

# La pixelación molecular revela patrones proteicos de células individuales específicos del cáncer

- Aproveche la pixelación molecular y la secuenciación de Illumina para descubrir nuevos mecanismos de comportamiento de las células inmunitarias.
- Mida la abundancia y la organización espacial de 80 proteínas superficiales en 1000 células individuales por muestra.
- Realice análisis proteómicos de células individuales y visualice mapas de superficies celulares con el paquete de procesos y análisis de Pixelator.

**illumina**<sup>®</sup>

En colaboración con



**PIXELGEN**  
TECHNOLOGIES

Para uso exclusivo en investigación.  
Prohibido su uso en procedimientos  
de diagnóstico.

## Introducción

La organización espacial de las proteínas de membrana es crucial para la actividad de las células inmunitarias, ya que influye en la unión de ligandos y facilita una comunicación precisa y dirigida. Por ejemplo, la generación de grupos de receptores de células T mejora el reconocimiento de antígenos e interviene en la destrucción dirigida de células infectadas por virus y transformadas,<sup>1-3</sup> mientras que la reordenación espacial de las integrinas potencia la adhesión y la migración celulares.<sup>4,5</sup> Al igual que sucede con muchos otros procesos celulares, las células cancerosas pueden explotar la organización de las proteínas de membrana, como se ha observado por el hecho de que el aumento de la generación de grupos de receptores de linfocitos B es un mecanismo oncogénico en algunos linfomas malignos de linfocitos B.<sup>6-8</sup> Aunque estos ejemplos demuestran la importancia de examinar la organización de las proteínas a la hora de estudiar procesos patológicos, los procedimientos proteómicos actuales presentan limitaciones notables a la hora de resolver la complejidad funcional en la superficie celular.

La mayoría de los métodos proteómicos de alto rendimiento (p. ej., la citometría de flujo, la citometría de masas y la indexación celular de transcriptomas y epítomos) solo proporcionan una lectura de la abundancia proteica. En cambio, la organización de las proteínas a escala de las células individuales solo ha sido accesible mediante enfoques basados en la adquisición de imágenes con pocas unidades de plexado (p. ej., la microscopía y la citometría de imagen en flujo). La pixelación molecular (MPX) es un innovador procedimiento proteómico de células individuales que permite la cuantificación simultánea y la asignación espacial de 80 proteínas de membrana mediante la división bioquímica de la superficie celular en zonas espaciales y la aplicación de la secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing). Tras los pasos de pixelación y la NGS, los datos se ensamblan computacionalmente en mapas cuantitativos de la superficie de células individuales

que muestran la disposición de las moléculas de proteínas individuales (figura 1).<sup>9</sup> En esta nota de aplicación, ponemos de relieve la facilidad con la que la MPX se puede implementar fácilmente en los sistemas de secuenciación de Illumina, lo que ofrece una gran cantidad de información nueva para comprender la actividad y la diversidad de las células inmunitarias.

## Métodos

La MPX se ha concebido principalmente para el análisis de las células inmunitarias, lo que incluye células mononucleares de sangre periférica (CMSP) roja o congelada, productos de tratamiento celular y células cancerosas hematológicas. Todo el protocolo se lleva a cabo en un solo tubo de reacción por cada muestra y las células se pueden agrupar y secuenciar juntas sin tener que aislar células individuales. El método requiere poner las células en suspensión, y el número de entrada de las células puede ser de tan solo 50 000. La MPX es compatible con las plataformas de secuenciación de Illumina, como se demuestra aquí con NextSeq™ 2000 System (Illumina, n.º de catálogo 20038897), NovaSeq™ 6000 System (Illumina, n.º de catálogo 20012850) y NovaSeq X Plus System (Illumina, n.º de catálogo 20084804).

### Preparación de muestras

Para este estudio, comparamos CMSP sanas con estirpes celulares cancerosas derivadas de células inmunitarias del Leibniz Institute DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) (tabla 1). La pixelación se llevó a cabo mediante [Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2](#) (Pixelgen, n.º de catálogo PXGIMM002) conforme al protocolo del fabricante (figura 2). Para preservar la organización del proteoma de la membrana, las células se colocaron en una solución y se fijaron con paraformaldehído al 1 %.



Figura 1: Descripción general de la MPX. Las células se fijan y etiquetan con conjugados de anticuerpo-oligonucleótido que tienen como objetivo 80 marcadores superficiales e introducen códigos de barras exclusivos específicos de proteínas. Los píxeles A de ADN se hibridan con los anticuerpos, lo que añade códigos de barras para crear grupos locales de la zona A, mientras que los píxeles B incorporan códigos de barras para relacionar espacialmente los grupos adyacentes a la zona A. Tras la secuenciación, las zonas interconectadas se unen por medios informáticos en una representación cuantitativa y espacial de las proteínas presentes en la superficie de la célula individual.

Tabla 1: Estirpes celulares de cáncer utilizadas en experimentos de MPX

Tipo de cáncer	Estirpe celular	N.º de catálogo de DSMZ
Linfoma de Burkitt	Daudi	ACC 78
	Raji	ACC 319
	Ramos (RA1)	ACC 603
Linfoma linfoblástico de células T	SUP-T1 [VB]	ACC 140
Leucemia monocítica aguda	THP-1	ACC 16

### Preparación de librerías

Siguiendo el protocolo de MPX, las células se suspendieron en una solución y se tiñeron con el panel incluido de anticuerpos oligoconjugados (AOC) dirigidos a 80 proteínas de la superficie celular. A las células suspendidas se añadieron píxeles de ADN, unos productos de amplificación de ADN por círculo rodante con un tamaño aproximado de 100 nm, cada uno de los cuales contiene varias copias de un código de barras único. Se hibridaron píxeles de ADN individuales en un número limitado de AOC ubicados muy cerca de la superficie celular y se utilizó una reacción de ligadura de llenado de huecos para incorporar el código de

barras de los píxeles de ADN en los oligonucleótidos de anticuerpos ligados. Estos pasos dividieron los AOC unidos a la superficie celular en miles de zonas locales definidas por su secuencia de código de barras de píxeles de ADN compartido. Este proceso se repitió utilizando un segundo conjunto de píxeles de ADN, creando dos conjuntos de zonas superpuestas, lo que permitió la reconstrucción por ordenador de las posiciones relativas de cada zona en toda la superficie celular. Los códigos de barras resultantes de los anticuerpos y la pixelación se amplificaron mediante PCR, durante la cual se incorporaron adaptadores de secuenciación de Illumina específicos de la muestra. Antes de la secuenciación, los amplicones se purificaron con bolas de AMPure XP (Beckman Coulter, n.º de catálogo A63880).

### Secuenciación

Las librerías de MPX requieren secuenciación «paired-end». Pixelgen Technologies recomienda un mínimo de 120 000 pares de lectura por célula, mientras que el número de muestras y células por muestra se puede ajustar en función de la aplicación y el instrumental de secuenciación disponible (tabla 2).

Las librerías se secuenciaron con NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System y NovaSeq X Plus System. El método requería lecturas «paired-end» mínimas de 44 ciclos para la primera lectura y de 78 ciclos para la segunda. En NextSeq 2000 System, se utilizó NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n.º de catálogo 20100994) y las librerías se secuenciaron con 44 × 78 lecturas «paired-end».

