

La technologie Molecular Pixelation révèle les modèles protéiques spécifiques au cancer des cellules individuelles

- Tirez parti de Molecular Pixelation et du séquençage d'Illumina pour découvrir de nouveaux mécanismes du comportement des cellules immunitaires
- Mesurez l'abondance et l'organisation spatiale de 80 protéines de surface sur 1 000 cellules uniques par échantillon
- Effectuez l'analyse protéomique unicellulaire et visualisez les cartes de surface cellulaire à l'aide du pipeline Pixelator et de l'ensemble d'analyse

illumina^{MD}

En partenariat avec



PIXELGEN
TECHNOLOGIES

Destiné à la recherche uniquement.
Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.

Introduction

L'organisation spatiale des protéines membranaires est cruciale pour la fonction des cellules immunitaires. Elle influence la liaison aux ligands et facilite une communication précise et ciblée. Par exemple, le regroupement des récepteurs des lymphocytes T améliore la reconnaissance des antigènes et sert d'agent médiateur à la destruction ciblée des cellules infectées et transformées par un virus¹⁻³, tandis que le réarrangement spatial des intégrines potentialise l'adhésion et la migration cellulaires^{4,5}. Comme pour de nombreux autres processus cellulaires, l'organisation des protéines membranaires peut être exploitée par les cellules cancéreuses, comme observé avec l'augmentation du regroupement des récepteurs des lymphocytes B en tant que mécanisme favorisant le cancer dans certaines malignités des lymphocytes B⁶⁻⁸. Bien que ces exemples démontrent l'importance d'examiner l'organisation des protéines lors de l'étude des processus pathologiques, les techniques protéomiques actuelles ont des limites notables dans la résolution de la complexité fonctionnelle au niveau de la surface cellulaire.

La plupart des méthodes protéomiques à débit élevé (p. ex. cytométrie de flux, cytométrie de masse et indexage cellulaire des transcriptomes et des épitopes) ne fournissent qu'une lecture de l'abondance de protéines. Pendant ce temps, l'organisation des protéines au niveau unicellulaire n'a été possible qu'à l'aide d'approches basées sur l'imagerie à faible plexité (p. ex. microscopie et cytométrie de flux avec imagerie). Molecular Pixelation (MPX) est une technique protéomique unicellulaire de pointe qui permet la quantification et la cartographie spatiale simultanées de 80 protéines membranaires en partitionnant de manière biochimique la surface cellulaire en zones spatiales et en appliquant le séquençage de nouvelle génération (SNG). Après les étapes de pixélisation et le SNG, les données sont assemblées de manière informatique en cartes quantitatives de surface unicellulaire

affichant l'arrangement des molécules de protéines individuelles ([figure 1](#))⁹. Dans cette note d'application, nous soulignons la façon dont MPX peut facilement être déployé sur les systèmes de séquençage d'Illumina pour offrir une multitude de nouveaux renseignements pour comprendre la fonction et la diversité des cellules immunitaires.

Méthodes

MPX est principalement conçu pour l'analyse des cellules immunitaires, notamment les cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) fraîches ou congelées, les produits de thérapie cellulaire et les cellules cancéreuses hématologiques. L'ensemble du protocole est effectué dans un seul tube de réaction pour chaque échantillon et les cellules peuvent être regroupées et séquencées ensemble sans avoir besoin de procéder à l'isolement des cellules uniques. La méthode exige que les cellules soient mises en suspension. Le nombre d'entrées de cellules peut être de seulement 50 000. MPX est compatible avec les plateformes de séquençage d'Illumina, comme démontré ici à l'aide des systèmes NextSeq^{MC} 2000 (Illumina, référence n° 20038897), NovaSeq^{MC} 6000 (Illumina, référence n° 20012850) et NovaSeq X Plus (Illumina, référence n° 20084804).

Préparation des échantillons

Pour cette étude, nous avons comparé les PBMC saines aux lignées cellulaires cancéreuses à cellules immunitaires du Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ([tableau 1](#)). La pixélisation a été effectuée à l'aide de la trousse [Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2](#) (Pixelgen, référence n° PXGIMM002) en suivant le protocole du fabricant ([figure 2](#)). Pour préserver l'organisation du protéome membranaire, les cellules ont été mises en solution et fixées avec du paraformaldéhyde à 1 %.



Figure 1 : Présentation de MPX : les cellules sont fixées et marquées avec des conjugués anticorps-oligonucléotides ciblant 80 marqueurs de surface et introduisant des codes à barres uniques spécifiques aux protéines. Les pixels d'ADN A s'hybrident aux anticorps, ajoutant des codes à barres pour créer des voisinages locaux de zone A, tandis que les pixels B ajoutent des codes à barres reliant spatialement les voisinages de zone A adjacents. Après le séquençage, les zones interconnectées sont jointes de manière informatique en une représentation quantitative et spatiale des protéines à la surface cellulaire individuelle.

Tableau 1 : Lignées de cellules cancéreuses utilisées pour les expériences MPX

Type de cancer	Lignée cellulaire	N° de référence DSMZ
Lymphome de Burkitt	Daudi	ACC 78
	Raji	ACC 319
	Ramos (RA1)	ACC 603
Lymphome lymphoblastique à lymphocytes T	SUP-T1 [VB]	ACC 140
Leucémie monocyttaire aiguë	THP-1	ACC 16

Préparation des bibliothèques

Conformément au protocole MPX, les cellules ont été mises en suspension dans une solution et marquées avec le panel inclus d'anticorps oligoconjugués (AOC) ciblant 80 protéines de surface cellulaire. Des pixels d'ADN, des produits d'amplification d'ADN en cercle roulant d'une taille d'environ 100 nm et contenant chacun plusieurs copies d'un code à barres unique, ont été ajoutés aux cellules en suspension. Les pixels d'ADN individuels ont été hybridés à un nombre limité d'AOC situés à proximité immédiate sur la surface cellulaire et une réaction de ligature de comblement a été utilisée

pour incorporer le code à barres des pixels d'ADN aux oligos d'anticorps ligaturés. Ces étapes ont divisé les AOC liés à la surface cellulaire en milliers de zones locales définies par leur séquence de codes à barres de pixels d'ADN partagée. Ce processus a été répété à l'aide d'un deuxième ensemble de pixels d'ADN, créant deux ensembles de zones qui se chevauchent, ce qui a permis la reconstruction *in silico* des positions relatives de chaque zone à la surface cellulaire. Les codes à barres d'anticorps et de pixélisation qui en résultent ont été amplifiés par PCR, étape au cours de laquelle des adaptateurs de séquençage Illumina spécifiques à l'échantillon ont été incorporés. Avant le séquençage, les amplicons ont été purifiés à l'aide de billes AMPure XP (Beckman Coulter, référence n° A63880).

Séquençage

Les bibliothèques MPX nécessitent un séquençage à lecture appariée. Pixelgen Technologies recommande un minimum de 120 000 paires de lectures par cellule, tandis que le nombre d'échantillons et de cellules par échantillon peut être ajusté en fonction de l'application et de l'équipement de séquençage disponibles (tableau 2).

Les bibliothèques ont été séquencées sur les systèmes NextSeq 2000, NovaSeq 6000 et NovaSeq X Plus. La méthode exigeait un minimum de lectures appariées de 44 cycles pour la première lecture et de 78 cycles pour la deuxième lecture. Sur NextSeq 2000 System, une trousse NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS^{MC} Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, référence n°20100994) a été utilisée et les bibliothèques ont été séquencées à l'aide de lectures appariées de 44 × 78.

