

A pixelização molecular revela padrões proteicos específicos do câncer em células individuais

- Utilize a pixelização molecular e o sequenciamento da Illumina para descobrir novos mecanismos de comportamento das células imunes
- Meça a abundância e a organização espacial de 80 proteínas de superfície em 1.000 células únicas por amostra
- Realize análise proteômica de célula única e visualize mapas da superfície da lâmina usando o pipeline do Pixelator e o pacote de análise



Em parceria com



PIXELGEN
TECHNOLOGIES

Somente para pesquisa.
Não deve ser usado para
procedimentos de diagnóstico.

Introdução

A organização espacial das proteínas da membrana é crucial para a função das células imunológicas, influenciando a ligação do ligante e facilitando a comunicação precisa e direcionada. Por exemplo, a clusterização de receptores de células T aumenta o reconhecimento de antígenos e intermedia a morte direcionada de células infectadas e transformadas por vírus,^{1 a 3} enquanto o rearranjo espacial das integrinas potencializa a adesão e migração celular.^{4,5} Como ocorre com muitos outros processos celulares, a organização de proteínas de membrana pode ser explorada por células cancerosas, como visto com o aumento da clusterização de receptores de células B sendo um mecanismo direcionador do câncer em algumas malignidades de células B.^{6 a 8} Embora esses exemplos demonstrem a importância de examinar a organização de proteínas ao estudar processos de doenças, as técnicas de proteômica atual têm limitações notáveis na resolução da complexidade funcional na superfície celular.

A maioria dos métodos de proteômica de alto rendimento (p. ex., citometria de fluxo, citometria de massa e indexação celular de transcriptomas e epítomos) fornece apenas uma leitura da abundância de proteínas. Enquanto isso, a organização de proteínas no nível de célula única só tem sido acessível usando abordagens baseadas em imagem de baixa multiplexação (p. ex., microscopia e citometria de fluxo de imagem). O Molecular Pixelation (MPX) é uma técnica proteômica de célula única de ponta que permite quantificação simultânea e mapeamento espacial de 80 proteínas de membrana, particionando bioquimicamente a superfície celular em zonas espaciais e aplicando sequenciamento de última geração (NGS). Após as etapas de pixelização e NGS, os dados são montados computacionalmente em mapas quantitativos de superfície celular individual

que exibem a disposição de moléculas de proteína individuais (Figura 1).⁹ Nesta nota de aplicação, destacamos como o MPX pode ser facilmente implantado nos sistemas de sequenciamento da Illumina, oferecendo uma riqueza de novas informações para entender a função e a diversidade das células imunes.

Métodos

O MPX é projetado principalmente para a análise de células imunológicas, incluindo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) frescas ou congeladas, produtos de terapia celular e células de câncer hematológico. Todo o protocolo é realizado em um único tubo de reação para cada amostra e as células podem ser agrupadas e sequenciadas juntas sem qualquer necessidade de isolamento de célula única. O método requer que as células sejam colocadas em suspensão e o número de entrada de células pode ser de apenas 50.000. O MPX é compatível com as plataformas de sequenciamento da Illumina, demonstradas através do NextSeq™ 2000 System (Illumina, Catálogo n.º 20038897), NovaSeq™ 6000 System (Illumina, Catálogo n.º 20012850) e NovaSeq X Plus (Illumina, Catálogo n.º 20084804).

Preparação da amostra

Para este estudo, comparamos PBMCs saudáveis com linhagens de câncer de células imunes do Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Tabela 1). A pixelização foi realizada através do [Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2](#) (Pixelgen, Catálogo n.º PXGIMM002) seguindo o protocolo do fabricante (Figura 2). Para preservar a organização do proteoma da membrana, as células foram colocadas em solução e fixadas com paraformaldeído a 1%.

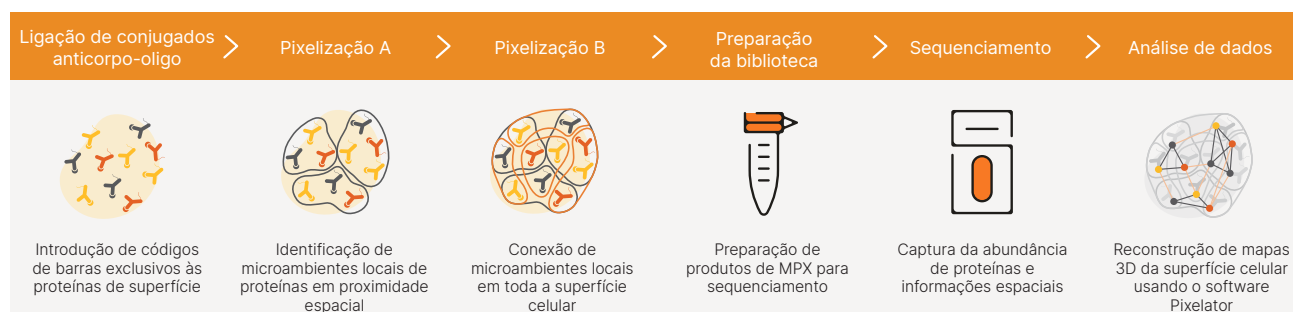


Figura 1: visão geral do MPX: as células são fixadas e identificadas com conjugados de anticorpo-oligonucleotídeo direcionados a 80 marcadores de superfície e introduzindo códigos de barras exclusivos específicos para proteínas. Os pixels A de DNA hibridizam os anticorpos, adicionando códigos de barras para criar microambientes locais da zona A, enquanto os pixels B adicionam códigos de barras espacialmente relacionados a vizinhanças adjacentes à zona A. Após o sequenciamento, as zonas interconectadas são unidas informaticamente em uma representação quantitativa e espacial de proteínas na superfície celular individual.

Tabela 1: Linhagens celulares de câncer usadas para experimentos de MPX

Tipo de câncer	Linhagem celular	N.º do catálogo 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

Preparação da biblioteca

Seguindo o protocolo MPX, as células foram suspensas em solução e coradas com o painel incluído de anticorpos oligoconjugados (AOCs) direcionados a 80 proteínas de superfície celular. Pixels de DNA e produtos de amplificação de DNA por círculo rolante de aproximadamente 100 nm de tamanho, cada um contendo várias cópias de um código de barras exclusivo, foram adicionados às células suspensas. Os pixels de DNA individuais foram hibridizados para um número limitado de AOCs localizados em estreita proximidade na superfície celular e uma reação de ligação por preenchimento de lacunas foi usada para incorporar o código de barras de pixel de DNA nos

oligonucleotídeos de anticorpos ligados. Essas etapas particionaram os AOCs ligados à superfície celular em milhares de zonas locais definidas por sua sequência compartilhada de código de barras do pixel de DNA. Esse processo foi repetido por meio de um segundo conjunto de pixels de DNA, criando dois conjuntos de zonas sobrepostas, o que permitiu a reconstrução *in silico* das posições relativas de cada zona na superfície celular. Os códigos de barras resultantes de anticorpos e pixelização foram amplificados através da Reação em cadeia da polimerase (PCR), durante os quais adaptadores de sequenciamento Illumina específicos da amostra foram incorporados. Antes do sequenciamento, os amplicons foram purificados com beads AMPure XP (Beckman Coulter, Catálogo n.º A63880).

Sequenciamento

As bibliotecas MPX exigem sequenciamentos do tipo paired-end. A Pixelgen Technologies recomenda um mínimo de 120.000 pares de leitura por lâmina, enquanto o número de amostras e lâminas por amostra pode ser ajustado dependendo da aplicação e do equipamento de sequenciamento disponível (Tabela 2).

As bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 2000 System, no NovaSeq 6000 System e no NovaSeq X Plus System. O método exigiu leituras do tipo paired-end mínimas de 44 ciclos para a leitura 1 e 78 ciclos para a leitura 2. No NextSeq 2000 System, foi usado o NextSeq 2000 P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, Catálogo n.º 20100994) e as bibliotecas foram sequenciadas com leituras do tipo paired-end de 44 × 78.