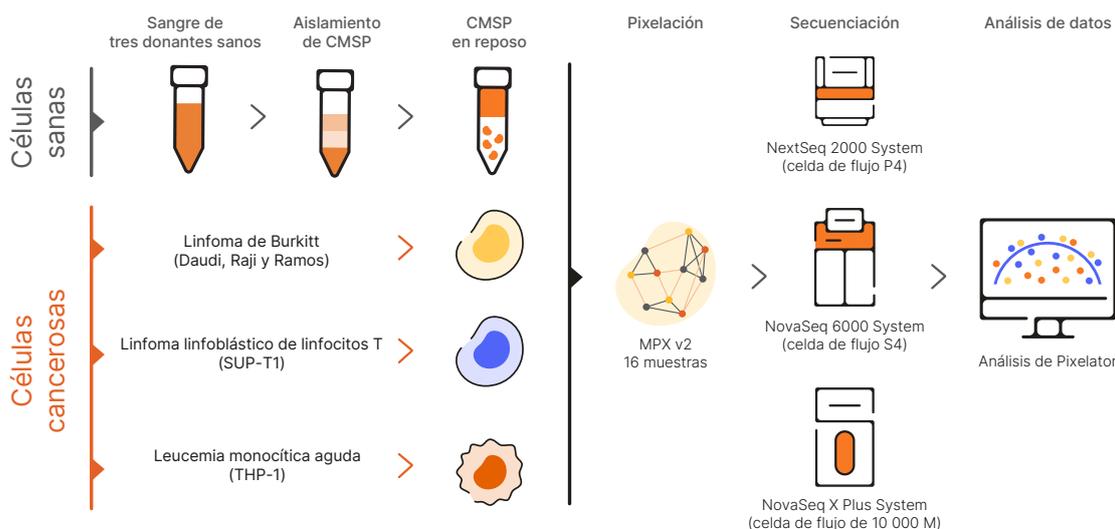


Figura 2: Flujo de trabajo de MPX para la comparación de CMSP sanas y estirpes de células cancerosas derivadas de células inmunitarias. Las suspensiones celulares, que contenían CMSP de uno de tres donantes sanos o una de cinco estirpes de células de cáncer derivadas de células inmunitarias, se recogieron y procesaron por duplicado con Pixelgen Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2. Tras la MPX, las 16 muestras se secuenciaron en paralelo en NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System y NovaSeq X Plus System. El procesamiento y la visualización de los datos se llevaron a cabo mediante Pixelator 0.18 con el proceso nf-core/pixelator 1.3.0.

Tabla 2: Productividad de muestras del ensayo de MPX en una selección de sistemas de secuenciación de Illumina

	NextSeq 2000 System	NovaSeq 6000 System	NovaSeq X Plus System
Celda de flujo	P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 ciclos)	Xp 4-lane Kit v1.5 (300 ciclos)	10B Reagent Kit (300 ciclos)
Total de lecturas individuales	1800 M	8000-10 000 M	10 000 M
Células de salida/reacción	1000	1000	1000
Número máximo recomendado de reacciones por celda de flujo <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>	66	83
Número máximo recomendado de células por celda de flujo <sup>a</sup>	15 000 <sup>b</sup>	66 000	83 000

a. Se calcula utilizando 1000 células por muestra y  $\geq 120\,000$  lecturas únicas por célula.

b. En este experimento se secuenciaron dieciséis muestras (16 000 células), lo que generó un total de 2130 millones de lecturas en la celda de flujo P4.

En el caso de NovaSeq 6000 System, se utilizó NovaSeq Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, n.º de catálogo 20043131) y las librerías se secuenciaron utilizando  $150 \times 150$  lecturas «paired-end» en la National Genomics Infrastructure (NGI) de Estocolmo (Suecia). En el caso de NovaSeq X Plus System, se utilizó NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, n.º de catálogo 20085594) y las librerías se secuenciaron utilizando  $150 \times 150$  lecturas «paired-end» en la plataforma Clinical Genomics de Estocolmo (Suecia). Dispone de recomendaciones adicionales para la configuración de lecturas y la adición de PhiX en el [sitio web de Pixelgen Technologies](#).

### Análisis y visualización de datos

Las lecturas de secuenciación se procesaron utilizando el proceso de código abierto de Pixelator, disponible en el marco de la iniciativa nf-core ([nf-core/pixelator](#)). Se utilizó Pixelator para reconstruir mapas de proteínas superficiales de células individuales y generar archivos de salida para el control de calidad y el análisis. Junto con los archivos PXL que contienen los datos procesados para los análisis sucesivos, las estadísticas y la generación de figuras, Pixelator también generó un informe web que resume los principales criterios de medición de la calidad del experimento.

Los archivos PXL se procesaron fácilmente mediante herramientas habituales de análisis ómico de células individuales, incluidas Scanpy y Seurat, y contenían cuatro elementos principales: recuentos de abundancia proteica de cada proteína y célula, puntuaciones de polaridad de MPX en cada proteína y célula, puntuaciones de colocalización de MPX para la comparación por pares de todas las proteínas del panel en cada célula y una lista de aristas que contenía los datos para crear representaciones gráficas de las células individuales, así como la información para calcular estadísticas espaciales. El sitio web de Pixelgen Technologies ofrece cómodamente [asistencia y tutoriales para el análisis de MPX](#).

