

La pixellazione molecolare rivela gli specifici pattern proteici del cancro nelle singole cellule

- La pixellazione molecolare e il sequenziamento Illumina aiutano a scoprire nuovi meccanismi del comportamento delle cellule immunitarie
- La misurazione dell'abbondanza e dell'organizzazione spaziale di 80 proteine superficiali è possibile su 1.000 singole cellule per campione
- L'analisi proteomica a singola cellula e la visualizzazione di mappe della superficie cellulare vengono eseguite tramite la pipeline Pixelator e il relativo pacchetto di analisi

illumina[®]

In collaborazione con



PIXELGEN
TECHNOLOGIES

Solo a uso di ricerca.
Non usare in procedimenti diagnostici.

Introduzione

L'organizzazione spaziale delle proteine di membrana è fondamentale per la funzionalità delle cellule immunitarie; essa, infatti, influenza il legame con il ligando e facilita una comunicazione precisa e diretta. Il clustering dei recettori delle cellule T, ad esempio, migliora il riconoscimento antigenico e influenza la soppressione diretta delle cellule infettate da virus e trasformate,¹⁻³ mentre il riarrangiamento spaziale delle integrine potenzia l'adesione e la migrazione cellulare.^{4,5} Come avviene per molti altri processi cellulari, l'organizzazione delle proteine di membrana può essere sfruttata dalle cellule tumorali; è il caso dell'aumento del clustering dei recettori delle cellule B come meccanismo di sviluppo del cancro in alcune neoplasie maligne delle cellule B.⁶⁻⁸ Sebbene questi esempi dimostrino l'importanza di esaminare l'organizzazione delle proteine nel contesto dello studio dei processi patologici, le attuali tecniche proteomiche presentano notevoli limiti a livello di risoluzione della complessità funzionale propria della superficie cellulare.

La maggior parte dei metodi proteomici a elevata processività (ad esempio, citometria a flusso, citometria di massa e indicizzazione cellulare di trascrittomi ed epitopi) fornisce soltanto una lettura dell'abbondanza proteica. Inoltre, l'organizzazione proteica a livello di singola cellula è stata finora accessibile solo tramite approcci a bassa complessità basati sull'imaging (quali microscopia e citometria a flusso per immagini). La pixellazione molecolare (MPX, Molecular Pixelation) è una tecnica di proteomica a singola cellula all'avanguardia che consente di eseguire contemporaneamente la quantificazione e la mappatura spaziale di 80 proteine di membrana suddividendo biochimicamente in zone la superficie cellulare e applicando il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing). Dopo le fasi di pixellazione e NGS, i dati vengono assemblati mediante metodi computazionali in mappe quantitative della

superficie delle singole cellule, le quali mostrano la disposizione delle singole molecole proteiche (Figura 1).⁹ In questa nota applicativa, evidenziamo come l'MPX può essere facilmente implementata sui sistemi di sequenziamento Illumina, offrendo una vasta gamma di nuove informazioni per approfondire la conoscenza della funzione e della diversità delle cellule immunitarie.

Metodi

La MPX è progettata principalmente per l'analisi delle cellule immunitarie in campioni freschi o congelati di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell), prodotti per la terapia cellulare e cellule tumorali ematologiche. L'intero protocollo viene eseguito in una singola provetta di reazione per ciascun campione e le cellule possono essere raggruppate in pool e sequenziate insieme senza alcuna necessità di isolarle singolarmente. Il metodo richiede la sospensione delle cellule e il numero di cellule di input può essere di appena 50.000. L'MPX è compatibile con le piattaforme di sequenziamento Illumina, come ha dimostrato l'impiego nel presente studio di NextSeq™ 2000 System (Illumina, n. di catalogo 20038897), NovaSeq™ 6000 System (Illumina, n. di catalogo 20012850) e NovaSeq X Plus System (Illumina, n. di catalogo 20084804).

Preparazione dei campioni

Per questo studio, le PBMC sane sono state confrontate con le linee tumorali delle cellule immunitarie del Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Tabella 1). La pixellazione è stata eseguita con [Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2](#) (Pixelgen, n. di catalogo PXGIMM002) seguendo il protocollo del produttore (Figura 2). Per preservare l'organizzazione del proteoma di membrana, le cellule sono state messe in soluzione e fissate con paraformaldeide all'1%.



