

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Varga-Zsíros Vanda

Témavezető: Dr. Balogh Elek Gábor
tudományos főmunkatárs



**HUN
REN**



Biokémiai Intézet
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola
Természettudományi és Informatikai Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2024

Bevezetés

A rák terápiákkal szembeni ellenállóképesége az egyik fő egészségügyi probléma és egyben az egyik legfontosabb kutatási terület.

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 (lipid)metabolizmus átprogramozódása ma már a malignitás egyik védjegyeként ismert, értelmezéséhez pedig elengedhetetlen a kvantitatív bioanalitikai módszerek fejlesztése. 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. A hatékony tömegspektrometriai képalkotó technikák nagy felbontás elérésére képesek, de sokszor csak kvalitatív információt szolgáltatnak. Alternatív megoldást jelenthetnek 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.

Célkitűzés

Doktori munkámban az alábbi célokat tűztem ki:

Lipidomikai módszerfejlesztés

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

A lipidomikai platform alkalmazása in vitro tumormodelleken

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

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.

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.

Alkalmazott módszerek

2D és 3D sejtkultúrák

A módszerfejlesztéshez HeLa-Kyoto humán adenokarcinóma sejtvonalat, míg az *in vitro* 2D és 3D, valamint az egér allograft tumormodellek előállításához tripla-negatív 4T1 egéremlőtumor-sejtvonalat használtunk. A szferoidokat egyesével OCT-be ágyazva fagyasztottuk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Egészövetminták és egértumormodellek

A módszerfejlesztési vizsgálatokban cervikális diszlokációt követően eltávolítottuk az egér máját, veséjét és agyát. Az allograft modellek előállításához az egereket 4T1 sejtekkel oltottuk, majd 22 nap elteltével eltávolítottuk a tumort és a tumoros szerveket. A mintákat OCT-be ágyazva fagyasztottuk és felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Metszetkészítés és hematoxin–eozin (HE)-festés

Az OCT-be ágyazott szferoidokból és szövetekből $10\text{ }\mu\text{m}$ vastag párhuzamos metszeteket készítettünk Leica CM1860 UV kriosztáttal $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A metszeteket vagy tárgylemezre helyeztük és hisztológiai elemzéshez HE-festést végeztünk, vagy membránnal bevont tárgylemezre kerültek a későbbi lézer-mikrodisszekcióhoz.

Nagy felbontású mikroszkópia és a kivágandó régiók kijelölése

A natív metszetekről készült világos látóterű és/vagy autofluoreszcens, valamint a HE-festett metszetekről készült nagy felbontású képek ko-regisztrációját követően a kivágandó régiók kijelölését a Biology Image Analysis Software-rel végeztük el.

Automatizált lézer-mikrodisszekció (LMD)

Az analizálni kívánt területek kivágásához Leica LMD6000 vagy LMD7000 típusú, állítható és flexibilis dióda-pumpált szilárdtest lézerral felszerelt lézerdisszekciós mikroszkópot használtunk. Az LMD-t követően a lefelé kieső mintadarabokat egyenként fogtuk fel egy 96 lyukú mikrolemezben (lipidomika) vagy 0,5 mL-es PCR-csővekben (proteomika és transzkriptomika).

Lipidextrakció

A 2D kultúrákból készített sejtpelleteket egyfázisú metanolos lipidextrakciónak vetettük alá, az extraktumokat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az LMD minták esetében az azokat tartalmazó mikrolemezben egy lépéses, egyfázisú *in situ* lipidextrakciót végeztünk a doktori munkám során kifejlesztett szolvensrendszerrel.

Shotgun lipidomikai analízis

Az LMD minták tömegspektrometriai (MS) lipidanalízisét robotizált nanoforrással (TriVersa NanoMate) felszerelt nagy pontosságú és nagy felbontású Orbitrap Fusion Lumos tömegspektrométeren végeztük polaritásváltással MS1 és MS_n szkennelési módban közvetlenül a lipidextraktumokat tartalmazó mikrolemezről. A lipidspeciezek azonosításához a LipidXplorer 1.2.8.1 szoftvert, majd az adatok további feldolgozásához saját, Microsoft Excel-ben írt makróinkat alkalmaztuk.

Proteomikai analízis

Az LMD minták proteomikai analízisét a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Kutatócsoportjával kooperációban valósítottuk meg. Az PCR-csővekbe gyűjtött mintákat emésztést

követően egyszer használatos csapdázó minioszlopra vittük, majd Evosep One–Orbitrap Fusion Lumos rendszerrel, adatfüggő LC-MS/MS módszerrel analizáltuk. Az adatkiértékelést és MS1 alapú kvantitálást a Proteome Discoverer 3.0 szoftverrel végeztük.

Transzkriptomika

A 4T1 szferoidokból készült LMD mintákból az újgenerációs szekvenálás NextSeq 500 szekvenáló rendszeren készült, amelyet a DeltaGene biztosított.

