

Molecular Pixelation deckt krebsspezifische Proteinmuster einzelner Zellen auf

- Einsatz von Molecular Pixelation und Illumina-Sequenzierung zur Ermittlung neuer Mechanismen des Immunzellverhaltens
- Bestimmung von Häufigkeit und räumlicher Organisation von 80 Oberflächenproteinen auf 1.000 Einzelzellen je Probe
- Durchführung von Einzelzell-Proteomik-Analysen und Visualisierung kartierter Zelloberflächen mithilfe der Pixelator-Pipeline und des Analysepakets



In Partnerschaft mit



PIXELGEN
TECHNOLOGIES

Nur für Forschungszwecke.
Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.

Einleitung

Der räumlichen Organisation von Membranproteinen kommt bei der Immunzellfunktion eine entscheidende Rolle zu. Sie wirkt sich auf die Ligandenbindung aus und ermöglicht die präzise, gezielte Kommunikation. Beispielsweise verbessert das Clustering von T-Zell-Rezeptoren die Antigenerkennung und regelt die gezielte Abtötung mit Viren infizierter und veränderter Zellen.¹⁻³ Gleichzeitig verstärkt die räumliche Neuordnung von Integrinen die Zelladhäsion und -migration.^{4,5} Neben vielen anderen Prozessen auf zellulärer Ebene können sich auch Krebszellen die Organisation von Membranproteinen zunutze machen. In diesem Zusammenhang lässt sich das erhöhte B-Zell-Rezeptor-Clustering nennen, das bei bestimmten B-Zell-Malignitäten als Krebstreiber fungiert.⁶⁻⁸ Diese Beispiele unterstreichen die Bedeutung der Untersuchung der Proteinorganisation für die Erforschung von Krankheitsprozessen, jedoch weisen derzeitige Proteomik-Verfahren deutliche Einschränkungen bei der Analyse der komplexen Vorgänge an der Zelloberfläche auf.

Die meisten Hochdurchsatzverfahren auf dem Gebiet der Proteomik (z. B. Durchflusszytometrie, Massenzytometrie und Zellindizierung von Transkriptomen und Epitopen) liefern lediglich Ergebnisse zur Proteinabundanz. Zugleich ließ sich die Proteinorganisation auf Einzelzelebene bislang nur mit bildgebenden Verfahren mit geringer Plexität (z. B. Mikroskopie und bildgebende Flusszytometrie) untersuchen. Molecular Pixelation (MPX) ist ein hochmodernes Proteomik-Einzelzellverfahren, das die gleichzeitige Quantifizierung und räumliche Kartierung von 80 Membranproteinen durch biochemische Aufteilung der Zelloberfläche in räumliche Zonen und NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ermöglicht. Im Anschluss an die Pixelation-Schritte und NGS werden die Daten computergestützt zu quantitativen Einzelzelloberflächenkarten

zusammengesetzt, aus denen die Anordnung einzelner Proteinmoleküle hervorgeht ([Abbildung 1](#)).⁹ In diesem Anwendungshinweis wird erläutert, wie sich MPX problemlos auf Illumina-Sequenziersystemen einsetzen lässt und damit eine Fülle neuer Informationen zum Verständnis der Immunzellfunktion und -vielfalt liefert.

Methoden

MPX ist in erster Linie für die Analyse von Immunzellen vorgesehen, einschließlich frischer oder gefrorener peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells), Zelltherapieprodukten und hämatologischen Krebszellen. Das gesamte Protokoll wird für jede Probe in einem einzelnen Reaktionsröhrchen durchgeführt. Die Zellen können gepoolt und sequenziert werden, ohne dass eine Einzelzellisolation erforderlich ist. Die Methode erfordert, dass Zellen suspendiert werden. Hierbei können auch Zugabemengen von nur 50.000 Zellen zum Einsatz kommen. MPX ist mit Sequenzierungsplattformen von Illumina kompatibel. Dies wird hier am NextSeq™ 2000 System (Illumina, Katalog-Nr. 20038897), am NovaSeq™ 6000 System (Illumina, Katalog-Nr. 20012850) und am NovaSeq X Plus System (Illumina, Katalog-Nr. 20084804) gezeigt.