Figura 1: panoramica dell'MPX. Le cellule sono fissate ed etichettate con coniugati anticorpo-oligonucleotide che hanno come target 80 marker di superficie e introducono codici a barre univoci per le proteine. I pixel del DNA A si ibridano con gli anticorpi, aggiungendo codici a barre per creare vicinati locali della zona A, mentre i pixel B aggiungono codici a barre che associano spazialmente i vicinati adiacenti della zona A. Dopo il sequenziamento, le zone interconnesse vengono unite dal computer in una rappresentazione quantitativa e spaziale delle proteine sulla superficie della singola cellula.

Tabella 1: linee cellulari tumorali utilizzate per gli esperimenti di MPX

Tipo di cancro	Linea cellulare	N. di catalogo DSMZ
Linfoma di Burkitt	Daudi	ACC 78
	Raji	ACC 319
	Ramo (RA1)	ACC 603
Linfoma linfoblastico a cellule T	SUP-T1 [VB]	ACC 140
Leucemia monocitica acuta	THP-1	ACC 16

Preparazione delle librerie

Seguendo il protocollo di MPX, le cellule sono state sospese in soluzione e colorate con il pannello incluso di anticorpi oligo-coniugati (AOC) mirati a 80 proteine della superficie cellulare. Alle cellule sospese sono stati aggiunti pixel di DNA, prodotti di amplificazione a cerchio rotante del DNA di circa 100 nm e contenenti ciascuno più copie di un codice a barre univoco. I singoli pixel di DNA sono stati ibridati a un numero limitato di AOC situati in prossimità della superficie cellulare ed è stata utilizzata una reazione di ligazione con riempimento dei gap per incorporare il codice a barre

dei pixel di DNA negli oligonucleotidi anticorpali ligati. Questi passaggi hanno partizionato gli AOC legati alla superficie cellulare in migliaia di zone locali definite dalla sequenza di codici a barre dei pixel del DNA condiviso. Il processo è stato ripetuto con un secondo set di pixel di DNA, creando due set di zone sovrapposte, il che ha consentito la ricostruzione *in silico* delle posizioni relative di ciascuna zona sulla superficie cellulare. I risultanti codici a barre degli anticorpi e della pixellazione sono stati amplificati mediante PCR, durante la quale sono stati incorporati gli adattatori di sequenziamento Illumina specifici per il campione. Prima del sequenziamento, gli ampliconi sono stati purificati con microsferi AMPure XP (Beckman Coulter, n. di catalogo A63880).

Sequenziamento

Le librerie MPX richiedono il sequenziamento paired-end. Pixelgen Technologies raccomanda almeno 120.000 coppie di letture per cellula, mentre il numero di campioni e di cellule per campione può essere regolato in base all'applicazione e all'apparecchiatura di sequenziamento disponibili (Tabella 2).

Le librerie sono state sequenziate su NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System. Il metodo richiedeva letture paired-end minime di 44 cicli per la lettura 1 e di 78 cicli per la lettura 2. Su NextSeq 2000 System, è stato impiegato un NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20100994) e le librerie sono state sequenziate utilizzando 44 × 78 letture paired-end.

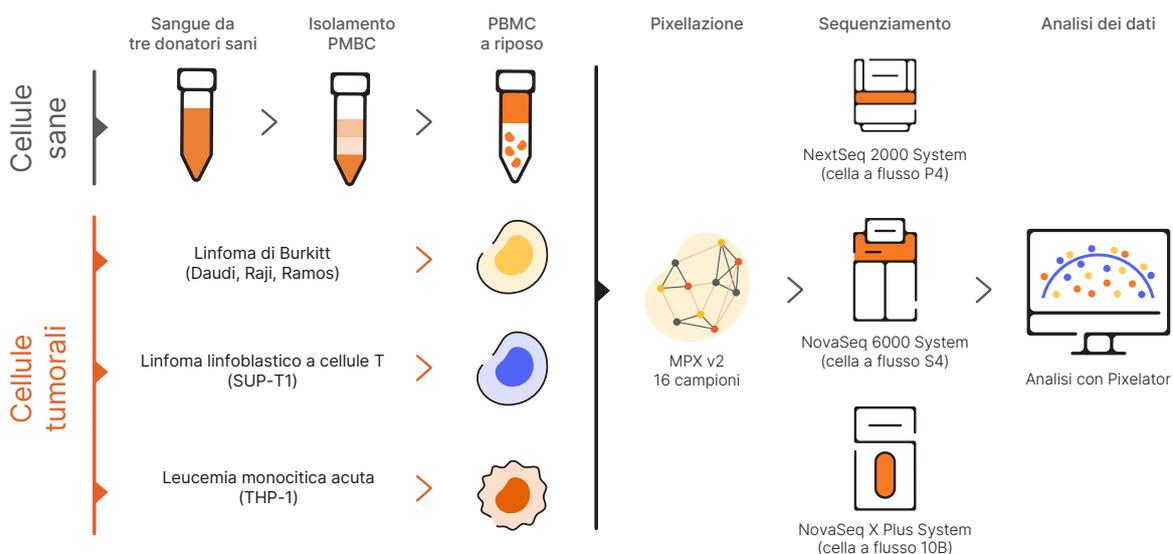


Figura 2: flusso di lavoro di MPX per il confronto di PMBC sane e linee tumorali derivate da cellule immunitarie. Le sospensioni cellulari, contenenti PMBC di uno dei tre donatori sani o una delle cinque linee cellulari tumorali derivate da cellule immunitarie, sono state raccolte ed elaborate in duplicati con Pixelgen Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2. Dopo l'MPX, i 16 campioni sono stati sequenziati in parallelo su NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System. L'elaborazione e la visualizzazione dei dati sono state eseguite utilizzando Pixelator 0.18 con la pipeline nf-core/pixelator 1.3.0.

Tabella 2: processività dei campioni per il saggio di MPX su determinati sistemi di sequenziamento Illumina

	NextSeq 2000 System	NovaSeq 6000 System	NovaSeq X Plus System
Cella a flusso	P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles)	Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles)	10B Reagent Kit (300 cycles)
Lectture unidirezionali totali	1,8 miliardi	8-10 miliardi	10 miliardi
Cellule di output/reazione	1.000	1.000	1.000
Numero massimo raccomandato di reazioni per cella a flusso ^a	15 ^b	66	83
Numero massimo raccomandato di cellule per cella a flusso ^a	15.000 ^b	66.000	83.000

a. Calcolato utilizzando 1.000 cellule per campione e un numero pari o superiore a 120.000 lectture unidirezionali per cella.
b. In questo esperimento sono stati sequenziati sedici campioni (16.000 cellule), generando un totale di 2,13 miliardi di lectture sulla cella a flusso P4.

Per NovaSeq 6000 System, è stato impiegato un NovaSeq Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20043131) e le librerie sono state sequenziate utilizzando 150 × 150 lectture paired-end presso la National Genomics Infrastructure (NGI) di Stoccolma, Svezia. Per NovaSeq X Plus System, è stato impiegato un NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20085594) e le librerie sono state sequenziate utilizzando 150 × 150 lectture paired-end presso la Clinical Genomics Platform di Stoccolma, Svezia. Ulteriori raccomandazioni per la configurazione delle lectture e l'aggiunta di PhiX sono disponibili sul [sito web di Pixelgen Technologies](#).

Analisi e visualizzazione dei dati

Le lectture di sequenziamento sono state elaborate utilizzando la pipeline Pixelator open source, parte dell'iniziativa nf-core ([nf-core/pixelator](#)). Pixelator è stato impiegato per ricostruire le mappe delle proteine di superficie delle singole cellule e generare file di output per l'analisi e il controllo della qualità. Insieme ai file PXL contenenti i dati elaborati per l'analisi a valle, le statistiche e la creazione di grafici, Pixelator ha generato anche un report web con il riepilogo delle metriche di qualità fondamentali per l'esperimento.

I file PXL sono stati facilmente elaborati mediante i comuni strumenti di analisi omica a singola cellula, tra cui Scanpy e Seurat, e contenevano quattro elementi primari: conteggi dell'abbondanza proteica per ciascuna proteina e cellula, punteggi di polarità dell'MPX per ciascuna proteina e cellula, punteggi di colocalizzazione dell'MPX per il confronto a coppie di tutte le proteine del pannello in ciascuna cellula e un elenco di connessioni contenente i dati necessari per la creazione di rappresentazioni grafiche delle singole cellule, nonché le informazioni per calcolare le statistiche spaziali. Sul sito web di Pixelgen Technologies sono disponibili [tutorial e assistenza per l'analisi tramite MPX](#).

Risultati

L'MPX è compatibile con gli attuali sistemi di sequenziamento Illumina a media o alta processività. Per dimostrarlo, è stato preparato come descritto un campione PBMC utilizzando l'MPX, quindi lo stesso è stato sequenziato su tre diverse piattaforme Illumina (NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System). L'analisi e la valutazione della qualità dei file di dati PXL sono state effettuate tramite il pacchetto R ([pixelatorR v0.10.2](#)). I componenti con dimensioni estreme e gli aggregati sospetti sono stati eliminati prima dell'analisi a valle. Le conte non elaborate sono state normalizzate mediante trasformazione del rapporto logaritmico centrato (CLR, Centered Log-Ratio)¹⁰ e riepilogate come valore CLR medio per marker. Un confronto degli output di abbondanza dell'MPX ha confermato che è possibile ottenere risultati di alta qualità simili sulle diverse piattaforme di sequenziamento Illumina ([Figura 3](#)).

La combinazione di abbondanza proteica e analisi spaziale a livello di singola cellula offre il potenziale per la fenotipizzazione profonda e la caratterizzazione dettagliata del comportamento delle cellule immunitarie. Abbiamo dimostrato questa capacità confrontando le linee cellulari ematologiche del cancro con le cellule immunitarie sane in termini di abbondanza proteica ([Figura 4](#)), polarizzazione proteica ([Figura 5](#)) e colocalizzazione proteica ([Figura 6](#)).

Ad esempio, nelle linee cellulari del linfoma di Burkitt abbiamo dimostrato che il contenuto dei domini multiproteina cambia, con proteine come il target terapeutico CD40 che vengono separate dai domini ricchi di tetraspanine, mentre la CD38 viene arricchita. È interessante notare che la ligazione della CD40 con farmaci anticorpali ha indotto risposte opposte nelle cellule B sane e nelle cellule del linfoma di Burkitt¹¹ e i nostri risultati dell'MPX suggeriscono che l'organizzazione della CD40 potrebbe essere un fattore determinante per tali risposte differenziali ([Figura 6](#)).

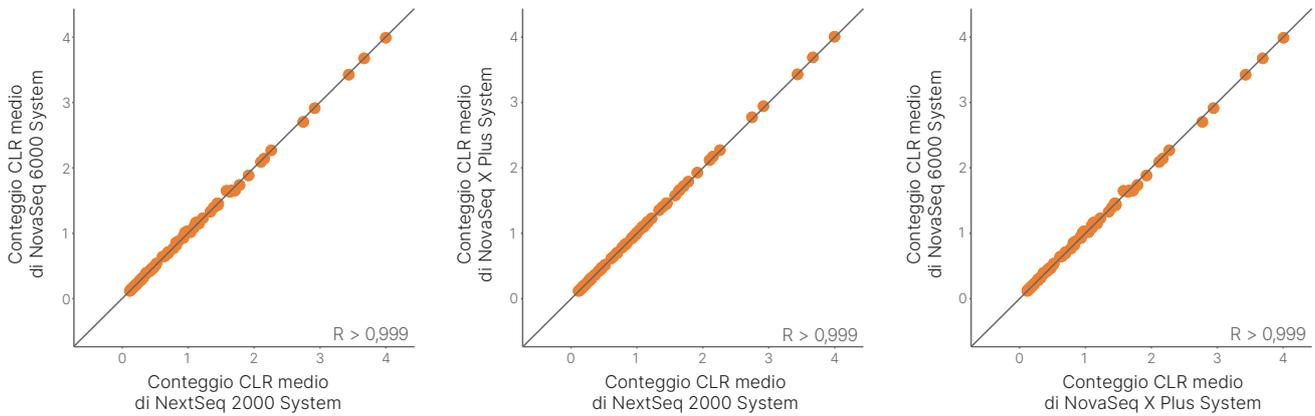


Figura 3: correlazione tra gli output dell'MPX sui sistemi di sequenziamento Illumina. Sono stati analizzati i dati di MPX di un singolo campione PBMC sequenziato su tre piattaforme Illumina (NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System) utilizzando il pacchetto R (pixelatorR v0.10.2). Le conte non elaborate sono state normalizzate mediante trasformazione del CLR¹⁰ e riepilogate come valore CLR medio per marker. La correlazione lineare tra tutti e tre i sistemi e per tutti i marker risulta significativa (valore P pari o inferiore a 0,0001).

