

Spatial omics to quantitatively study tissue heterogeneity

Citation for published version (APA):

Dewez, F. (2021). *Spatial omics to quantitatively study tissue heterogeneity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20211125fd>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20211125fd](https://doi.org/10.26481/dis.20211125fd)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

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

[Link to publication](#)

General rights

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

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

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

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Molecular interactions are fundamental for an organism to live, reproduce or interact with its environment. These biological processes are characterized by complex interactions that occur in and between cells. Cells are the smallest units of life and constitute the “building blocks of life”. In multicellular organisms, cells organize themselves spatially to form tissues and organs with each their dedicated biological function. Hence, the investigation of cellular processes requires an approach that takes the spatial context of the cells and thus the thousands of biomolecules into consideration. High-throughput technologies with spatially resolved capabilities are therefore required to identify and quantify these biomolecules.

Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) is a molecular imaging technique that extends the analytical capability of mass spectrometry to spatially resolved analysis of tissue sections. The strengths of MALDI-MSI are the simultaneous analysis of hundreds to thousands of compounds with the possibility of combining its data with other imaging modalities or analytical methods. The combination of MALDI-MSI with analytical methods is of great interest as MALDI-MSI consists of the direct analysis from tissue section without the use of separation steps. This specificity can result in a poor molecular characterization and the detection of mainly abundant molecules. Therefore a coupling with other analytical techniques that are extraction-based approaches and, therefore, more sensitive such as liquid-chromatography mass spectrometry (LC-MS) has the potential of becoming a powerful complementary tool in translational biomedical research. However, this coupling requires the microdissection of the regions of interest, which are highlighted by MSI, by a laser microdissection system (LMD) while retaining the spatial information. Moreover, accurate co-registration between the MSI data and the LMD system is required due to technological advances in MALDI-MSI that now reach single-cell level. In **chapter 2**, I achieved an accuracy of 13 μm that corresponds to resolutions employed routinely in MALDI-MSI. In this chapter, MALDI-MSI of lipids followed by a segmentation were performed on a breast cancer tissue. After image processing, the coordinates of the MSI-

detected segments were accurately transferred to the laser microdissection system for subsequent analysis. This work constitutes the first study that reports the accuracy of a coupling between MSI and a laser microdissection system. In **chapter 3**, I applied this approach to perform a multivariate spatial and quantitative characterization of molecular intratumor heterogeneity in tumor breast samples. First, I analyzed a tissue section at lipid level by MALDI-MSI revealing spatial and molecularly distinct tumor cell clusters that were further submitted to LC-MS. This provided quantitative information of several thousand proteins which enabled to deeply delve into the proteome of these cell subpopulations. Moreover, in this chapter, we employed the state-of-the-art mass spectrometer that enables to perform MALDI-MSI and LC-MS experiments on a single instrument.

MALDI-MSI is a semi-quantitative method due to fundamental chemical processes of the MALDI approach. This technique involves analyte extraction, crystallization, desorption, ionization efficiency, and ion suppression accentuated by the absence of chromatographic separation. Therefore, obtaining absolute quantitative data remains challenging. These challenges can be, in part, overcome by the use of an internal standard which is a structural analog or a stable isotope of the molecule of interest. This internal standard is then sprayed on top of the tissue section. In **chapter 4**, I developed a new spatial univariate quantitative method that makes use of several isotopic labeled versions of a molecule of interest. These standards are homogeneously sprayed in different concentrations onto the tissue. This enables the creation of internal calibration curves at every MSI pixel that reflects and accounts for the difference in signal response due to local histology-dependent ion suppression. This new multi-label approach enables to quantify more accurately target compound concentrations in heterogeneous biological tissues.

This thesis demonstrates two different approaches to obtain quantitative data from heterogeneous tissue in a spatially resolved context. On one hand, this work presents a spatial omics workflow that enables to obtain the spatial distribution with quantitative information of thousands of biomolecules, albeit with the use of dissected material. On the other hand, the thesis presents

a more targeted approach that enables to quantify a target compound within heterogeneous cell populations. Both approaches could constitute powerful analytical tools to obtain more accurate and more comprehensive information on the location and abundances of molecules within specific cells.

Samenvatting

Moleculaire interacties zijn fundamenteel voor een organisme om te leven, zich te reproduceren of te interageren met hun omgeving. Deze biologische processen zijn gekenmerkt door complexe interacties die plaats vinden in en tussen cellen. Cellen zijn de kleinste levende eenheden en vormen de 'bouwstenen van het leven'. In meercellige organismen zijn cellen namelijk in staat om zichzelf ruimtelijk te organiseren in de vorm van weefsels en organen waarbij elke cel zijn eigen biologische functie heeft. Onderzoek naar cellulaire processen heeft er bijgevolg alle belang bij dat de ruimtelijke ordening van de cellen alsook de duizenden biomoleculen bewaard kan blijven. High-Throughput technologieën die de ruimtelijke oriëntatie behouden, zijn bijgevolg essentieel om biomoleculen niet alleen te identificeren maar ook te kwantificeren.