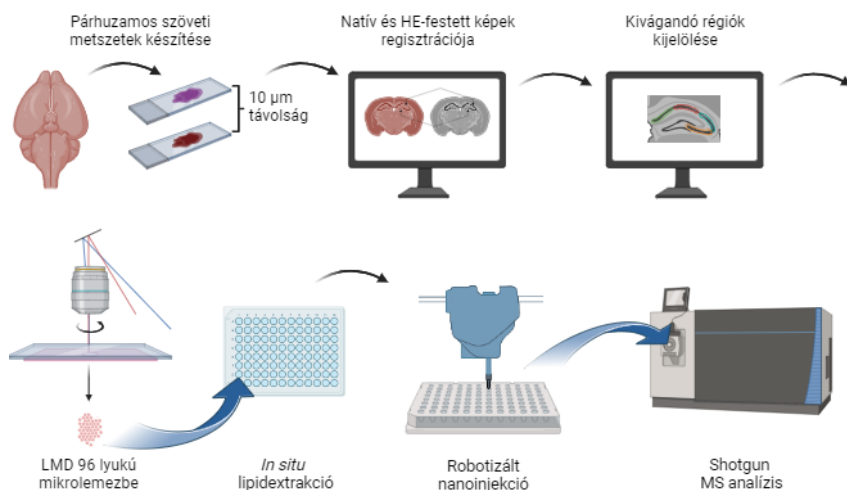
Statisztikai módszerek

A módszervalidálási kísérleteknél a pontosságot a variációs együtthatóval (CV%), a linearitást pedig a determinációs együtthatóval (R²) írtuk le. A lipidomikai és proteomikai adatok többváltozós statisztikai analíziséhez a MetaboAnalyst szoftvert használtuk. Az adatok páronkénti összehasonlításához kétmintás t-próbát alkalmaztunk FDR korrekcióval. A fehérjék GO-kategóriák szerinti elemzése a ShinyGO online szoftverrel történt. Az útvonalelemzéseket fehérjék esetén a Pathview R kód felhasználásával a ShinyGO KEGG statisztikája alapján ábráztuk. Az RNAseq adatokat a Reactome adatbázis és szoftver segítségével elemeztük.

Eredmények

Lipidomikai módszerfejlesztés (Varga-Zsíros és mtsai, 2023)

- Kidolgoztunk egy lézer-mikrodisszekcióval kapcsolt shotgun lipidomikai eljárást, amely egyszerű, gyors, kvantitatív, jó lefedettséget (több száz lipidspeciesz) és nagy térbeli felbontást (~ 80 μm) biztosít (**1. ábra**).



1. ábra: Lézer-mikrodisszekcióval kapcsolt, kvantitatív shotgun lipidomikai módszer folyamatábrája

- A módszerfejlesztés során optimalizáltunk egy egyfázisú oldószerelegyet, 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.
- 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.

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 szferoidmodelleken.
- Kétféle LMD-séma alkalmazásával is bemutattuk több lipidosztály gradiens típusú változását a szferoid széle és belseje között. A szferoid belseje felé detektált monoén/polién arány növekedése korlátozott tápanyag-hozzáférésre, míg az alkil kötésű foszfatidilkolin és szfingomielin emelkedése a szferoid magjában elhelyezkedő sejtek membránjainak nagyobb ellenállóképességére utalhat.
- A 4T1 3D sejt kultúra legmarkánsabb lipidváltozásait graduális lipidmegvonással 2D sejttenyészetben is sikerült kimutatni.

A lipidomikai platform alkalmazása in vivo egértumormodelleken

- 4T1 tumorallograftok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a különböző gazdaszervekben létrehozott primer egértumороk proliferatív régióinak lipidmintázata karakterisztikusan különbözik. Feltártuk továbbá, hogy egy primer léptumor és annak májba,

valamint tüdőbe adott metasztázisai 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.

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 monoén/polién, az alkil foszfatidilkolin és a szfingomielin gradiens hátterében meghúzódó speciesz szintű változásokat.
- A 4T1 szferoidok proteomikai elemzése számos fehérje esetében mutatott ki gradiens típusú viselkedést a szferoid centruma és széle között. A szferoid belsejében a mitokondriális energetikai folyamatokban résztvevő fehérjék szintje emelkedett, míg a fehérjeszintézissel kapcsolatos folyamatok lehalkultak.
- A 4T1 szferoidok transzkriptomikai elemzése feltárta, hogy a génexpresszió szabályozása RNS-szinten is lehalkult, és a sejtek osztódása a szferoid magjában rendkívül lelassult. Meglepő módon az apoptotikus és a szabályozott nekrotikus folyamatok, valamint a

stresszválással kapcsolatos jelátviteli utak ugyancsak lecsendesedtek a szferoid magjában a széli régióhoz képest.