Probenvorbereitung

Im Rahmen dieser Studie wurden gesunde PBMCs mit Immunzell-Karzinomlinien des Leibniz-Instituts DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ([Tabelle 1](#)) verglichen. Das Pixelation-Verfahren wurde mit dem [Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2](#) (Pixelgen, Katalog-Nr. PXGIMM002) gemäß Herstellerprotokoll ([Abbildung 2](#)) durchgeführt. Zur Beibehaltung der Organisation des Membranproteoms wurden die Zellen in eine Lösung gegeben und mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert.



Abbildung 1: Überblick über MPX: Zellen werden mit Antikörper-Oligonukleotid-Konjugaten fixiert und gekennzeichnet, die auf 80 Oberflächenmarker abzielen und diese mit eindeutigen proteinspezifischen Barcodes versehen. DNA A-Pixel werden durch Hybridisierung an die Antikörper gebunden. Durch die hierbei eingefügten Barcodes wird aus benachbarten Bereichen Zone A gebildet, während B-Pixel Barcodes hinzufügen, durch die an Zone A angrenzende Bereiche räumlich zu dieser in Beziehung gesetzt werden. Im Anschluss an die Sequenzierung werden die miteinander in Beziehung gesetzten Zonen computergestützt zu einer quantitativen und räumlichen Darstellung der Proteine an der Oberfläche der einzelnen Zellen zusammengesetzt.

Tabelle 1: Für MPX-Versuche verwendete Karzinomzelllinien

Krebstyp	Zelllinie	DSMZ-Katalog-Nr.
Burkitt-Lymphom	Daudi	ACC 78
	Raji	ACC 319
	Ramos (RA1)	ACC 603
Lymphoblastisches T-Zell-Lymphom	SUP-T1 [VB]	ACC 140
Akute monozytische Leukämie	THP-1	ACC 16

Bibliotheksvorbereitung

Die Zellen wurden gemäß dem MPX-Protokoll in Lösung suspendiert und mit dem enthaltenen Panel von Antikörper-Oligonukleotid-Konjugaten (AOCs, Oligo-Conjugated Antibodies) eingefärbt, die auf 80 Zelloberflächenproteine abzielen. DNA-Pixel, Rolling-Circle-DNA-Amplifikationsprodukte mit einer Größe von ca. 100 nm und jeweils mehreren Kopien eines eindeutigen Barcodes, wurden zu den suspendierten Zellen hinzugegeben. Einzelne DNA-Pixel wurden auf eine begrenzte Anzahl von AOCs in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche hybridisiert. Der DNA-Pixel-Barcode

wurde mithilfe einer lückenschließenden Ligation auf die ligierten Antikörper-Oligos aufgebracht. Durch diese Schritte werden die an die Zelloberfläche gebundenen AOCs in Tausende einzelne lokale Zonen unterteilt, die durch eine gemeinsame DNA-Pixel-Barcodesequenz definiert sind. Dieser Vorgang wurde mit einem zweiten DNA-Pixelsatz wiederholt. Die zwei dadurch generierten Sätze überlappender Zonen ermöglichten die *In-silico*-Rekonstruktion der relativen Position der einzelnen Zonen auf der Zelloberfläche. Die resultierenden Antikörper- und Pixelation-Barcodes wurden durch PCR amplifiziert, wobei probenspezifische Illumina-Sequenzierungsadapter integriert wurden. Vor der Sequenzierung wurden die Amplikons mit AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Katalog-Nr. A63880) aufgereinigt.

Sequenzierung

MPX-Bibliotheken erfordern Paired-End-Sequenzierung. Pixelgen Technologies empfiehlt mindestens 120.000 Read-Paare pro Zelle. Die Anzahl der Proben und der Zellen pro Probe kann je nach Anwendung und verfügbarer Sequenzierungsausstattung angepasst werden (Tabelle 2).

Bibliotheken wurden auf dem NextSeq 2000 System, dem NovaSeq 6000 System und dem NovaSeq X Plus System sequenziert. Die Methode erforderte mindestens Paired-End-Reads von 44 Zyklen für Read 1 und 78 Zyklen für Read 2. Auf dem NextSeq 2000 System wurde das NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20100994) verwendet.

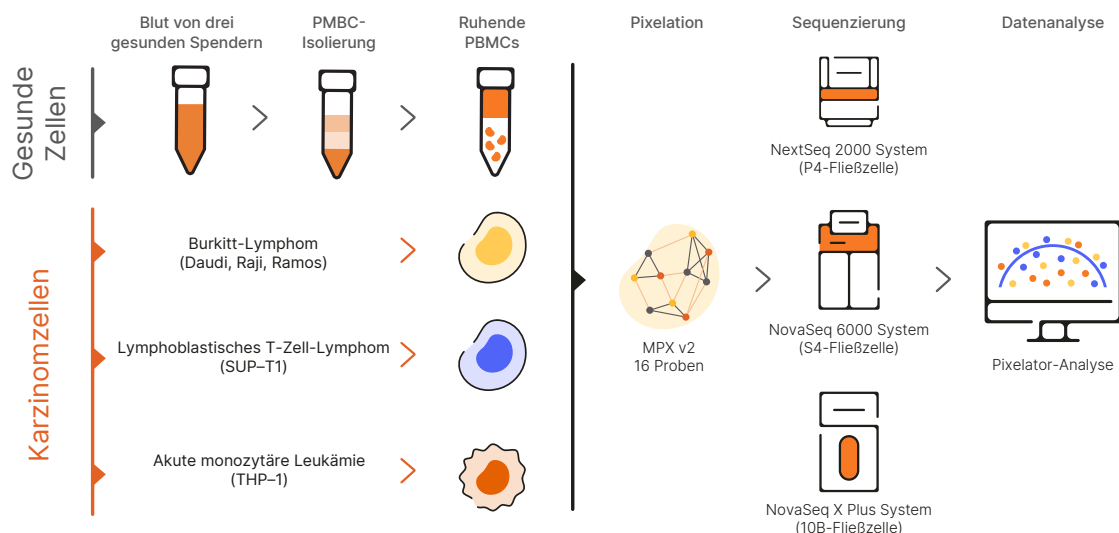


Abbildung 2: MPX-Workflow zum Vergleich gesunder PMBCs mit aus Immunzellen gewonnenen Karzinomlinien: Zellsuspensionen mit PMBCs von einem von drei gesunden Spendern oder einer von fünf aus Immunzellen gewonnenen Karzinomzelllinien wurden zusammengestellt und in doppelter Ausführung mit dem Pixelgen Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2 verarbeitet. Im Anschluss an das MPX-Verfahren wurden die 16 Proben parallel auf dem NextSeq 2000 System, dem NovaSeq 6000 System und NovaSeq X Plus System sequenziert. Die Datenverarbeitung und Visualisierung wurde mit Pixelator 0.18 mit der „nf-core/pixelator“-Pipeline 1.3.0 durchgeführt.

Tabelle 2: Probendurchsatz für einen MPX-Assay auf ausgewählten Illumina-Sequenziersystemen

	NextSeq 2000 System	NovaSeq 6000 System	NovaSeq X Plus System
Fließzelle	P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles)	Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles)	10B Reagent Kit (300 cycles)
Single-Reads (gesamt)	1,8 Mrd.	8–10 Mrd.	10 Mrd.
Ausgabezellen/Reaktion	1.000	1.000	1.000
Empfohlene maximale Anzahl von Reaktionen pro Fließzelle ^a	15 ^b	66	83
Empfohlene maximale Anzahl an Zellen pro Fließzelle ^a	15.000 ^b	66.000	83.000

a. Berechnet anhand von 1.000 Zellen pro Probe und ≥ 120.000 Single-Reads pro Zelle.

b. In diesem Versuch wurden 16 Proben (16.000 Zellen) sequenziert, wodurch insgesamt 2,13 Mrd. Reads auf der P4-Fließzelle generiert wurden.

Die Bibliotheken wurden mit 44×78 Paired-End-Reads sequenziert. Für das NovaSeq 6000 System wurde das NovaSeq Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20043131) verwendet und Bibliotheken wurden mit 150×150 Paired-End-Reads durch National Genomics Infrastructure (NGI) in Stockholm (Schweden) sequenziert. Für das NovaSeq X Plus System wurde das NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20085594) verwendet. Die Bibliotheken wurden mit 150×150 Paired-End-Reads durch die Clinical Genomics Platform in Stockholm (Schweden) sequenziert. Weitere Empfehlungen zur Read-Konfiguration und zum PhiX-Spike-in finden Sie auf der [Website von Pixelgen Technologies](#).