## Resultados

La MPX es compatible con los sistemas actuales de secuenciación de Illumina de medio y alto rendimiento. Para demostrar esto, se preparó una muestra de CMSP mediante MPX como se ha explicado más arriba, la cual se secuenció en tres plataformas distintas de Illumina: NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System y NovaSeq X Plus System. Se analizaron los archivos de datos PXL y se evaluó su calidad mediante el paquete [R, pixelatorR](#) (v0.10.2). Los componentes con tamaños extremos y en los que se sospechaba la presencia de cúmulos se retiraron antes de los análisis sucesivos. Los recuentos sin procesar se normalizaron mediante la transformación de cociente logarítmico centrado (CLR, Centered Log-Ratio)<sup>10</sup> y se resumieron como el valor medio del CLR por marcador. Al comparar los resultados de abundancia de MPX, se confirmó que se pueden obtener resultados similares de alta calidad en las plataformas de secuenciación de Illumina ([figura 3](#)).

La combinación de la abundancia proteica y el análisis espacial a escala de las células individuales ofrece la posibilidad de fenotipar en profundidad y caracterizar con detalle el comportamiento de las células inmunitarias. Demostramos esta capacidad comparando estirpes celulares de cáncer hematológico con células inmunitarias sanas en lo referente a la abundancia ([figura 4](#)), la polarización ([figura 5](#)) y la colocalización ([figura 6](#)) de las proteínas.

Por ejemplo, en las estirpes celulares del linfoma de Burkitt, mostramos que se producen cambios en el contenido de los dominios de varias proteínas, ya que proteínas como la diana terapéutica CD40 se segregan de los dominios con abundancia de tetraspanina, mientras que se enriquece la CD38. Curiosamente, se ha descubierto que la ligadura de CD40 con fármacos con anticuerpos induce respuestas opuestas en los linfocitos B sanos y las células del linfoma de Burkitt<sup>11</sup>, y nuestros resultados de MPX apuntan a que la organización de la CD40 podría ser un factor que impulsara dichas respuestas diferenciales ([figura 6](#)).

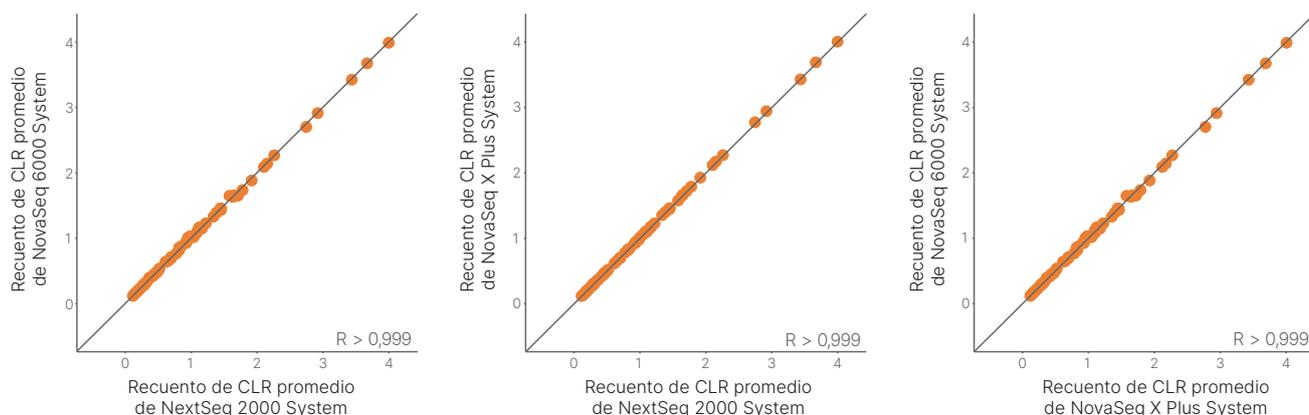


Figura 3: Correlación entre los resultados de la MPX de los sistemas de secuenciación de Illumina. Los datos de MPX de una sola muestra de CMSP secuenciada en tres plataformas de Illumina (NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System y NovaSeq X Plus System) se analizaron mediante el paquete R, pixelatorR (v0.10.2). Los recuentos sin procesar se normalizaron mediante la transformación de CLR<sup>10</sup> y se resumieron como el valor medio del CLR por marcador. La correlación lineal entre los tres sistemas, en todos los marcadores, muestra una correlación significativa (valor de  $p \leq 0,0001$ ).