- A 4T1 szubkután tumor esetében négy kiválasztott tumorrégiót (proliferatív, proliferatív határ, nekrotikus határ és nekrotikus) vizsgáltunk. A lipidomikai és proteomikai analízis a proliferatív, illetve nekrotikus területek lipidmintázatbeli hasonlóságát, továbbá a határ menti régiók éles elkülönülését mutatta ki.
- A 4T1 szferoid- és tumoreredmények összehasonlítása számos egybecsengő lipidomikai és proteomikai változást tárt fel. A legfontosabb, hasonlóságot mutató lipidomikai jellemzők a diacil foszfatidilkolin csökkenése, valamint az alkil foszfatidilkolin, a szfingomielin és a koleszteril-észter növekedése voltak a szferoid magjában, illetve a tumor nekrotikus régióiban a megfelelő proliferatív területekhez képest. Ezekről a változásokról ismert, hogy korrelációban állnak a tumor agresszivitásával. A legfontosabb proteomikai egyezésnek azt találtuk, hogy a szferoid belsejéhez hasonlóan a tumor nekrotikus területein is lehalkult az RNS-processzálas és a transzláció a tisztán proliferatív területhez képest. Omikai adataink alapján tehát 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 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.

Summary

The ability of cancer to develop resistance to therapy is a major health problem and one of the most important research topics. Lipid metabolic reprogramming is a newly recognized hallmark of malignancy. For understanding the aggressiveness and metastatic potential of tumors, it is required to develop quantitative bioanalytical tools that enable good coverage of tissue components with high spatial resolution. Laser dissection-coupled mass spectrometry-based techniques offer alternatives to achieve this challenge.

In the first part of my PhD thesis, I presented the development of a laser microdissection-coupled shotgun lipidomic platform, which is simple, fast, quantitative, and enables good coverage (hundreds of lipid species) with high spatial resolution ($\sim 80 \mu\text{m}$). The method validation has revealed excellent extraction efficiency, reproducibility, linearity of quantification as well as well-retained lipid composition over the examined dissected tissue area range.

In the second part of my thesis, I presented the extension of the platform to a multiomics experimental setup, in which we combined lipidomics with proteomics and/or transcriptomics to examine *in vitro* and *in vivo* tumor models. We have found several lipidomic and proteomic changes that were in agreement in the two models. The most important matching lipidomic alterations were the decrease in diacyl phosphatidylcholine as

well as the increase in ether phosphatidylcholine, sphingomyelin, and cholesteryl ester in the spheroid core and the tumor necrotic regions compared with the corresponding proliferative areas. These changes are all known to correlate with tumor aggressiveness. The most obvious proteomic similarity was the downregulated translation both in the spheroid centre and in the tumor necrotic areas. Therefore, our data allowed to conclude that, at least in part, the proliferative cells at the spheroid edge are able to model the proliferative cells of the tumor, whereas 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.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10076859

Összesített IF: 13,874

A doktori eljárás alapját képező közlemények

- **Varga-Zsíros, V.**, Migh, E., Marton, A., Kóta, Z., Vizler, C., Tizslavicz, 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>

Referált folyóiratban megjelent közlemények

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

- **Varga-Zsíros, V.**, Migh, E., Marton, A., Kóta, Z., Vizler, C., Tizslavicz, 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)

Egyéb közelmények

- Csoboz, B., Gombos, I., Kóta, Z., Dukic, B., Klement, É., **Varga-Zsíros, V.**, Lipinszki, Z., Páli, T., Vigh, 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)

Egyéb szakmai anyagok

Konferenciaelőadások

- 63rd ICBL, 2023 (Palma de Mallorca)
- 51. Membrán-transzport konferencia, 2022 (Sümeg)
- 50. Membrán-transzport konferencia, 2021 (Sümeg), Poszter Díj
- 61st ICBL, 2021 (Utrecht)
- 9. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, 2020 (online)
- 49. Membrán-transzport konferencia, 2019 (Sümeg)

Poszterek

- 52. Membrán-transzport konferencia, 2023 (Sümeg)
- GISM Annual meeting, 2022 (Torino)
- Straub-napok, 2022 (Szeged)
- 50. Membrán-transzport konferencia, 2021 (Sümeg)
- The virtual 45th FEBS Congress, 2021
- Straub-napok, 2019 (Szeged)
- 49. Membrán-transzport konferencia, 2019 (Sümeg)

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Balogh Elek Gábor**, a jelölt (**Varga-Zsíros Vanda**) témavezetőjeként kijelentem, hogy a disszertáció a jelölt saját munkája, amelyet a témavezetésem mellett önállóan készített el. Kijelentem, hogy a disszertáció megfelel az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola formai és tartalmi követelményeinek.

2024. 02. 29.

Balogh Gábor
tudományos főmunkatárs
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem **Varga-Zsíros Vanda** PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „**Nagy térbeli felbontású, kvantitatív lipidomikai platform fejlesztése és multiomikai kiterjesztése a tumorképződés vizsgálatára**” című disszertációját.

Felelős szerzőként kijelentem, hogy Varga-Zsíros Vanda jelentősen hozzájárult az alábbi, a doktori eljárás alapjául szolgáló tudományos publikáció eredményéhez:

- Varga-Zsíros, V., Migh, E., Marton, A., Kóta, Z., Vizler, C., Tislavicz, 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>

Igazolom továbbá, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

2024. 02. 29.

Balogh Gábor
tudományos főmunkatárs
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont