship and effects on ether lipids and epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163, 722–735. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.050>
156. Storey, J. D., & Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), 9440–9445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1530509100>
157. Swales, J. G., Strittmatter, N., Tucker, J. W., Clench, M. R., Webborn, P. J. H., & Goodwin, R. J. A. (2016). Spatial Quantitation of Drugs in tissues using Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry Imaging. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep37648>
158. Takáts, Z., Wiseman, J. M., & Cooks, R. G. (2005). Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(10), 1261–1275. <https://doi.org/10.1002/jms.922>
159. Tallima, H., Azzazy, H. M. E., & El Ridi, R. (2021). Cell surface sphingomyelin: Key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01581-y>
160. Tigyi, G., Dacheux, M. A., Lin, K.-H., Yue, J., Norman, D., Benyó, Z., & Lee, S. C. (2021). Anti-cancer strategies targeting the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis: Is there a path forward? *Cancer Metastasis Reviews*, 40(1), 3–5. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09955-5>
161. Tigyi, G. J., Yue, J., Norman, D. D., Szabo, E., Balogh, A., Balazs, L., Zhao, G., & Lee, S. C. (2019). Regulation of tumor cell—Microenvironment interaction by the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis. *Advances in Biological Regulation*, 71, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.bior.2018.09.008>
162. Tóth, M. E., Dukay, B., Péter, M., Balogh, G., Szűcs, G., Zvara, Á., Szebeni, G. J., Hajdu, P., Sárközy, M., Puskás, L. G., Török, Z., Csont, T., Vigh, L., & Sántha, M. (2021). Male and Female Animals Respond Differently to High-Fat Diet and Regular Exercise Training in a Mouse Model of Hyperlipidemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4198. <https://doi.org/10.3390/ijms22084198>
163. Török, Z., Crul, T., Maresca, B., Schütz, G. J., Viana, F., Dindia, L., Piotto, S., Brameshuber, M., Balogh, G., Péter, M., Porta, A., Trapani, A., Gombos, I., Glatz, A., Gungor, B., Peksel, B., Vigh, L., Csoboz, B., Horváth, I., ... Vigh, L. (2014). Plasma membranes as heat stress sensors: From lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6), 1594–1618. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.12.015>
164. Török, Z., Tsvetkova, N. M., Balogh, G., Horváth, I., Nagy, E., Péntes, Z., Hargitai, J., Bensaude, O., Csermely, P., Crowe, J. H., Maresca, B., & Vigh, L. (2003). Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3131–3136. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438003100>