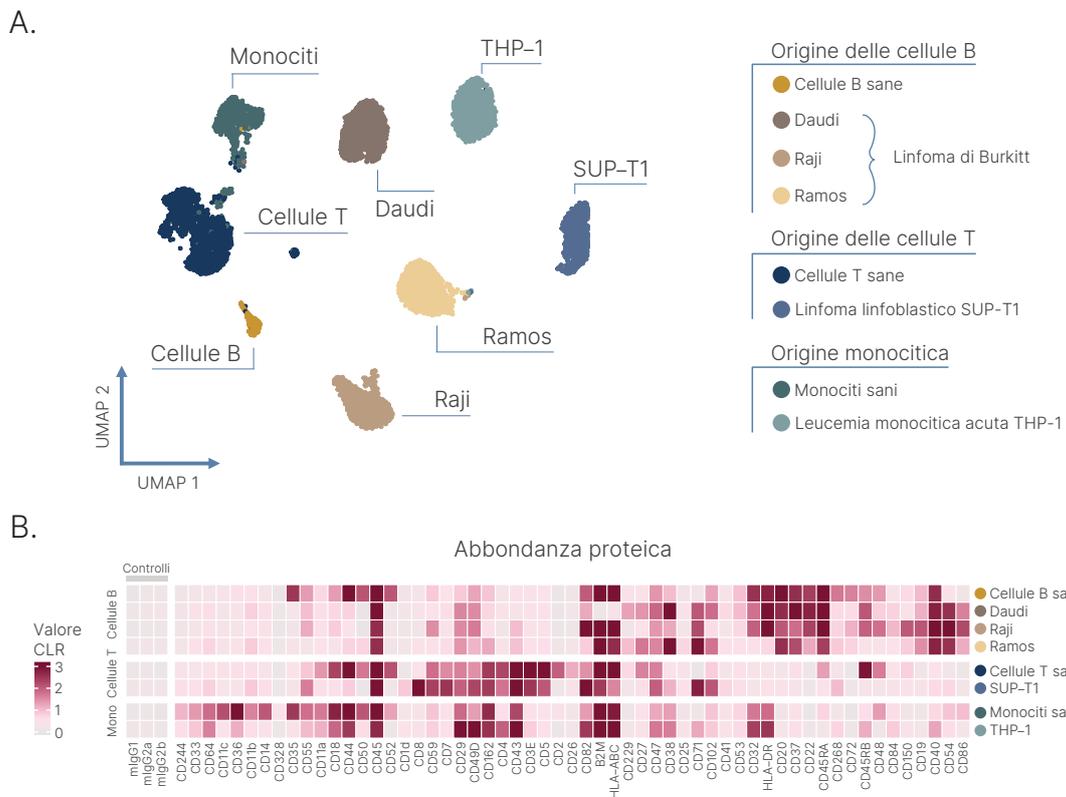


Figura 4: l'MPX evidenzia le differenze a livello di abbondanza delle proteine di superficie nelle PBMC e nelle linee tumorali derivate dalle cellule immunitarie. (A) Clustering multidimensionale di cellule T PBMC, cellule B, monociti e le cinque linee cellulari tumorali, in base all'espressione di tutti i marker del pannello immunitario. (B) Mappa termica dei livelli medi di abbondanza corretti per il CLR di tutti i marker del pannello espressi nei cluster cellulari identificati. I valori CLR sono limitati a tre.