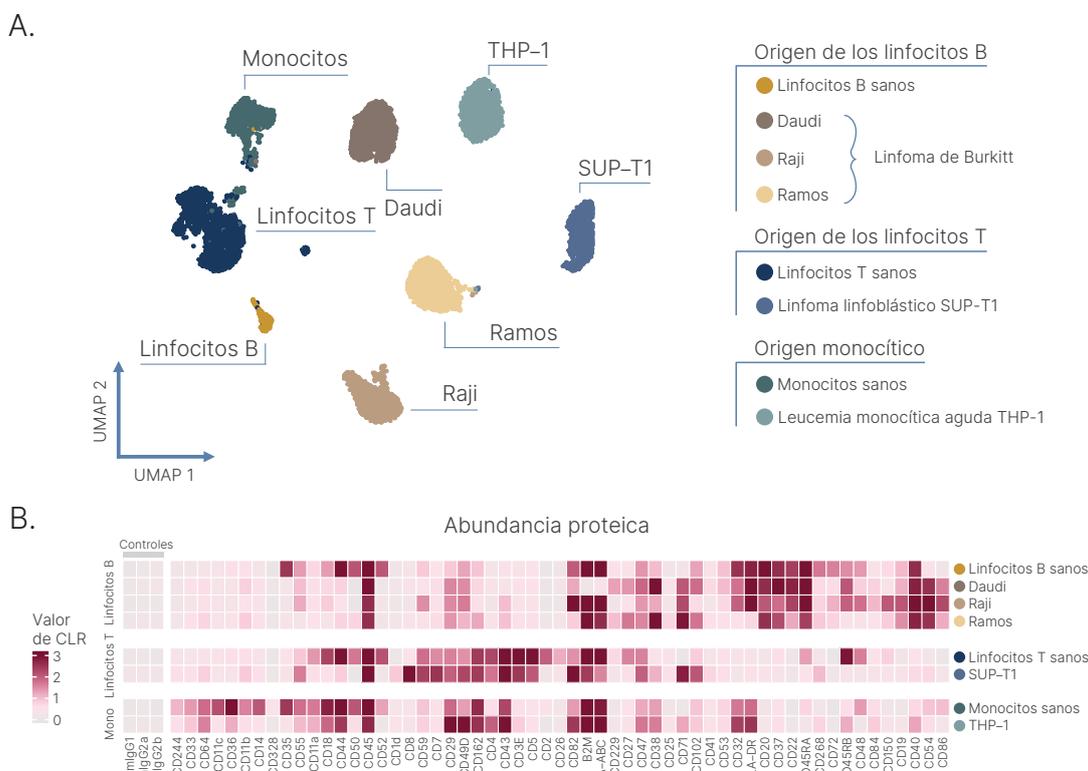


Figura 4: La MPX pone de relieve la abundancia diferencial de proteínas superficiales en las CMSP y las estirpes celulares cancerosas derivadas de células inmunitarias. (A) Agrupación multidimensional de los linfocitos T, linfocitos B y monocitos de las CMSP, y de las cinco estirpes celulares cancerosas, en función de la expresión de todos los marcadores del panel inmunitario. (B) Mapa de calor de la mediana de los niveles de abundancia ajustados mediante el CLR de todos los marcadores del panel expresados en los grupos de células identificados. El límite máximo de los valores del CLR es 3.