165. Unsihuay, D., Mesa Sanchez, D., & Laskin, J. (2021). Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Biological Systems. *Annual review of physical chemistry*, 72, 307–329. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-061020-053416>
166. van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
167. Varga-Zsíros, V., Migh, E., Marton, A., Kóta, Z., Vizler, C., Tiszlavicz, L., Horváth, P., Török, Z., Vigh, L., Balogh, G., & Péter, M. (2023). Development of a Laser Microdissection-Coupled Quantitative Shotgun Lipidomic Method to Uncover Spatial Heterogeneity. *Cells*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells12030428>
168. Vasseur, S., & Guillaumond, F. (2022). Lipids in cancer: a global view of the contribution of lipid pathways to metastatic formation and treatment resistance. *Oncogenesis*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41389-022-00420-8>
169. Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: Historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, 599(6), 1745–1757. <https://doi.org/10.1113/JP278810>
170. Vigh, L., Escribá, P. V., Sonnleitner, A., Sonnleitner, M., Piotto, S., Maresca, B., Horváth, I., & Harwood, J. L. (2005). The significance of lipid composition for membrane activity: New concepts and ways of assessing function. *Progress in Lipid Research*, 44(5), 303–344. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.08.001>
171. Vigh, L., Horváth, I., Maresca, B., & Harwood, J. L. (2007). Can the stress protein response be controlled by ‘membrane-lipid therapy’? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.06.009>
172. Vigh, L., Literáti, P. N., Horváth, I., Török, Z., Balogh, G., Glatz, A., Kovács, E., Boros, I., Ferdinándy, P., Farkas, B., Jaszlits, L., Jednákovits, A., Korányi, L., & Maresca, B. (1997). Bimoclomol: A nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nature Medicine*, 3(10), 1150–1154. <https://doi.org/10.1038/nm1097-1150>
173. Vigh, L., Maresca, B., & Harwood, J. L. (1998). Does the membrane’s physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends in Biochemical Sciences*, 23(10), 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01279-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01279-1)
174. Vigh, L., Nakamoto, H., Landry, J., Gomez-Munoz, A., Harwood, J. L., & Horvath, I. (2007). Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, 40–51. <https://doi.org/10.1196/annals.1391.027>
175. Vigh, L., Török, Z., Balogh, G., Glatz, A., Piotto, S., & Horváth, I. (2007). Membrane-Regulated Stress Response. In P. Csermely & L. Vigh (Szerk.), *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* (o. 114–131). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1_11
176. Vona, R., Iessi, E., & Matarrese, P. (2021). Role of Cholesterol and Lipid Rafts in Cancer Signaling: A Promising Therapeutic Opportunity? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.622908>
177. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
178. Wang, W., Li, Y., Lin, K., Wang, X., Tu, Y., & Zhuo, Z. (2023). Progress in building clinically relevant patient-derived tumor xenograft models for cancer research. *Animal Models and Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1002/ame2.12349>

179. Wang, X., Schmitt, M. V., Xu, L., Jiao, Y., Guo, L., Lienau, P., Reichel, A., & Liu, X. (2019). Quantitative molecular tissue atlas of Bis(monoacylglycero)phosphate and phosphatidylglycerol membrane lipids in rodent organs generated by methylation assisted high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1084, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.060>
180. Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften*, 12, 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/BF01504608>
181. Warburg, O., & Minami, S. (1923). Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Klinische Wochenschrift*, 2(17), 776–777. <https://doi.org/10.1007/BF01712130>
182. Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530.
183. Wiseman, B. S., & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570), 1046–1049. <https://doi.org/10.1126/science.1067431>
184. Wolf, A., Tanguy, E., Wang, Q., Gasman, S., & Vitale, N. (2023). Phospholipase D and cancer metastasis: A focus on exosomes. *Advances in Biological Regulation*, 87, 100924. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2022.100924>
185. Yamamoto, A., Huang, Y., Krajina, B. A., McBirney, M., Doak, A. E., Qu, S., Wang, C. L., Haffner, M. C., & Cheung, K. J. (2023). Metastasis from the tumor interior and necrotic core formation are regulated by breast cancer-derived angiopoietin-like 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(10), e2214888120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214888120>
186. Yao, H., & He, S. (2021). Multi-faceted role of cancer-associated adipocytes in the tumor microenvironment. *Molecular Medicine Reports*, 24(6), 866. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12506>
187. Yuan, T., & Cantley, L. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>
188. Zalba, S., & ten Hagen, T. L. M. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 52, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>
189. Zheng, K., Chen, Z., Feng, H., Chen, Y., Zhang, C., Yu, J., Luo, Y., Zhao, L., Jiang, X., & Shi, F. (2019). Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin. *Cell Death & Disease*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1303-0>
190. Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J. C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M. C., Cabot, M., & Merrill, A. H. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), 1864–1884. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.009>
191. Zhu, Y., Zhu, L., Lu, L., Zhang, L., Zhang, G., Wang, Q., & Yang, P. (2014). Role and mechanism of the alkylglycerone phosphate synthase in suppressing the invasion potential of human glioma and hepatic carcinoma cells in vitro. *Oncology Reports*, 32(1), 431–436. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3189>

8. ÖSSZEFOGLALÁS

i. Lipidomikai módszerfejlesztés

- Kidolgoztunk egy lézer-mikrodisszekcióval kapcsolt shotgun lipidomikai eljárást, amely egyszerű, gyors, kvantitatív, jó lefedettséget (több száz lipidspeciesz) és nagy térbeli felbontást (~ 80 μm) biztosít.
- A módszerfejlesztés során optimalizáltunk egy egyfázisú oldószerkeletet, amely extrakciós és infúziós szolvensként egyaránt szolgál, és lehetővé teszi a polaritásváltással történő MS mérést is.
- A módszervalidálás során kitűnő extrakciós hatékonyságot és reprodukálhatóságot állapítottunk meg a teljes munkafolyamatra vonatkozóan.
- A kvantitálás linearitását szöveti és sejtes LMD mintákon tesztelve kiváló determinációs együtthatókat állapítottunk meg nemcsak a teljes membránlipid-tartalomra, hanem a membránlipidom összes komponensére.
- A kvantitálható lipidspecieszek száma nem csökkent számottevően a csökkenő LMD mérettel, és a lipidösszetétel is jól megtartottnak bizonyult.
- A módszer hatékonyságát egérhippokampusz heterogenitásának kimutatásával demonstráltuk; mintegy 11 különböző régió eltérő lipidmintázatát mutattuk be.

ii. A lipidomikai platform alkalmazása in vitro tumormodelleken

- A tenyésztési, beágyazási és metszési körülmények optimalizálásával és az LMD-séma kidolgozásával biztosítottuk a lipidomikai platform hatékony alkalmazását 4T1 sejtekből készült szferoidmodellen.
- Kétféle LMD-séma alkalmazásával is bemutattuk több lipidosztály gradiens típusú változását a szferoid széle és belseje között. A szferoid belseje felé detektált MUFA/PUFA arány növekedése korlátozott tápanyag-hozzáférésre, míg az alkil kötésű PC-O és SM emelkedése a szferoid magjában elhelyezkedő sejtek membránjainak nagyobb ellenállóképességére utalhat.
- A 4T1 3D sejtkultúra legmarkánsabb lipidváltozásait graduális lipidmegvonással 2D sejtenyészetben is sikerült kimutatni.

iii. A lipidomikai platform alkalmazása in vivo egértumormodelleken

- 4T1 tumorallograftok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a különböző gazdaszervekben létrehozott primer egértumorok (tüdő és emlőszírszöveti szubkután) proliferatív régióinak lipidmintázata karakterisztikusan különbözik.

- Megállapítottuk, hogy egy primer léptumor és annak májba, valamint tüdőbe adott metasztázisai, továbbá az adott szervben belüli különböző tumoros területek lipidprofiljai ugyancsak megkülönböztethetőek, vagyis a célszervek tumor-mikrokörnyezete jelentősen befolyásolja a primer tumor lipidösszetételét.
- 4T1 szubkután tumor részletesebb topológiai elemzése során kimutattuk, hogy adott tumoron belül a proliferatív és nekrotikus területek lipidmintázata markánsan különbözik, és ezt az intratumorális heterogenitást – legalábbis a vizsgált mintákban – nem írta felül a különböző egyedek közötti intertumorális heterogenitás.