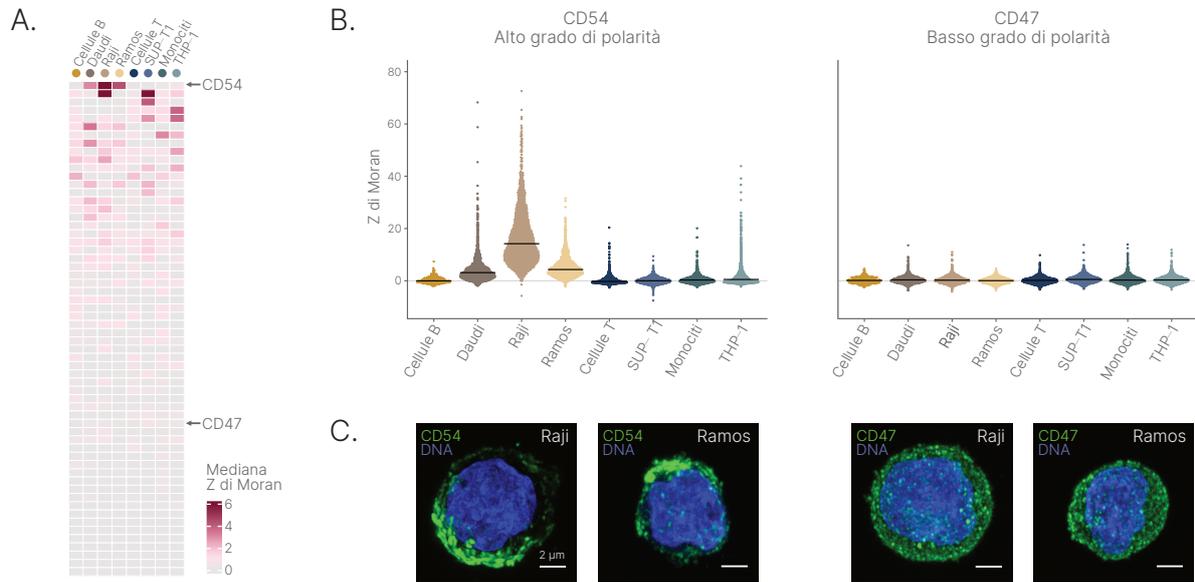


Figura 5: l'MPX rivela una polarità proteica distinta tra le PBMC e le linee cellulari tumorali derivate dalle cellule immunitarie. (A) Mappa termica dei valori Z mediani dell'indice di Moran indicante il clustering spaziale per tutti i marker del pannello espressi in ciascun tipo di cellula. I valori Z dell'indice di Moran sono limitati a sei. (B) Distribuzioni a singola cellula dei punteggi di polarità dell'MPX per CD54 e CD47 con la linea che rappresenta il punteggio mediano di polarità. (C) Micrografie a immunofluorescenza Airyscan che evidenziano il profilo polarizzato della CD54 nelle cellule Raji e Ramos (a sinistra); la CD47 mostra una distribuzione uniforme nelle stesse linee cellulari (a destra).

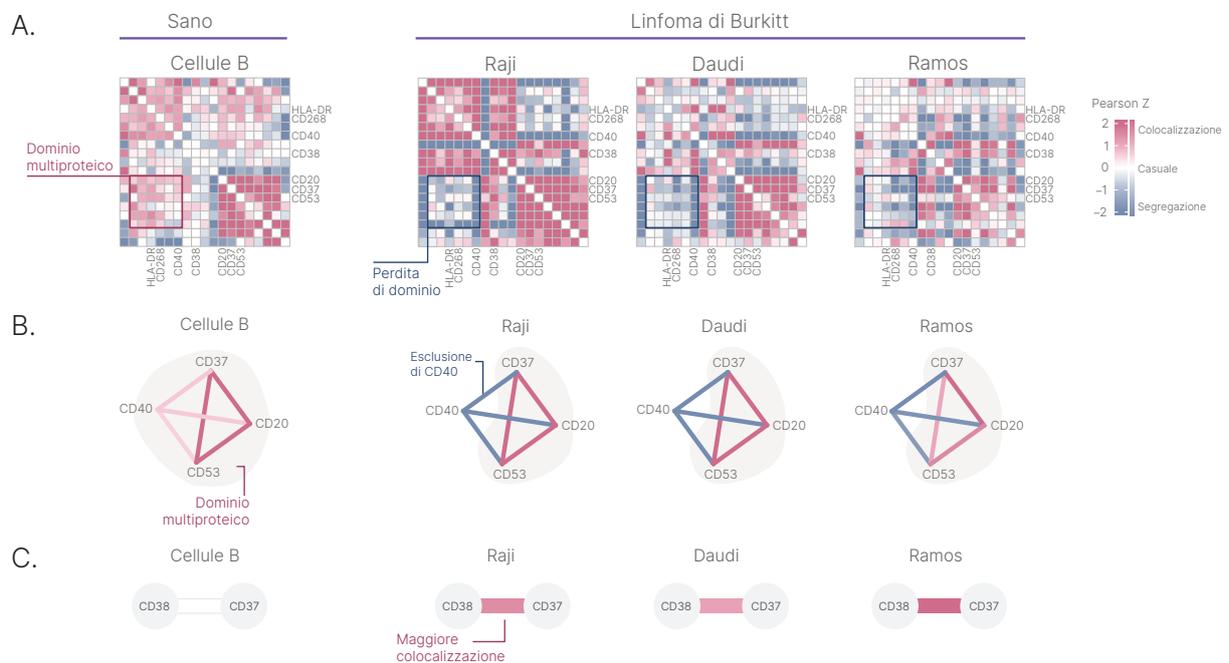


Figura 6: riorganizzazione del proteoma di membrana nelle linee cellulari del linfoma di Burkitt. (A) Punteggi mediani di colocalizzazione dell'MPX a coppie per 19 marker normalmente espressi sulle cellule B sane e sulle linee cellulari Daudi, Raji e Ramos del linfoma di Burkitt. Ogni tipo di cellula mostra un'organizzazione specifica della membrana su larga scala, mentre tutte le linee cellulari tumorali mostrano una perdita specifica del dominio multiproteina contenente proteine quali CD40, BAFF-R (CD268) e HLA-DR. (B) Rappresentazioni grafiche a rete dei punteggi di colocalizzazione proteica a coppie selezionati per i diversi tipi di cellule. È stato riscontrato che la CD40 si separa dal dominio ricco di tetraspanine associato alla CD20 in tutte le linee cellulari del linfoma di Burkitt ma non nelle cellule B sane. (C) Un'attenzione particolare alle singole interazioni proteina-proteina rivela maggiore colocalizzazione tra la CD38 e la CD37 nelle linee cellulari del linfoma di Burkitt.

Concentrandoci sulle singole coppie proteina-proteina, abbiamo identificato anche una maggiore colocalizzazione tra CD38 e CD37 nelle linee cellulari del linfoma di Burkitt (Figura 6). La CD38 è un target terapeutico nelle neoplasie maligne delle cellule B, tuttavia la proteina è espressa da molte cellule immunitarie diverse, il che determina effetti fuori target durante il trattamento.¹² La progettazione di farmaci bispecifici mirati alle coppie di proteine colocalizzanti, come la CD38 e la CD37, potrebbe offrire maggiore specificità per il tumore e rendere più efficiente la terapia. Questi risultati possono aiutare a identificare nuovi target farmacologici e biomarcatori diagnostici, migliorando in ultima analisi la nostra comprensione dei processi di segnalazione del cancro.

Riepilogo

Questa nota applicativa dimostra i vantaggi della pixellazione molecolare con i sistemi di sequenziamento Illumina per la valutazione simultanea dell'abbondanza e dell'organizzazione spaziale di 80 proteine di superficie su 1.000 singole cellule immunitarie per campione. Grazie a una visione multidimensionale del panorama delle proteine di superficie nelle singole cellule, i ricercatori possono ora svelare i meccanismi complessi della funzione delle cellule immunitarie in condizioni di salute e malattia, precedentemente inaccessibili con i metodi esistenti.

 I team di Illumina e Pixelgen Technologies sono disponibili per fornire assistenza durante l'intero flusso di lavoro di pixellazione molecolare. Per domande sul saggio e sull'analisi, contattare l'assistenza Pixelgen Technologies (support@pixelgen.com); le domande sul sequenziamento possono essere rivolte all'assistenza Illumina (techsupport@illumina.com).

Maggiori informazioni

[Piattaforme di sequenziamento Illumina](#)

[Tecnologia di pixellazione molecolare](#)

[Protocollo completo di pixellazione molecolare](#)

[Software di pixellazione per l'elaborazione e l'analisi dei dati di pixellazione molecolare](#)

Bibliografia

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](#) [versione corretta] [pubblicazione corretta su 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. Pubblicato il 1° settembre 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. Pubblicato il 18 febbraio 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. Pubblicato il 28 novembre 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02722



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-03152 ITA v1.0