Datenanalyse und Visualisierung

Sequenzierungs-Reads wurden mit der Pixelator-Pipeline (Open-Source) verarbeitet, die im Rahmen der „nf-core“-Initiative [nf-core/pixelator](#) verfügbar ist. Mit Pixelator wurden die Oberflächenproteinkarten einzelner Zellen rekonstruiert sowie Ausgabedateien für die Qualitätskontrolle und Analyse generiert. Neben den PXL-Dateien mit den verarbeiteten Daten für die nachgeschaltete Analyse, Statistiken und Darstellungsgenerierung wurde von Pixelator ein Webbericht mit einer Zusammenfassung wichtiger Qualitätsmetriken zum Versuch erstellt.

Die PXL-Dateien ließen sich leicht mit gängigen Einzelzell-Omik-Analysertools verarbeiten, darunter Scanpy und Seurat. Die Dateien enthielten vier primäre Elemente: Proteinabundanzwerte für sämtliche Proteine und alle Zellen, MPX-Polaritätsscores für sämtliche Proteine und alle Zellen, MPX-Kolokalisationsscores für den paarweisen Vergleich aller in jeder Zelle enthaltenen Panelproteine und eine Edge-Liste mit den Daten zur Generierung grafischer Darstellungen einzelner Zellen sowie die Informationen für räumliche Statistikberechnungen. [Unterstützung bei der MPX-Analyse sowie Tutorials](#) sind auf der Website von Pixelgen Technologies verfügbar.

Ergebnisse

MPX ist mit aktuellen Illumina-Sequenziersystemen mit mittlerem bis hohem Durchsatz kompatibel. Für den entsprechenden Nachweis wurde eine PBMC-Probe wie angegeben mit MPX vorbereitet und auf drei verschiedenen Illumina-Plattformen (NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System und NovaSeq X Plus System) sequenziert. Die PXL-Datendateien wurden analysiert und ihre Qualität wurde mit dem R-Paket [pixelatorR](#) (v0.10.2) bewertet. Komponenten mit extremen Größen und vermuteten Aggregaten wurden vor der nachgeschalteten Analyse entfernt. Die Rohwerte wurden mithilfe der CLR-Transformation (Centered Log-Ratio Transformation, zentrierte Log-Ratio-Transformation)¹⁰ normalisiert und als mittlerer CLR-Wert pro Marker zusammengefasst. Durch Vergleich der MPX-Ergebnisse zur Abundanz wurde bestätigt, dass sich mit den Illumina-Sequenzierungsplattformen Ergebnisse von ähnlicher Qualität erzielen lassen ([Abbildung 3](#)).

Die Kombination aus Proteinabundanz und räumlicher Analyse auf Einzelzellebene bietet das Potenzial für eine weitreichende Phänotypisierung und die ausführliche Charakterisierung des Immunzellverhaltens. Dies wurde durch den Vergleich von hämatologischen Karzinomzelllinien mit gesunden Immunzellen in Bezug auf Proteinabundanz ([Abbildung 4](#)), Proteinpolarisation ([Abbildung 5](#)) und Proteinkolokalisation ([Abbildung 6](#)) nachgewiesen.

Beispielsweise konnte anhand von Burkitt-Lymphomzelllinien gezeigt werden, dass sich der Inhalt von Multiproteindomänen ändert, wobei Proteine wie das Therapieziel CD40 von tetraspaninreichen Domänen getrennt werden, während CD38 angereichert wird. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass die Ligation von CD40 mit Antikörperwirkstoffen in gesunden B-Zellen und Burkitt-Lymphomzellen entgegengesetzte Reaktionen hervorruft.¹¹ Die MPX-Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CD40-Organisation ein Treiber für diese unterschiedlichen Reaktionen sein könnte ([Abbildung 6](#)).