iv. A lipidomikai platform multiomikai kiterjesztése

- Kidolgoztunk egy multiomikai kísérleti elrendezést, amelyben a lipidomika mellett proteomikai és/vagy transzkriptomikai vizsgálatokat is végeztünk *in vitro* és *in vivo* 4T1 tumormodelleken.
- A 4T1 szferoidok lipidomikai jellemzése során részletesen bemutattuk a MUFA/PUFA, a PC-O és az SM gradiens háttérben meghúzódó speciesz szintű változásokat.
- A 4T1 szferoidok proteomikai elemzése számos fehérje esetében tárt fel a lipidekhez hasonló, gradiens típusú viselkedést a szferoid centruma és széle között. A szferoid belsejében a mitokondriális energetikai folyamatokban (pl. oxidatív foszforiláció és citrátciklus) résztvevő fehérjék szintje emelkedett, míg a fehérjeszintézissel kapcsolatos folyamatok (pl. riboszóma-formálódás) lehalkultak.
- A 4T1 szferoidok transzkriptomikai elemzése feltárta, hogy a génexpresszió szabályozása RNS-szinten is lehalkult, továbbá a sejtek osztódása a szferoid magjában rendkívül lelassult. Meglepő módon az apoptotikus és a szabályozott nekrotikus folyamatok, valamint a stresszválasszal kapcsolatos jelátviteli utak ugyancsak lecsendesedtek a szferoid magjában a széli régióhoz képest.
- A szferoidok proteomikai és transzkriptomikai adatai között nem találtunk korrelációt, bár a génexpresszió lehalkulása mind fehérje-, mind RNS-szinten tetten érhető volt.
- A 4T1 szubkután tumor esetében négy kiválasztott tumorrégiót (proliferatív, proliferatív határ, nekrotikus határ és nekrotikus) vizsgáltunk. A lipidomikai analízis a proliferatív, illetve nekrotikus területek lipidmintázatbeli hasonlóságát,

továbbá a határ menti régiók éles elkülönülését mutatta ki. A proliferatív régiótól a nekrotikus felé haladva a PC csökkenését, valamint a PC-O, a PE-P, az SM, a Cer és a CE növekedését regisztráltuk, míg a határrégiók változásai számos szignálút vonal (pl. arachidonsav-metabolizmus) aktiválódására utaltak.

- A 4T1 szubkután tumor proteomikai mintázatprofiljában is megmutatkozott a határ menti régiók éles különbsége. A szferoid belsejéhez hasonlóan a tumor nekrotikus területein is lehalkult az RNS-processzálas és a transzláció a tisztán proliferatív területhez képest. A nekrotikus határterületen ugyanakkor emelkedett enzimszintet detektáltunk pl. az oxidatív foszforiláció elemeire.
- A 4T1 szferoid- és tumoreredmények összehasonlítása számos egybeeséssel, lipidomikai és proteomikai változást tárt fel, vagyis elmondhatjuk, hogy – legalábbis részben – a szferoid szélén elhelyezkedő proliferatív sejtek képesek modellezni a tumor proliferáló sejtjeit, és hasonlóan, a szferoid magjában lévő sejtek tulajdonságai a tumor nekrotikus területeire emlékeztetnek.
- Összességében, a 4T1 tumormodellek nagy térbeli felbontású multiomikai vizsgálata igazolta várakozásainkat, vagyis a kifejlesztett módszer olyan új információkat képes szolgáltatni, amelyek feltáró jellegükből adódóan megalapozzák további kutatásainkat.

9. SUMMARY

i. Lipidomics method development

- We have developed a laser microdissection-coupled shotgun lipidomic platform, which is simple, fast, quantitative, and enables good coverage (hundreds of lipid species) with high spatial resolution ($\sim 80 \mu\text{m}$).
- We have optimized a one-phase solvent mixture, which serves both as extraction and infusion solvent, and enables MS measurements with polarity switching.
- During the method validation, we have found excellent extraction efficiency and reproducibility for the whole workflow.
- We have tested the linearity of quantification on both tissue and cellular samples. The coefficient of determination was excellent for the whole membrane lipid content as well as for the individual membrane lipid components.
- The number of quantifiable lipid species did not decrease remarkably with decreasing LMD size, and the lipid composition was also well-retained.
- The method performance was demonstrated by revealing the mouse hippocampus heterogeneity; we have presented different lipidomic patterns for eleven different regions.

ii. Application of the lipidomic platform on in vitro tumor models

- By optimizing the culturing, embedding and cryosection cutting conditions, and by setting up the LMD cutting pattern, we have established the efficient applicability of the lipidomic platform on 4T1 spheroids.
- We have demonstrated gradient-type alterations in several lipid classes between the spheroid edge and core by applying two different LMD cutting patterns. The increasing MUFA/PUFA ratio towards the spheroid core refers to limited nutrient availability, whereas the elevations in the levels of ether PC-O and SM might reflect the higher resistance of cellular membranes of the core cells.
- By applying gradual lipid deprivation, we could mimic the most characteristic lipidomic changes of the 4T1 3D model in 2D cell cultures.

iii. Application of the lipidomic platform on in vivo mouse models

- By examining 4T1 mouse tumor allografts, we have shown characteristic difference in the lipidomic patterns between the proliferative regions of primary

tumors induced in different host organs (lung and subcutaneous fat pad of the breast).

- We have found that the lipid profiles of a primary spleen tumor, its metastases into the liver and lung as well as the different tumorous regions in the given organ are also distinguishable, indicating that the tumor microenvironment of the host organ remarkably affects the lipid composition of the primary tumor.
- A more detailed topological analysis of 4T1 subcutaneous tumors revealed that – within a given tumor – the lipidomic profiles of the proliferative and necrotic regions are markedly different. In addition, it seems that this intratumoral heterogeneity is not overwritten by intertumoral heterogeneity in the examined cases.

iv. *Multionics extension of the lipidomic platform*

- We have worked out a multionics experimental setup, in which we combined lipidomics with proteomics and/or transcriptomics to examine *in vitro* and *in vivo* 4T1 tumor models.
- By using 4T1 spheroids, we have presented in detail the species level alterations behind the MUFA/PUFA, PC-O and SM gradients.
- Similarly to lipidomics, proteomics analysis of 4T1 spheroids revealed gradient-type behaviour for several proteins between the core and edge regions. In the core region, the levels of those proteins that participate in mitochondrial energetics (e.g., oxidative phosphorylation and citrate cycle) upregulated, while those processes that are related to protein synthesis (e.g., ribosomal assembly) downregulated.
- Transcriptomics analysis of 4T1 spheroids revealed that the regulation of gene expression silenced and cell division slowed down in the spheroid core. Surprisingly, the apoptotic and regulated necrotic processes as well as the stress response signalling pathways also downregulated in the core region compared to the spheroid edge.
- We have not found any correlation between the proteomics and transcriptomics data of spheroids, although downregulated gene expression could be detected at both protein and RNA levels.

- In case of a 4T1 subcutaneous tumor, we have examined four selected tumor regions (proliferative, proliferative border, necrotic border and necrotic). Lipidomics showed pattern similarity between the proliferative and proliferative border as well as the necrotic and necrotic border regions, while it revealed sharp difference between the border regions. We observed decrease in PC and increase in PC-O, PE-P, SM, Cer and CE from the proliferative region towards the necrotic area, whereas the alterations in the border regions indicated the activation of several signalling pathways (e.g., AA-signalling).
- We have also registered pronounced pattern difference between the proteomics profiles of the 4T1 subcutaneous tumor border regions. Similarly to the spheroid core, we detected downregulated RNA processing and translation in the necrotic regions compared to the proliferative area. On the other hand, the enzymes of the oxidative phosphorylation were upregulated in the necrotic border region.
- The comparison of 4T1 spheroid and tumor results revealed several lipidomic and proteomic changes that were in agreement in the two models. Consequently, at least in part, the proliferative cells at the spheroid edge are able to model the proliferative cells of the tumor. Similarly, the features of the cells in the spheroid core resemble those that sit in the necrotic tumor regions.
- Altogether, the spatial multiomics investigations of 4T1 tumor models met our expectations, i.e., the developed platform provides exploratory new information which establish the future research directions.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Végtelen hálával és köszönettel tartozom témavezetőmnek, Balogh Gábornak és fogadott témavezetőmnek, Péter Máriának, akik nélkül az elmúlt 5 év munkája és ez a dolgozat nem valósulhatott volna meg. Köszönöm, hogy kitartottak mellettem, hittek bennem, hogy minden helyzetben mellettem álltak, biztattak és energiát, időt, tudást áldoztak annak érdekében, hogy most itt tarthassunk.

Köszönöm Vigh Lászlónak és Török Zsoltnak, hogy csatlakozhattam a Molekuláris Stresszbiológia Csoporthoz, és biztosították a kutatáshoz és fejlesztésekhez szükséges eszközöket és feltételeket, valamint szakmai hozzáértésükkel és tanácsaikkal segítették a munkánkat.

Köszönettel tartozom Marton Annamáriának, aki nélkül nem tudnék ilyen szépen dolgozni a sejtekkel, és aki nélkül az állatkísérletek nem valósulhattak volna meg. Köszönöm Buhala Andreának, hogy bevezetett a szferoidok világába, és megtanította a szferoidkészítés fortélyait. Hálás vagyok Vizler Csabának, hogy biztosította számunkra az egértumormodellek előállításához szükséges feltételeket, eszközöket.

Hálával tartozom Migh Edének, aki nélkül a lézerdisszekciós munkák nem valósulhattak volna meg. Az ő tudása, kitartása, türelme kellett ahhoz, hogy sikeresen optimalizáljuk a kivágási folyamatot. Köszönöm Diósdí Ákosnak, hogy segített a mikroszkópos munkákban. Köszönettel tartozom Horváth Péternek, hogy biztosította a minták szkenneléséhez, valamint a lézerdisszekcióhoz és a szöveti minták elemzéséhez szükséges mikroszkópokat és szoftvereket.

Köszönöm Tiszlavicz Lászlónak a mintáink patológiai elemzését.

Köszönettel tartozom Darula Zsuzsannának és Pettkó-Szandtner Aladárnak a nagy felbontású proteomikai analízisekért, Pintér Lajosnak és Enyedi Mártonnak pedig a lézerdisszekciós minták szekvenálásáért.

Hálás vagyok Kóta Zoltánnak a lipidomikai kiértékelések automatizálásáért, és Gombos Imrének az ábrakészítésben nyújtott segítségével. Köszönöm Hunya Ákosnak, hogy megtanította a sejtenyésztés alapjait, és bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel. Nagyon köszönöm Zukic Erikának, hogy bevezetett a lipidextrakció és a mintaelőkészítés rejtelmeibe, valamint a biztató szavakat és bátorítást, amit az évek során tőle kaptam. Köszönöm Tóth Melindának és Dukay Brigittának, hogy megtanítottak egereket boncolni, szerveket feldolgozni, metszeteket készíteni.

Köszönettel tartozom csoportunk többi volt és jelenlegi tagjának, Horváth Ibolyának, Glatz Attilának, Tiszlavicz Ádámnak, Gudmann Péternek, Pilbat Ana-Mariának, Bozóné Tóth Katának és Szabó Editnek, hogy segítették a munkámat.

Nagyon köszönöm Ruppert Zsófiának, hogy mind szakmailag, mind barátilag végig számíthattam rá.

Mérhetetlen hálával tartozom legjobb barátnőmnek, Dukic Barbarának, aki már több, mint 10 éve életem gyakorlatilag minden pillanatában ott van velem, így a doktori munkámat is teljes egészében végigkísérte, mindvégig bátorított, erősített.

Millió köszönet férjemnek, Dr. Varga Borisznak, aki mindig hitt bennem. Mind szakmailag, mind érzelmileg végig mellettem állt és támogatott, a nehéz pillanatokban pedig képes volt lelket önteni belém és új erőt adni.

Elmondhatatlan hálával tartozom Édesanyámnak, hogy végig mellettem állt és mindent megtett azért, hogy az életemben idáig eljuthassak. Szavakkal nem lehet kifejezni, hogy mi mindent köszönhetek neki. Nélküle ma nem tartanék itt.

Szeretném megköszönni bátyáimnak és az egész családomnak a bizalmat és támogatást. Ilyen biztonságot adó családi háttér mellett valósulhatott csak meg a munkám.