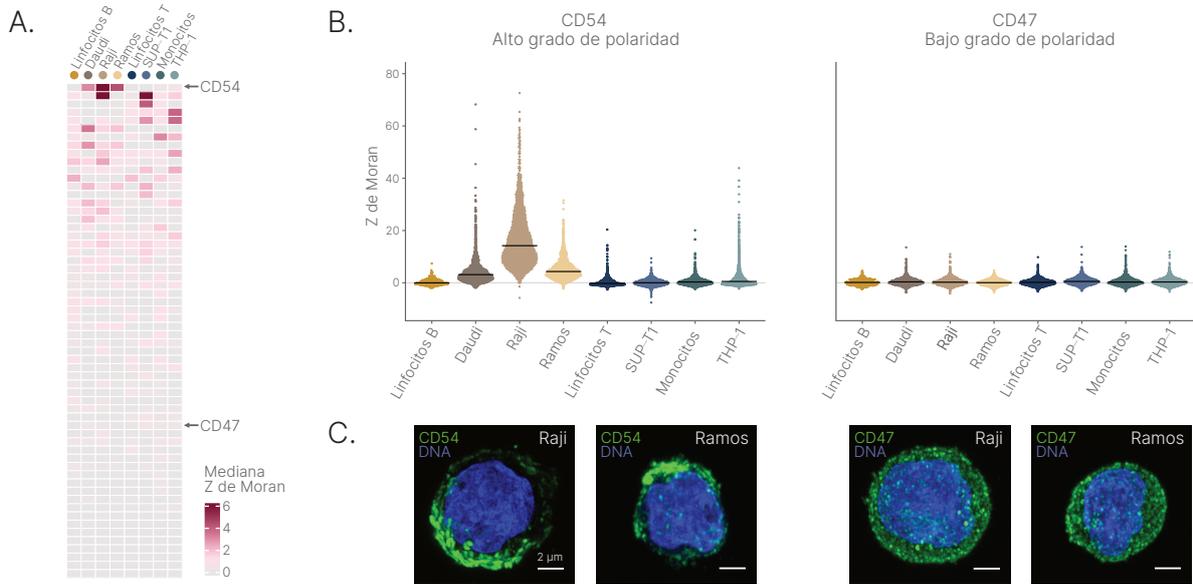


Figura 5: La MPX revela una polaridad proteica diferenciada entre las CMSP y las estirpes celulares cancerosas derivadas de células inmunitarias. (A) Mapa de calor de la mediana de las puntuaciones Z de Moran que indica la agrupación espacial de todos los marcadores del panel expresados en cada tipo de célula. El límite máximo de los valores Z de Moran es 6. (B) Distribuciones de células individuales de las puntuaciones de polaridad de la MPX correspondientes a la CD54 y la CD47. La línea representa la mediana de la puntuación de polaridad. (C) Micrografías de inmunofluorescencia con Airyscan que ponen de relieve el perfil polarizado de la CD54 en células de Raji y Ramos (izquierda). La CD47 presenta una distribución uniforme en las mismas estirpes celulares (derecha).