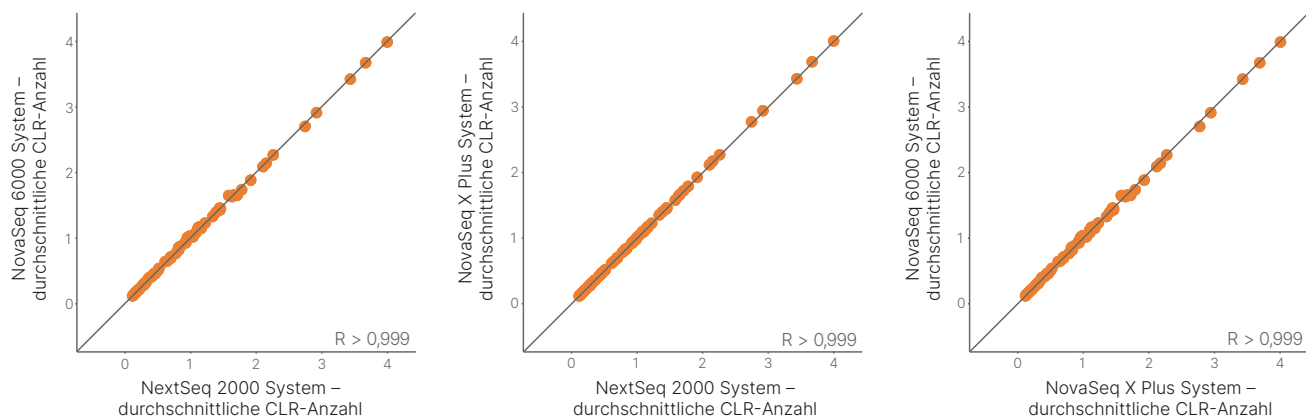


Abbildung 3: Korrelation zwischen MPX-Ergebnissen der Illumina-Sequenziersysteme: Auf drei Illumina-Plattformen (NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System und NovaSeq X Plus System) sequenzierte MPX-Daten aus einer einzelnen PBMC-Probe wurden mit dem R-Paket PixelatorR (v0.10.2) analysiert. Die Rohwerte wurden mit der CLR-Transformation¹⁰ normalisiert und im mittleren CLR-Wert pro Marker zusammengefasst. Die lineare Korrelation zwischen allen drei Systemen über alle Marker hinweg ist signifikant (p -Wert $\leq 0,0001$).