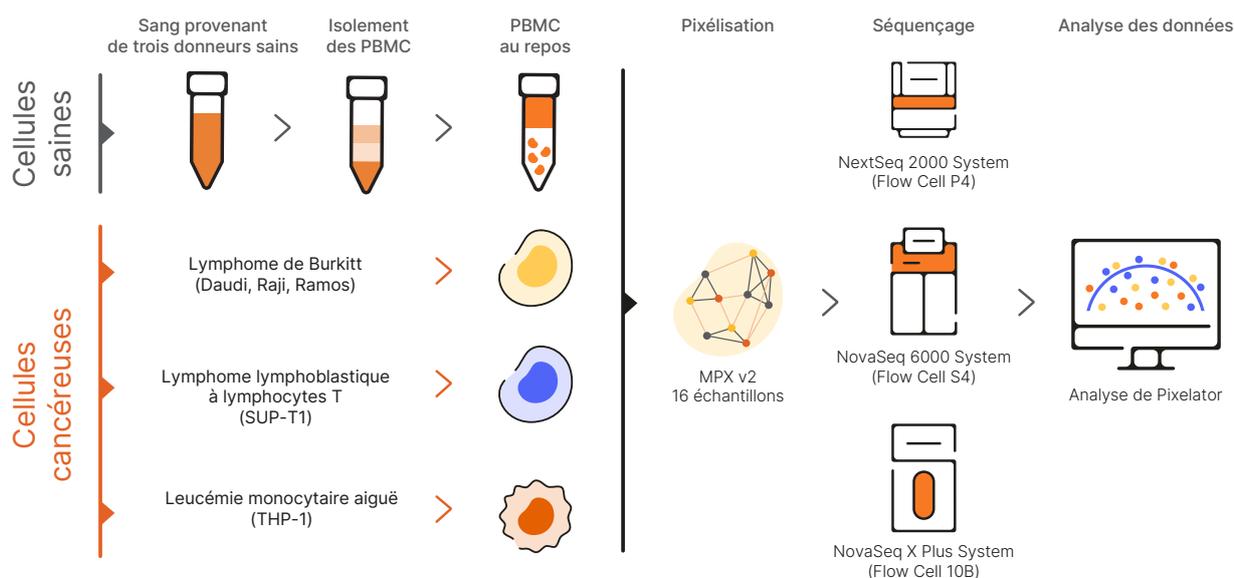


Figure 2 : Flux de travail MPX pour la comparaison des PBMC saines et des lignées cancéreuses dérivées de cellules immunitaires : les suspensions cellulaires, contenant des PBMC provenant de l'un des trois donneurs sains ou de l'une des cinq lignées cellulaires cancéreuses dérivées de cellules immunitaires ont été recueillies et traitées en double avec la trousse Pixelgen Single Cell Spatial Proteomics Kit et le panel Immunology Panel 2, Human v2. Après MPX, les 16 échantillons ont été séquencés en parallèle sur les systèmes NextSeq 2000, NovaSeq 6000 et NovaSeq X Plus. Le traitement et la visualisation des données ont été effectués à l'aide de Pixelator 0.18 avec le pipeline nf-core/pixelator 1.3.0.

Tableau 2 : Débit d'échantillons pour le test MPX sur certains systèmes de séquençage d'Illumina

	NextSeq 2000 System	NovaSeq 6000 System	NovaSeq X Plus System
Flow Cell	P4 XLEAP-SBS ^{MC} Reagent Kit (100 cycles)	Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles)	10B Reagent Kit (300 cycles)
Total de lectures uniques	1,8 milliard	8 à 10 milliards	10 milliards
Débit de cellules/réaction	1 000	1 000	1 000
Nombre maximal recommandé de réactions par Flow Cell ^a	15 ^b	66	83
Nombre maximal recommandé de cellules par Flow Cell ^a	15 000 ^b	66 000	83 000

a. Calculé à l'aide de 1 000 cellules par échantillon et ≥ 120 000 lectures uniques par cellule.

b. Seize échantillons (16 000 cellules) ont été séquencés dans cette expérience, générant un total de 2,13 milliards de lectures sur la Flow Cell P4.

Pour NovaSeq 6000 System, une trousse NovaSeq Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, référence n° 20043131) a été utilisée et les librairies ont été séquencées à l'aide de lectures appariées de 150 × 150 à la National Genomics Infrastructure (NGI) de Stockholm, en Suède. Pour NovaSeq X Plus System, une trousse NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, référence n° 20085594) a été utilisée et les librairies ont été séquencées à l'aide de lectures appariées de 150 × 150 sur la plateforme de génomique clinique de Stockholm, en Suède. Des recommandations supplémentaires pour la configuration des lectures et l'ajout du contrôle PhiX sont disponibles sur le [site Web de Pixelgen Technologies](#).

Analyse et visualisation des données

Les lectures de séquençage ont été traitées à l'aide du pipeline libre Pixelator, disponible dans le cadre de l'initiative nf-core ([nf-core/pixelator](#)). Pixelator a été utilisé pour reconstruire les cartes des protéines de surface de cellules individuelles et générer des fichiers de sortie pour le contrôle de la qualité et l'analyse. En plus des fichiers PXL contenant les données traitées pour l'analyse en aval, les statistiques et la génération de chiffres, Pixelator a également généré un rapport Web résumant les principaux indicateurs de qualité pour l'expérience.