MALDI-MSI is een moleculaire beeldvormingstechniek die gebruik maakt van de analytische methode van massa spectrometrie en deze verder uitbreidt naar hun ruimtelijke ordening in het weefsel. MALDI-MSI is in staat om honderden tot duizenden componenten gelijktijdig te analyseren. MSI data kan gecombineerd worden met andere beeldvormingstechnieken of andere analytische methodes. De combinatie van MALDI-MSI met andere analytische methoden is van uitermate belang aangezien MALDI-MSI bestaat uit de directe analyse van weefsel secties zonder gebruik te maken van enige scheidingsstappen. Deze specificiteit kan resulteren in slechte moleculaire karakterisering en detectie van enkel de meest abundante moleculen.

MSI combineren met andere analytische technieken die gebaseerd zijn op extractie en daardoor meer gevoelig zijn zoals bijvoorbeeld

vloeistofchromatografie – massa spectrometrie, kunnen een meerwaarde vormen in translationeel biomedisch onderzoek. Deze combinatie vereist echter de microdissectie van de door MSI gemarkeerde interessegebieden met behulp van een laser microdissectie systeem (LMD). Tijdens dit proces wordt de ruimtelijke informatie behouden. Dit proces vereist accurate co-registratie tussen de MSI data en het LMD systeem. Door technologische ontwikkelingen kan MALDI-MSI een zeer hoge resolutie bereiken tot op het niveau van één enkele cel. In **hoofdstuk 2** kon ik een nauwkeurigheid van 13 μm bereiken. Dit komt overeen met resoluties die routinematig worden gebruikt in MALDI-MSI. In dit hoofdstuk, MALDI-MSI van lipiden gevolgd door segmentatie werd uitgevoerd op borstkanker weefsel. Na het verwerken van de afbeeldingen werden de coördinaten van de door MSI gedetecteerde segmenten nauwkeurig getransfereerd naar het LMD systeem voor verdere analyse. Dit werk rapporteert als eerste de nauwkeurigheid van de combinatie van MSI en LMD. In **hoofdstuk 3** heb ik deze benadering toegepast op tumorweefsel van borstkanker om zo intratumorale heterogeniteit op een multivariate, ruimtelijke en kwantitatieve manier te karakteriseren. Eerst heb ik een weefsel sectie geanalyseerd op lipiden met MALDI-MSI waarbij zo de ruimtelijk, moleculaire en duidelijk te onderscheiden tumor cellen clusters zichtbaar werden. Deze tumorcellen werden dan verder geanalyseerd met LC-MS. De combinatie van MALDI-MSI met LC-MS zorgde voor kwantitatieve informatie van enkele duizenden proteïnen. Deze gedetailleerde informatie maakt het mogelijk zich te verdiepen in het proteoom van deze cel subpopulaties. Bovendien hebben we in dit hoofdstuk gebruik gemaakt van een state-of-the-art massa spectrometer dat in staat is om MALDI-MSI en LC-MS experimenten in één enkel instrument uit te voeren.

MALDI-MSI kan beschouwd worden als een semi-kwantitatieve methode veroorzaakt door de fundamentele chemische processen van het MALDI proces. Deze processen omvatten analiet extractie, kristallisatie, desorptie, ionisatie efficiëntie en ion-suppressie die dan nog eens versterkt worden door de afwezigheid van chromatografische scheiding. Absolute kwantitatieve data met behulp van MSI blijft een uitdaging, doch kan dit deels opgelost worden door gebruik te maken van interne standaarden. Deze interne standaard kan een structureel analoog zijn of een stabiel isotoop van het specifiek molecuul. Deze standaard worden dan gesprayd bovenop het weefsel. In **hoofdstuk 4** hebben wij een nieuwe ruimtelijke univariate kwantitatieve methode ontwikkeld die gebruik maakt van verschillende isotoop gelabelde versies van een specifiek molecuul. Deze werden homogeen in verschillende concentraties op het weefsel gesprayd. Met behulp van deze methode is het mogelijk om voor elke MSI-pixel interne calibratie curven te maken. Deze curven weerspiegelen en houden rekening met het verschil in signaalrespons ten gevolge van lokale ion-suppressie. Op die manier is het mogelijk om de exacte concentratie van het specifiek molecuul te bepalen.

Dit proefschrift beschrijft twee verschillende benaderingen om kwantitatieve gegevens te verkrijgen uit heterogeen weefsel waarbij de ruimtelijke informatie behouden blijft. Aan de ene kant presenteert dit werk een ruimtelijke ‘omics’ workflow die het mogelijk maakt om niet alleen de ruimtelijke distributie van duizenden biomoleculen te verkrijgen maar ook kwantitatieve informatie, al dan niet door gebruik te maken van ontleed materiaal. Anderzijds, presenteert het een meer gerichte aanpak die het mogelijk maakt om een specifiek molecuul van belang te kwantificeren

binnen heterogene cel populaties. Beide benaderingen zouden krachtige analytische instrumenten kunnen vormen om meer nauwkeurig en uitgebreide informatie te verkrijgen over de plaats en de abundanties van verschillende moleculen binnen specifieke cellen.