Végül pedig szeretném megköszönni kisfiamnak, Varga Konrádnak, hogy még pocaklakóként lehetővé tette a dolgozathoz szükséges utolsó kísérletek elvégzését, a dolgozat megírását és a házi védést, születése után pedig egy csodálatos új élet ezernyi ajándékával vághattam bele a doktori védési folyamatba.

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10076859

11.1. A doktori eljárás alapját képező közlemények

- **Varga-Zsíros, V.**, Migh, E., Marton, A., Kóta, Z., Vizler, C., Tiszlavicz, L., Horváth, P., Török, Z., Vígh, L., Balogh, G., & Péter, M. (2023). Development of a Laser Microdissection-Coupled Quantitative Shotgun Lipidomic Method to Uncover Spatial Heterogeneity. *Cells*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells12030428>
- Csoboz, B., Gombos, I., Kóta, Z., Dukic, B., Klement, É., **Varga-Zsíros, V.**, Lipinszki, Z., Páli, T., Vígh, L., & Török, Z. (2022). The Small Heat Shock Protein, HSPB1, Interacts with and Modulates the Physical Structure of Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7317. <https://doi.org/10.3390/ijms23137317>

11.2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

11.2.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

- **Varga-Zsíros, V.**, Migh, E., Marton, A., Kóta, Z., Vizler, C., Tiszlavicz, L., Horváth, P., Török, Z., Vígh, L., Balogh, G., & Péter, M. (2023). Development of a Laser Microdissection-Coupled Quantitative Shotgun Lipidomic Method to Uncover Spatial Heterogeneity. *Cells*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells12030428>
(IF2022-2023: 7,666)

11.2.2. Egyéb közlemények

- Csoboz, B., Gombos, I., Kóta, Z., Dukic, B., Klement, É., **Varga-Zsíros, V.**, Lipinszki, Z., Páli, T., Vígh, L., & Török, Z. (2022). The Small Heat Shock Protein, HSPB1, Interacts with and Modulates the Physical Structure of Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7317. <https://doi.org/10.3390/ijms23137317>
(IF2022-2023: 6,208)

összesített IF: 13,874

11.3. A disszertáció témájához kapcsolódó egyéb szakmai anyagok

11.3.1. Konferenciaelőadások

- **Vanda Varga-Zsíros**, Ede Migh, Annamária Marton, Aladár Pettkő-Szandtner, Zoltán Kóta, István Menyhárt, Csaba Vizler, Zsuzsanna Darula, László Tiszlavicz, Péter Horváth, Zsolt Török, László Vígh, Mária Péter, Gábor Balogh: Are 3D cultures able to model in vivo tumor behavior? A spatial lipidomics and multiomics investigation, ICBL, 2023.10.02-05., Palma de Mallorca
- Péter Mária, **Varga-Zsíros Vanda**, Migh Ede, Marton Annamária, Gombos Imre, Kóta Zoltán, Vizler Csaba, Tiszlavicz László, Horváth Péter, Török Zsolt, Vígh László, Balogh Gábor: „Egysejt” lipidomika, 51. Membrán-transzport konferencia, 2022.05.17-20., Sümeg
- **Varga-Zsíros Vanda**, Péter Mária, Migh Ede, Marton Annamária, Gombos Imre, Dukic Barbara, Vígh László, Vizler Csaba, Tiszlavicz László, Horváth Péter, Török Zsolt, Balogh Gábor: A tumorheterogenitás vizsgálata: új, lézerdisszekcióval kombinált nagy felbontású mikrolipidomikai módszer fejlesztése, 50. Membrán-transzport konferencia, 2021.11.16-19., Sümeg, Poszter Díj előadás
- **Vanda Varga-Zsíros**, Mária Péter, Ede Migh, Annamária Marton, Imre Gombos, Barbara Dukic, Zoltán Kóta, Péter Horváth, László Tiszlavicz, Csaba Vizler, Zsolt Török, László Vígh, Gábor Balogh: Development of a laser dissection-coupled quantitative microlipidomic method to resolve tumor heterogeneity, ICBL, 2021.10.12-15, Utrecht
- **Vanda Varga-Zsíros**, Mária Péter, Ede Migh, László Tiszlavicz, Zsolt Török, Ibolya Horváth, Péter Horváth, László Vígh, Gábor Balogh: Investigation of lipid metabolism microheterogeneity in tumors – increasing fine resolution, online 9. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia (IDK2020), 2020.11.27-28.
- Balogh Gábor, Péter Mária, **Zsíros Vanda**, Török Zsolt, Horváth Ibolya, Vígh László: A lipid tömegspektrometria új útjai: "shotgun" mikrolipidomika és metabolomika, 49. Membrán-transzport konferencia, 2019.05.14-17., Sümeg

11.3.2. Poszterek

- **Varga-Zsíros Vanda**, Migh Ede, Marton Annamária, Kóta Zoltán, Vizler Csaba, Tiszlavicz László, Horváth Péter, Török Zsolt, Vígh László, Péter Mária, Balogh

- Gábor: Lipidmetabolikus változások a tumoragresszivitás hátterében, 52. Membrán-transzport konferencia, 2023.05.16-19., Sümeg
- **Vanda Varga-Zsíros**, Mária Péter, Ede Migh, Annamária Marton, Aladár Pettkó-Szandtner, Imre Gombos, Zoltán Kóta, Péter Horváth, László Tiszlavicz, Zsuzsanna Darula, Csaba Vizler, Zsolt Török, László Vígh, Gábor Balogh: Laser dissection-coupled quantitative microlipidomic method to resolve tumor heterogeneity, GISM Annual meeting, 2022.10.20-21., Torino
 - **Vanda Varga-Zsíros**, Mária Péter, Ede Migh, Annamária Marton, Aladár Pettkó-Szandtner, Imre Gombos, Barbara Dukic, Zsuzsanna Darula, Csaba Vizler, László Tiszlavicz, Péter Horváth, László Vígh, Zsolt Török, Gábor Balogh: Investigation of tumor heterogeneity: novel, laser microdissection-coupled lipidomic method, Straub-napok, 2022.05.25-27., Szeged
 - **Varga-Zsíros Vanda**, Péter Mária, Migh Ede, Marton Annamária, Gombos Imre, Dukic Barbara, Vígh László, Vizler Csaba, Tiszlavicz László, Horváth Péter, Török Zsolt, Balogh Gábor: A tumorheterogenitás vizsgálata: új, lézerdisszekcióval kombinált nagy felbontású mikrolipidomikai módszer fejlesztése, 50. Membrán-transzport konferencia, 2021.11.16-19., Sümeg
 - **Vanda Varga-Zsíros**, Mária Péter, Ede Migh, Annamária Marton, Imre Gombos, Barbara Dukic, Zsolt Török, Csaba Vizler, László Tiszlavicz, Péter Horváth, László Vígh, Gábor Balogh: Development of a laser dissection-coupled quantitative microlipidomic method, The virtual 45th FEBS Congress, 2021.07.03-08.
 - **Vanda Zsíros**, Mária Péter, Ede Migh, László Tiszlavicz, Zsolt Török, Ibolya Horváth, Péter Horváth, László Vígh, Gábor Balogh: Investigation of lipid metabolism microheterogeneity in tumors, increasing fine resolution, Straub-napok, 2019.05.30-31., Szeged
 - **Zsíros Vanda**, Péter Mária, Migh Ede, Tiszlavicz László, Török Zsolt, Horváth Ibolya, Horváth Péter, Vígh László, Balogh Gábor: A lipidmetabolizmus mikroheterogenitásának vizsgálata tumorokban, a finomfelbontás növelése, 49. Membrán-transzport konferencia, 2019.05.14-17., Sümeg