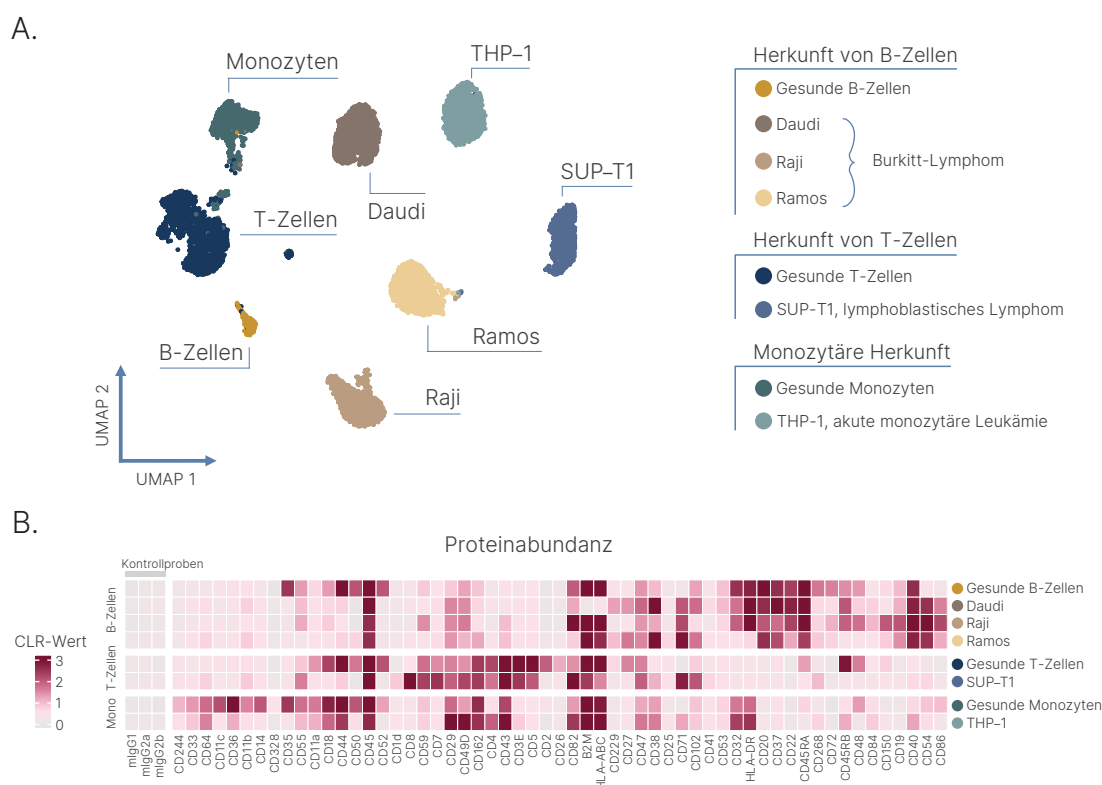


Abbildung 4: MPX stellt die Abundanz unterschiedlicher Oberflächenproteine in PBMCs und aus Immunzellen gewonnenen Krebslinien dar: (A) Multidimensionales Clustering von PBMC-T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und den fünf Karzinomzelllinien, basierend auf der Expression aller Immunpanelmarker. (B) Heatmap der medianen CLR-bereinigten Abundanzniveaus aller exprimierten Panelmarker in den ermittelten Zellclustern. Die CLR-Werte sind auf drei begrenzt.

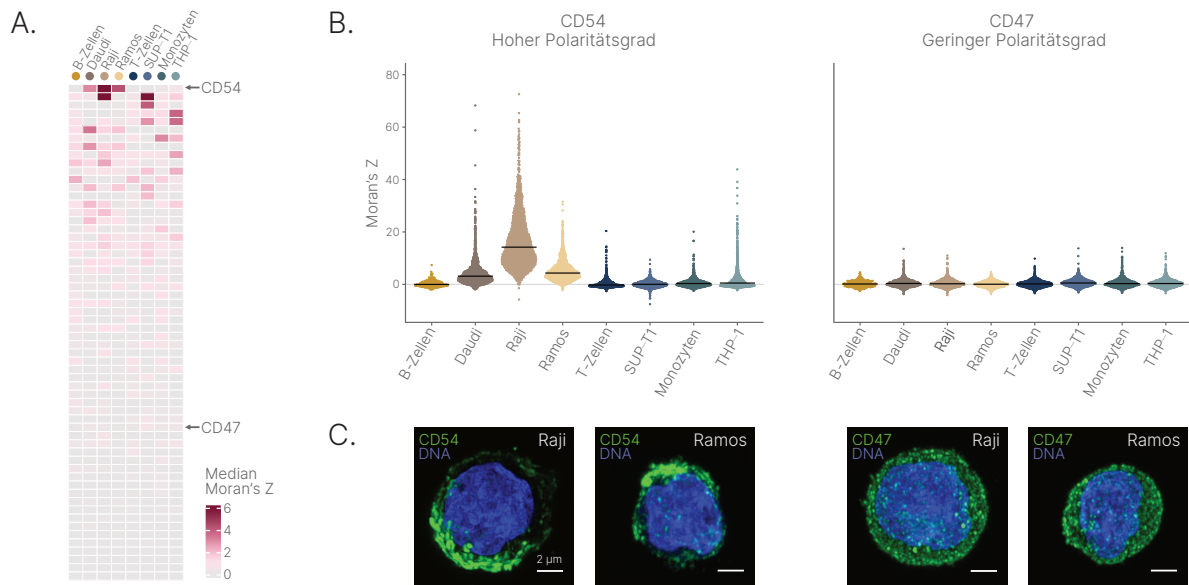


Abbildung 5: MPX zeigt eine deutliche Proteinpolarität zwischen PBMCs und aus Immunzellen gewonnenen Karzinomzelllinien: (A) Heatmap der medianen Moran's-Z-Scores, die ein räumliches Clustering für alle exprimierten Panelmarker der einzelnen Zelltypen angeben. Die Moran's-Z-Werte sind auf sechs begrenzt. (B) Einzelzellverteilungen der MPX-Polaritätsscores für CD54 und CD47. Die Linie stellt den medianen Polaritätsscore dar. (C) Airyscan-Immunfluoreszenz-Mikroaufnahmen, in denen das polarisierte Profil von CD54 in Raji- und Ramos-Zellen (links) zu erkennen ist. CD47 zeigt eine gleichmäßige Verteilung in denselben Zelllinien (rechts).

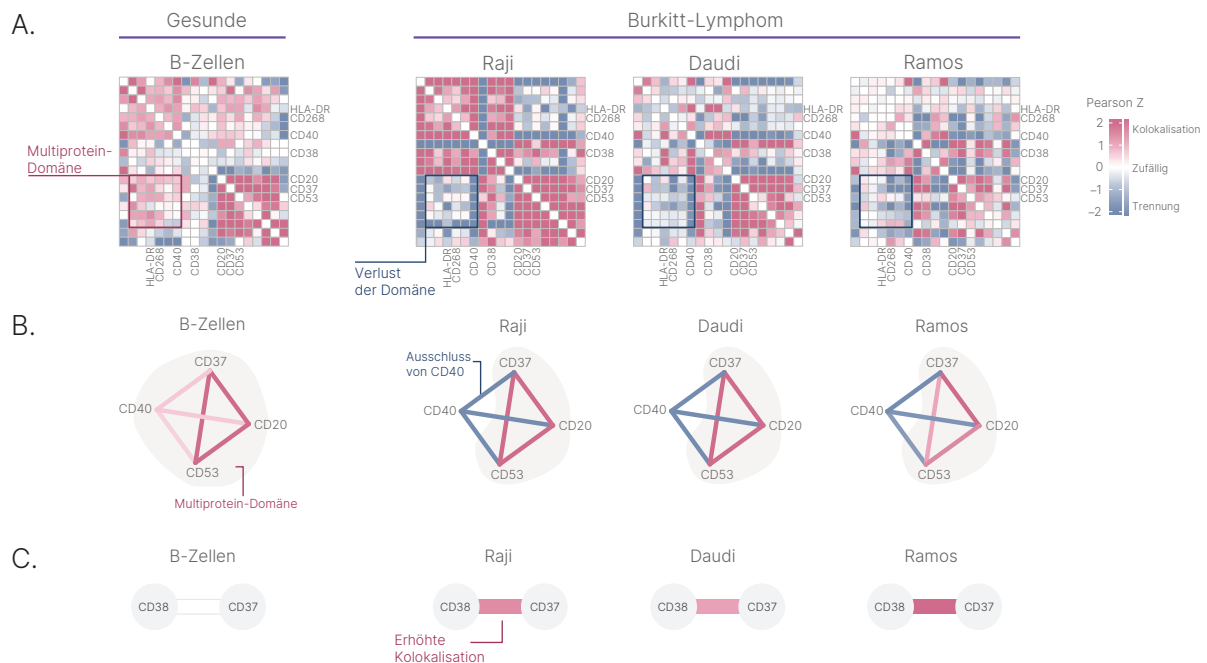


Abbildung 6: Reorganisation des Membranproteoms in Burkitt-Lymphomzelllinien: (A) Mediane paarweise MPX-Kolokalisationsscores für 19 Marker, die häufig auf gesunden B-Zellen und Daudi-, Raji- und Ramos-Burkitt-Lymphomzelllinien exprimiert werden. Jeder Zelltyp zeigt eine einzigartige umfangreiche Membranorganisation. Dagegen zeigt sich bei allen Karzinomzelllinien ein spezifischer Verlust der Multiprotein-domäne, die Proteine wie CD40, BAFF-R (CD268) und HLA-DR enthält. (B) Netzwerk-Plots ausgewählter paarweiser Proteinkolokalisationswerte für die unterschiedlichen Zelltypen. Es hat sich gezeigt, dass CD40 sich in allen Burkitt-Lymphomzelllinien von der mit CD20 assoziierten tetraspaninreichen Domäne absondert. Bei gesunden B-Zellen ist dies jedoch nicht der Fall. (C) Hinsichtlich der einzelnen Protein-Protein-Wechselwirkungen zeigt sich bei Burkitt-Lymphomzelllinien eine erhöhte Kolokalisation zwischen CD38 und CD37.