Les fichiers PXL ont été facilement traités par des outils d'analyse omique unicellulaire courants, notamment Scanpy et Seurat, et contenaient quatre éléments principaux : le nombre d'abondances de protéines pour chaque protéine et cellule, les scores de polarité MPX pour chaque protéine et cellule, les scores de colocalisation MPX pour la comparaison appariée de toutes les protéines du panel dans chaque cellule, et une liste d'arêtes contenant les données pour créer des représentations graphiques de cellules individuelles ainsi que les renseignements pour calculer les statistiques spatiales. [Une assistance et des tutoriels pour l'analyse MPX](#) sont facilement disponibles sur le site Web de Pixelgen Technologies.

Résultats

MPX est compatible avec les systèmes de séquençage Illumina actuels à débit moyen à élevé. Pour démontrer cela, un échantillon de PBMC a été préparé à l'aide de MPX, comme décrit, et séquencé sur trois plateformes Illumina différentes (à savoir les systèmes NextSeq 2000, NovaSeq 6000 et NovaSeq X Plus). Les fichiers de données PXL ont été analysés et leur qualité a été évaluée à l'aide de l'ensemble R, [pixelatorR](#) (v0.10.2). Les composants de tailles extrêmes et les regroupements suspectés ont été retirés avant l'analyse en aval. Les dénombrements bruts ont été normalisés à l'aide de la transformation du rapport logarithmique centré (CLR, Centered Log-Ratio)¹⁰ et résumés comme la valeur CLR moyenne par marqueur. Une comparaison des sorties d'abondance MPX a confirmé que des résultats de haute qualité similaires peuvent être obtenus sur les plateformes de séquençage d'Illumina ([figure 3](#)).

La combinaison de l'abondance de protéines et de l'analyse spatiale au niveau unicellulaire offre la possibilité d'effectuer un phénotypage approfondi et une caractérisation détaillée du comportement des cellules immunitaires. Nous avons démontré cette capacité en comparant les lignées de cellules cancéreuses hématologiques aux cellules immunitaires saines en termes d'abondance de protéines ([figure 4](#)), de polarisation des protéines ([figure 5](#)) et de colocalisation des protéines ([figure 6](#)).

Par exemple, dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, nous démontrons que le contenu des domaines multiprotéiques change, les protéines telles que la cible thérapeutique CD40 étant séparées des domaines riches en tétraspanine, tandis que la protéine CD38 est enrichie. Il est intéressant de noter que la ligature de la protéine CD40 avec des anticorps thérapeutiques induit des réponses opposées dans les lymphocytes B sains et les cellules de lymphome de Burkitt¹¹ et nos résultats MPX suggèrent que l'organisation de CD40 pourrait être un facteur de ces réponses différentielles ([figure 6](#)).

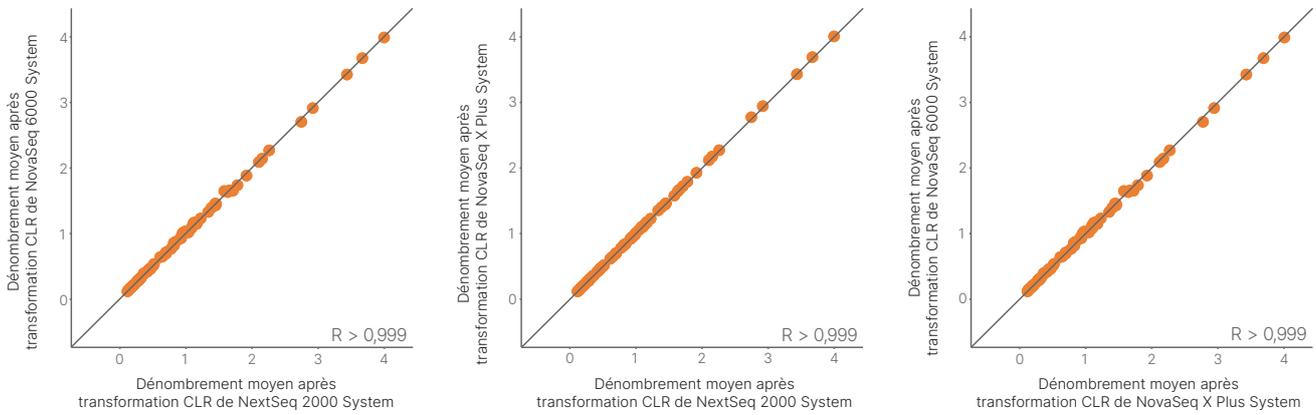


Figure 3 : Corrélation entre les débits MPX sur les systèmes de séquençage d'Illumina : les données MPX d'un seul échantillon de PBMC séquençé sur trois plateformes d'Illumina (systèmes NextSeq 2000, NovaSeq 6000 et NovaSeq X Plus) ont été analysées à l'aide de l'ensemble R, pixelatorR (v0.10.2). Les dénombrements bruts ont été normalisés à l'aide de la transformation du CLR¹⁰ et résumés comme la valeur CLR moyenne par marqueur. La corrélation linéaire entre les trois systèmes, sur tous les marqueurs, démontre une corrélation significative (valeur P ≤ 0,0001).

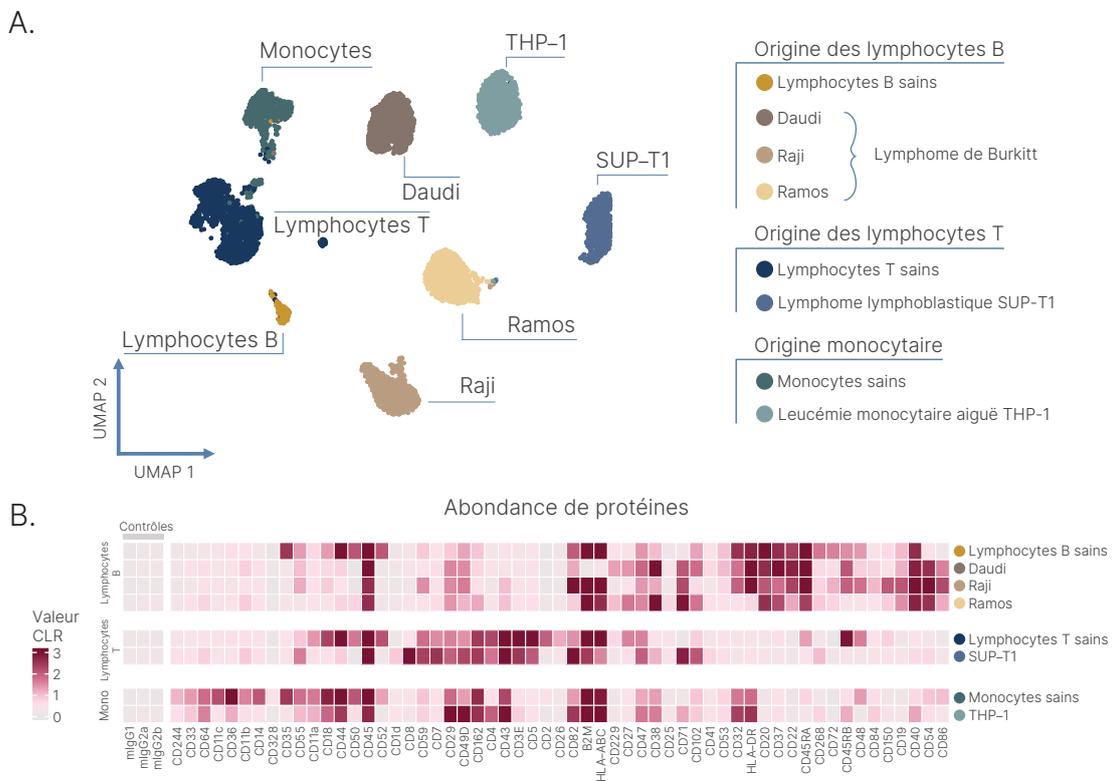


Figure 4 : MPX met en évidence l'abondance différentielle des protéines de surface dans les PBMC et les lignées cellulaires cancéreuses dérivées de cellules immunitaires : (A) regroupement multidimensionnel des lymphocytes T, des lymphocytes B, des monocytes et des cinq lignées cellulaires cancéreuses des PBMC, en fonction de l'expression de tous les marqueurs du panel immunitaire. (B) Carte thermique des niveaux d'abondance médians ajustés par CLR de tous les marqueurs de panel exprimés dans les amplifiats cellulaires identifiés. Les valeurs CLR sont limitées à trois.

