



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Engineering a metabolomics workflow to capture single-cell diversity in 3D models

Hetzel, L.A.

Citation

Hetzel, L. A. (2026, September 9). *Engineering a metabolomics workflow to capture single-cell diversity in 3D models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4309354>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4309354>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Cellulaire heterogeniteit speelt een cruciale rol bij ziekteprogressie, therapierespons en het ontstaan van therapieresistente subpopulaties. Toch blijven de onderliggende biochemische verschillen tussen individuele cellen vaak onopgemerkt, omdat huidige analysemethoden deze variatie overschaduwten of niet toepasbaar zijn onder fysiologisch relevante omstandigheden. Dit proefschrift presenteert een geïntegreerde workflow voor het vastleggen van metabolische diversiteit op single-celniveau binnen 3D-modellen. Deze workflow combineert computationele innovaties, verbeterde gasfase-scheiding en geavanceerde microfluidische systemen om de metabolische diepte, nauwkeurigheid en biologische relevantie te vergroten.

Hoofdstuk I bespreekt de klinische en biologische implicaties van cellulaire heterogeniteit, met een specifieke focus op kanker, waar metabolische plasticiteit leidt tot subpopulaties met verschillende overlevingsstrategieën en therapierespons. Het hoofdstuk benadrukt de beperkingen van bulkanalyses en 2D-kweekmodellen, en beschrijft single-cell metabolomics (SCM) als een methode die direct inzicht geeft in de functionele toestand van individuele cellen.

Hoofdstuk II behandelt de computationele uitdagingen van SCM-datasets, waaronder ruis, ontbrekende waarden en hoge complexiteit. Het R-pakket **MeDUSA** wordt geïntroduceerd als een modulaire pijplijn voor data-extractie, filtering, kwaliteitscontrole, normalisatie, imputatie en statistische analyse. Met behulp van mass-defect-filters, intensiteitscriteria en celspecifieke kwaliteitscontroles worden niet-biologische signalen geëlimineerd, terwijl echte biologische variatie behouden blijft. MeDUSA vormt daarmee de computationele basis voor de experimentele hoofdstukken.

Hoofdstuk III richt zich op instrumentele beperkingen, in het bijzonder de beperkte gevoeligheid en de beperkte dekking van het metaboloom bij zeer lage analyt concentraties. Door **High-Field Asymmetric Waveform**

Ion Mobility Spectrometry (FAIMS) te integreren met live single-cell massaspectrometrie wordt achtergrondruis onderdrukt en neemt de selectiviteit toe. Een systematische analyse van verschillende compensation voltages (CV) laat zien dat elke CV-waarde een uniek deel van het metaboloom onthult. De combinatie FAIMS-MS leidde tot een aanzienlijke toename in metabolomische dekking en een verbetering van de massanauwkeurigheid.

Hoofdstuk IV past de volledige workflow toe op een gevasculariseerd 3D-organ-on-chipmodel om variatie in tamoxifen opname tussen individuele cellen te bestuderen. Aanvullende monster voorbereiding was vereist om ECM-componenten te verdunnen en meetstabiliteit te waarborgen. FAIMS bleek essentieel te zijn voor het detecteren van geneesmiddel gerelateerde signalen in een omgeving met hoge chemische ruis. De resultaten tonen duidelijke heterogeniteit in geneesmiddelopname binnen het 3D-model, wat het belang van micro-omgevingsfactoren benadrukt. **Hoofdstuk V** bespreekt de brede toepassing van microfluidische systemen voor organoïden en sferoïden. Verschillende chip ontwerpen, materialen en fabricagetechnieken worden vergeleken op basis van biologische toepassing, stromingsprofielen en compatibiliteit met downstream-analyses. Dit hoofdstuk verduidelijkt hoe ontwerpkeuzes direct invloed hebben op zowel biologische prestaties als analytische mogelijkheden.

Hoofdstuk VI sluit af met een bredere reflectie op de workflow. Hoewel de hier ontwikkelde systemen een robuust fundament vormen voor single-cell metabolomics in complexe modellen, blijven verdere optimalisaties nodig - zoals co-cultuursystemen, integratie met imaging-omics en hogere throughput-capaciteiten. Desondanks demonstreert dit werk dat functionele metabolische heterogeniteit op single-cell niveau nauwkeurig kan worden vastgelegd in een fysiologisch relevante context.

Dit proefschrift presenteert een geïntegreerd raamwerk voor het ontrafelen van biochemische diversiteit in complexe cellulaire systemen en ondersteunt toekomstige toepassingen in precisiegeneeskunde, geneesmiddelontwikkeling en ziekteprogressie onderzoek.