Hinsichtlich einzelner Protein-Protein-Paare wurde zudem eine erhöhte Kolo­kalisierung zwischen CD38 und CD37 in Burkitt-Lymphomzelllinien ermittelt (Abbildung 6). CD38 ist ein Therapieziel bei B-Zell-Malignitäten, jedoch wird das Protein von zahlreichen unterschiedlichen Immunzellen exprimiert, was Off-Target-Effekte während der Behandlung zur Folge hat.¹² Die Entwicklung bispezifischer Wirkstoffe, die auf kolo­kalisierte Proteinpaare wie CD38 und CD37 abzielen, könnte die Tumorspezifität sowie die Wirksamkeit der Behandlung erhöhen. Diese Ergebnisse können bei der Ermittlung neuartiger Wirkstoffziele und diagnostischer Biomarker helfen und letztendlich zu einem besseren Verständnis von Signalprozessen bei Krebs beitragen.

Zusammenfassung

In diesem Anwendungshinweis werden die Vorteile des Einsatzes von Molecular Pixelation gemeinsam mit Illumina-Sequenziersystemen für die gleichzeitige Untersuchung der Abundanz und der räumlichen Organisation von 80 Oberflächenproteinen auf 1.000 einzelnen Immunzellen pro Probe erläutert. Die mehrdimensionale Ansicht der Oberflächenproteinlandschaft einzelner Zellen ermöglicht Forschern die Aufdeckung komplexer Mechanismen der Immunzellfunktion bei Gesundheit und Erkrankung, die mit bislang vorhandenen Methoden nicht zugänglich waren.



Die Support-Teams von Illumina und Pixelgen Technologies stehen Anwendern während des gesamten Molecular Pixelation-Workflows zur Seite. Wenden Sie sich bei Fragen zu Assays und Analysen an den Support von Pixelgen Technologies (support@pixelgen.com) und bei Fragen zur Sequenzierung an den Support von Illumina (techsupport@illumina.com).

Weitere Informationen

[Sequenzierungsplattformen von Illumina](#)

[Molecular Pixelation – Technologie](#)

[Molecular Pixelation – vollständiges Protokoll](#)

[Pixelator-Software zur Verarbeitung und Analyse von Molecular Pixelation-Daten](#)

Quellen

1. Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wülfing C, et al. [Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands](#) [corrected] [published correction appears in *Immunity* 1998 Dec;9(6):891]. *Immunity*. 1998;9(4):459-466. doi:10.1016/s1074-7613(00)80629-9
2. Minguet S, Swamy M, Alarcón B, Luescher IF, Schamel WW. [Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3](#). *Immunity*. 2007;26(1):43-54. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.019
3. Ritter AT, Asano Y, Stinchcombe JC, et al. [Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse](#). *Immunity*. 2015;42(5):864-876. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.013
4. Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B. [The mechanisms and dynamics of \(alpha\)v\(beta\)3 integrin clustering in living cells](#). *J Cell Biol*. 2005;171(2):383-392. doi:10.1083/jcb.200503017
5. Huttenlocher A, Horwitz AR. [Integrins in cell migration](#). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(9):a005074. Veröffentlicht am 1. Sep. 2011 doi:10.1101/cshperspect.a005074
6. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. [Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma](#). *Nature*. 2010;463(7277):88-92. doi:10.1038/nature08638
7. Ziegler CGK, Kim J, Piersanti K, et al. [Constitutive Activation of the B Cell Receptor Underlies Dysfunctional Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia](#). *Cell Rep*. 2019;28(4):923-937.e3. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.069
8. Gomes de Castro MA, Wildhagen H, Sograte-Idrissi S, et al. [Differential organization of tonic and chronic B cell antigen receptors in the plasma membrane](#). *Nat Commun*. 2019;10(1):820. Veröffentlicht am 18. Feb. 2019 doi:10.1038/s41467-019-08677-1
9. Karlsson F, Kallas T, Thiagarajan D, et al. [Molecular pixelation: spatial proteomics of single cells by sequencing](#). *Nat Methods*. 2024;21(6):1044-1052. doi:10.1038/s41592-024-02268-9
10. Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. [Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells](#). *Nat Methods*. 2017;14(9):865-868. doi:10.1038/nmeth.4380
11. Eliopoulos AG, Young LS. [The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer](#). *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(4):360-367. doi:10.1016/j.coph.2004.02.008
12. Morandi F, Horenstein AL, Costa F, Giuliani N, Pistoia V, Malavasi F. [CD38: A Target for Immunotherapeutic Approaches in Multiple Myeloma](#). *Front Immunol*. 2018;9:2722. Veröffentlicht am 28. Nov. 2018 doi:10.3389/fimmu.2018.02722



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03152 DEU v1.0