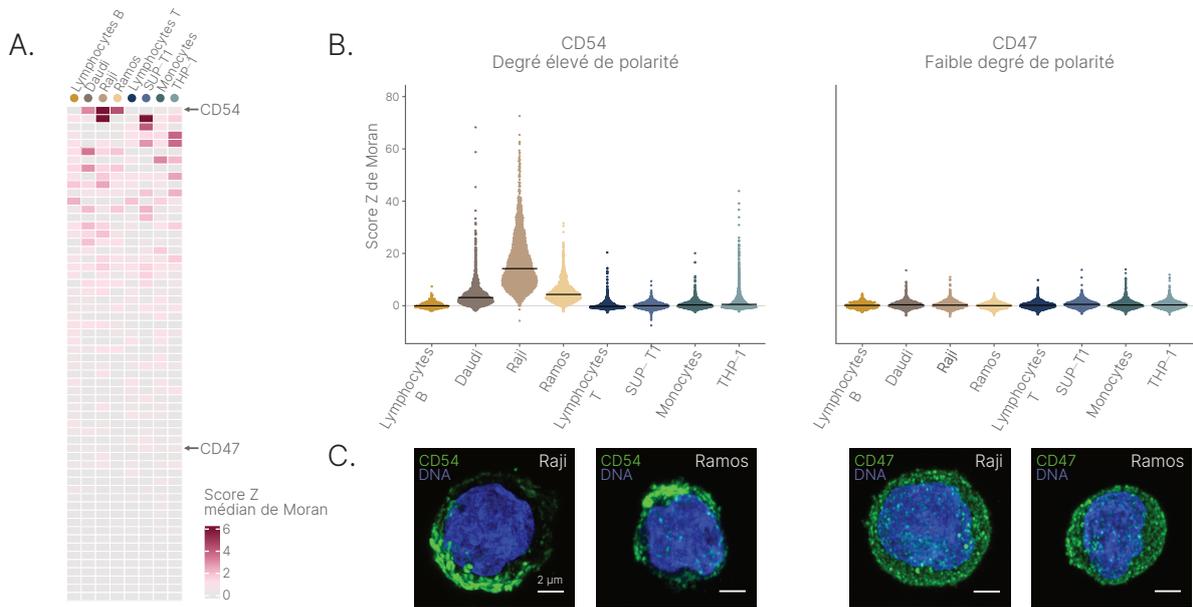


Figure 5 : MPX révèle une polarité protéique distincte entre les PBMC et les lignées cellulaires cancéreuses dérivées de cellules immunitaires : (A) carte thermique des scores Z médians de Moran indiquant le regroupement spatiaux pour tous les marqueurs de panel exprimés dans chaque type de cellule. Les valeurs Z de Moran sont limitées à six. (B) Distribution unicellulaire des scores de polarité MPX pour CD54 et CD47, la ligne représentant le score de polarité médian. (C) Micrographies d’immunofluorescence Airyscan mettant en évidence le profil polarisé de CD54 dans les cellules Raji et Ramos (à gauche), CD47 montre une distribution uniforme dans les mêmes lignées cellulaires (à droite).