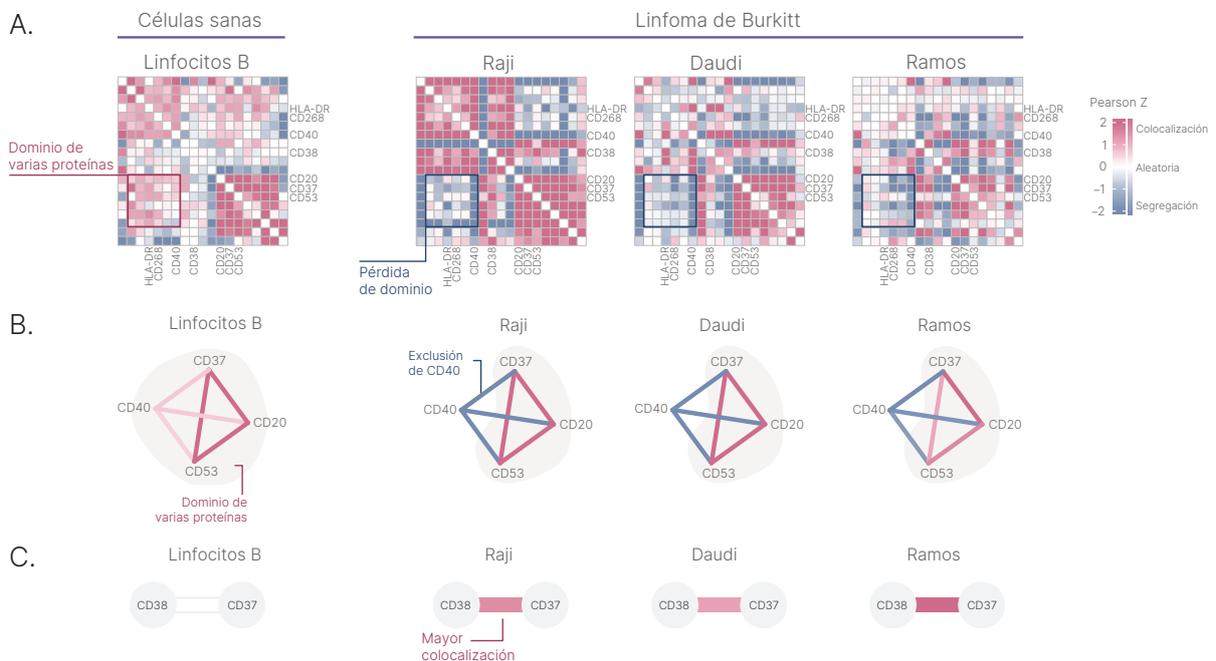


Figura 6: Reorganización del proteoma de la membrana en las estirpes celulares del linfoma de Burkitt. (A) Mediana de las puntuaciones de colocalización de MPX por pares correspondientes a 19 marcadores comúnmente expresados en linfocitos B sanos y estirpes celulares del linfoma de Burkitt (Daudi, Raji y Ramos). Cada tipo de célula presenta una organización exclusiva de la membrana a gran escala, mientras que todas las estirpes celulares cancerosas presentan una pérdida específica del dominio de varias proteínas que contiene proteínas tales como la CD40, el BAFF-R (CD268) y el HLA-DR. (B) Representaciones gráficas en red de las puntuaciones de colocalización de las proteínas por pares seleccionadas de los distintos tipos de células. Se observó que la CD40 se segrega del dominio con abundancia de tetraspanina asociado a la CD20 en todas las estirpes celulares del linfoma de Burkitt, pero no en linfocitos B sanos. (C) Al centrarnos en las interacciones entre proteínas individuales, se observa una mayor colocalización entre la CD38 y la CD37 en las estirpes celulares del linfoma de Burkitt.

Al centrarnos en pares de proteínas individuales, también identificamos una mayor colocalización entre la CD38 y la CD37 en las estirpes celulares del linfoma de Burkitt (figura 6). La CD38 es un objetivo terapéutico en las neoplasias malignas de linfocitos B, pero esta proteína se expresa en células inmunitarias muy diversas, lo que provoca efectos colaterales durante el tratamiento.<sup>12</sup> El diseño de fármacos biespecíficos dirigidos a pares de proteínas colocalizadas, como la CD38 y la CD37, podría aumentar la especificidad tumoral y la eficiencia del tratamiento. Estos resultados pueden contribuir a identificar nuevos objetivos farmacológicos y biomarcadores de diagnóstico, lo que, en definitiva, mejora nuestros conocimientos de los procesos de comunicación intercelular en el cáncer.

## Resumen

Esta nota de aplicación demuestra las ventajas de la pixelación molecular con los sistemas de secuenciación de Illumina para evaluar simultáneamente la abundancia y la organización espacial de 80 proteínas superficiales en 1000 células inmunitarias individuales por muestra. Con una visión multidimensional de la situación de las proteínas superficiales en células individuales, los investigadores ahora pueden desentrañar mecanismos complejos de la actividad de las células inmunitarias en condiciones tanto saludables como patológicas que antes eran inaccesibles con los métodos existentes.

 Los equipos de asistencia de Illumina y Pixelgen Technologies están a su disposición para ayudarle durante todo el flujo de trabajo de pixelación molecular. Póngase en contacto con el servicio de asistencia de Pixelgen Technologies ([support@pixelgen.com](mailto:support@pixelgen.com)) si tiene alguna duda sobre los ensayos y los análisis, y con el de Illumina ([techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)) si tiene alguna duda sobre secuenciación.

## Más información

[Plataformas de secuenciación de Illumina](#)

[Tecnología de pixelación molecular](#)

[Protocolo completo de pixelación molecular](#)

[Software Pixelator para el procesamiento y análisis de datos de pixelación molecular](#)

## Bibliografía

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](#) [corregido] [la corrección se publicó en *Immunity*, diciembre de 1998;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. Fecha de publicación: 1 de septiembre de 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. Fecha de publicación: 18 de febrero de 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. Fecha de publicación: 28 de noviembre de 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02722



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-03152 ESP v1.0