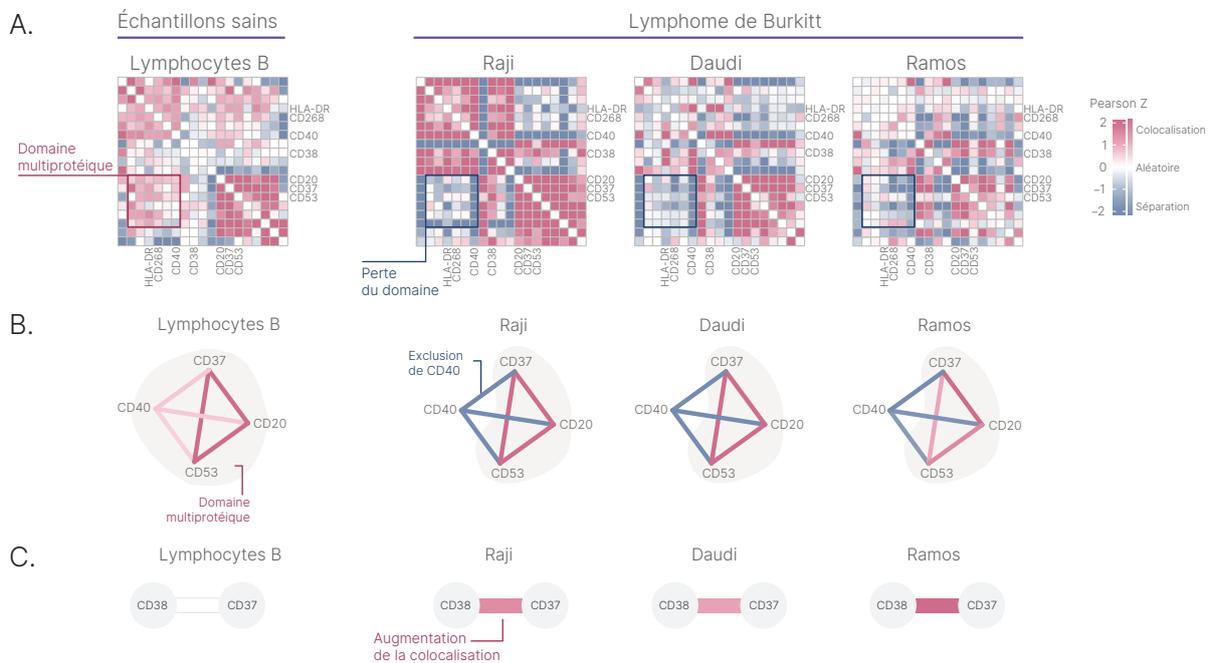


Figure 6 : Réorganisation du protéome membranaire dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt : (A) scores médians de colocalisation MPX appariés pour 19 marqueurs fréquemment exprimés sur les lymphocytes B sains et les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt Daudi, Raji et Ramos. Chaque type de cellule affiche une organisation membranaire unique à grande échelle, tandis que toutes les lignées de cellules cancéreuses montrent une perte spécifique du domaine multiprotéique contenant des protéines telles que CD40, BAFF-R (CD268) et HLA-DR. (B) Représentations graphiques de réseaux de certains scores de colocalisation de protéines appariés pour les différents types de cellules. Il s’est avéré que la protéine CD40 se soit séparée du domaine riche en téraspanine associé à CD20 dans toutes les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, mais pas dans les lymphocytes B sains. (C) Se concentrer sur les interactions protéine-protéine uniques révèle une colocalisation accrue entre CD38 et CD37 dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt.

En nous concentrant sur les paires protéine-protéine uniques, nous avons également identifié une colocalisation accrue entre CD38 et CD37 dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (figure 6). La protéine CD38 est une cible thérapeutique dans les malignités des lymphocytes B, mais la protéine est exprimée par de nombreuses cellules immunitaires différentes, provoquant des effets hors cible pendant le traitement¹². La conception de médicaments bispécifiques ciblant les paires de protéines colocalisantes, telles que CD38 et CD37, pourrait fournir une spécificité tumorale plus élevée et une meilleure efficacité du traitement. Ces résultats peuvent aider à identifier de nouvelles cibles médicamenteuses et de nouveaux biomarqueurs diagnostiques pour améliorer notre compréhension des processus de signallement dans le cancer.

Résumé

Cette note d'application démontre les avantages de la technologie Molecular Pixelation avec les systèmes de séquençage d'Illumina, pour évaluer simultanément l'abondance et l'organisation spatiale de 80 protéines de surface sur 1 000 cellules immunitaires individuelles par échantillon. Grâce à une vue multidimensionnelle du paysage protéique de surface sur des cellules uniques, les chercheurs peuvent désormais résoudre les mécanismes complexes de la fonction des cellules immunitaires dans la santé et les maladies, ce qui était auparavant impossible avec les méthodes existantes.

 Les équipes d'assistance d'Illumina et de Pixelgen Technologies sont disponibles pour vous aider tout au long du flux de travail de Molecular Pixelation. Communiquez avec l'assistance de Pixelgen Technologies (support@pixelgen.com) pour toute question relative aux tests et aux analyses, et l'assistance d'Illumina (techsupport@illumina.com) pour toute question relative au séquençage.

En savoir plus

[Plateformes de séquençage d'Illumina](#)

[Technologie Molecular Pixelation](#)

[Protocole complet de Molecular Pixelation](#)

[Logiciel Pixelator pour le traitement et l'analyse des données de Molecular Pixelation](#)

Références

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](#) [version corrigée] [une version corrigée est publiée dans *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. Publié le 1er septembre 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. Publié le 18 février 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. Publié le 28 novembre 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02722



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-03152 FRA v1.0