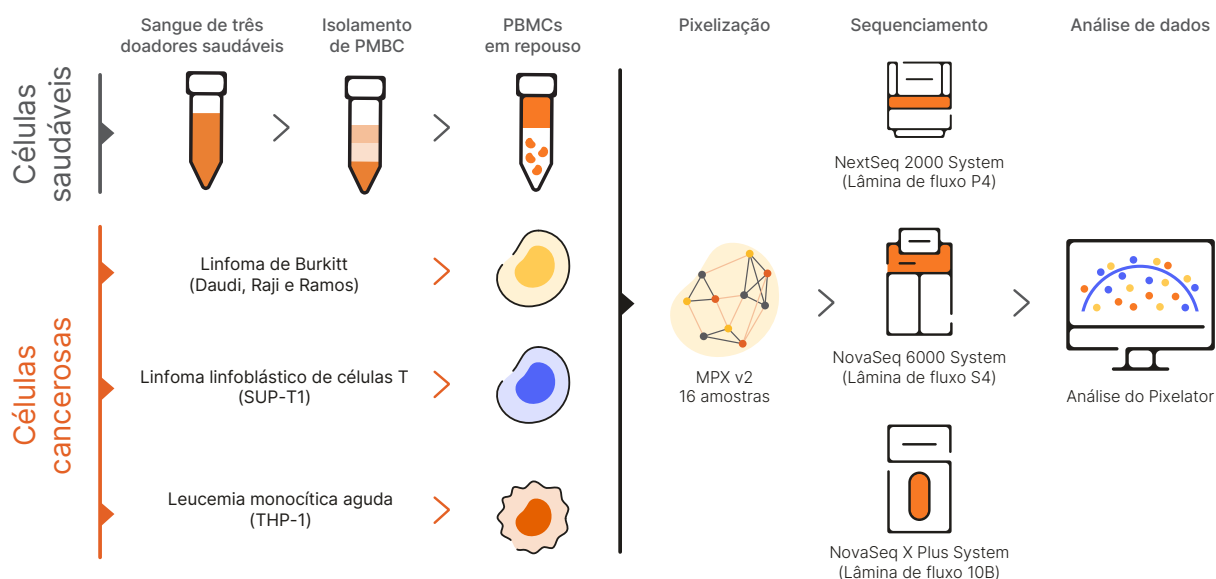


Figura 2: fluxo de trabalho do MPX para comparação de PMBCs saudáveis e linhagens de câncer derivadas de células imunológicas: suspensões de células que contêm PMBCs de um de três doadores saudáveis ou uma de cinco linhagens celulares cancerosas derivadas de células imunológicas foram coletadas e processadas duplamente com o Pixelgen Single Cell Spatial Proteomics Kit, Immunology Panel 2, Human v2. Após a realização do fluxo de trabalho do MPX, as 16 amostras foram sequenciadas em paralelo no NextSeq 2000 System, no NovaSeq 6000 System e no NovaSeq X Plus System. O processamento e a visualização de dados foram realizados através do Pixelator 0.18 com o pipeline nf-core/pixelator 1.3.0.

Tabela 2: Rendimento de amostras para ensaios MPX em sistemas de sequenciamento Illumina selecionados

	NextSeq 2000 System	NovaSeq 6000 System	NovaSeq X Plus System
Lâmina de fluxo	P4 XLEAP-SBS™ Reagent Kit (100 cycles)	Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles)	10B Reagent Kit (300 cycles)
Total de leituras únicas	1,8 bilhão	8 a 10 bilhões	10 bilhões
Células/reação de saída	1.000	1.000	1.000
Número máximo recomendado de reações por lâmina de fluxo ^a	15 ^b	66	83
Número máximo recomendado de células por lâmina de fluxo ^a	15.000 ^b	66.000	83.000

a. Cálculo realizado com 1.000 células por amostra e 120.000 ou mais leituras únicas por lâmina.
b. Dezesesseis amostras (16.000 células) foram sequenciadas neste experimento, gerando um total de 2,13 bilhões de leituras na lâmina de fluxo P4.

Para o NovaSeq 6000 System, foi usado o NovaSeq Xp 4-lane Kit v1.5 (300 cycles) (Illumina, Catálogo n.º 20043131) e as bibliotecas foram sequenciadas com leituras do tipo paired-end de 150 × 150 na National Genomics Infrastructure (NGI) em Estocolmo, Suécia. Para o NovaSeq X Plus System, foi usado o NovaSeq X Series 10B Reagent Kit (300 cycles) (Illumina, Catálogo n.º 20085594) e as bibliotecas foram sequenciadas com leituras do tipo paired-end de 150 × 150 na Clinical Genomics Platform em Estocolmo, Suécia. Recomendações adicionais para configuração de leitura e spike-in de PhiX estão disponíveis no site da [Pixelgen Technologies](#).

Análise e visualização de dados

As leituras de sequenciamento foram processadas através do pipeline de código aberto do Pixelator, disponível como parte da iniciativa nf-core ([nf-core/pixelator](#)). O Pixelator foi usado para reconstruir mapas de proteínas de superfície de células individuais e criar arquivos de dados gerados para controle e análise de qualidade. Juntamente com os arquivos PXL que contêm os dados processados para análise posterior, estatísticas e geração de figuras, o Pixelator também gerou um relatório da Web resumindo as principais métricas de qualidade para o experimento.

Os arquivos PXL foram facilmente processados por ferramentas comuns de análise ômica de célula única, incluindo Scanpy e Seurat, e continham quatro elementos primários: contagens de abundância de proteínas para cada proteína e célula, pontuações de polaridade MPX para cada proteína e célula, pontuações de colocalização MPX para a comparação pareada de todas as proteínas do painel em cada célula e uma lista de borda contendo os dados para criar representações gráficas de células individuais, bem como as informações para calcular estatísticas espaciais. [O suporte e os tutoriais de análise MPX](#) estão prontamente disponíveis no site da Pixelgen Technologies.

Resultados

O MPX é compatível com os atuais sistemas de sequenciamento Illumina de médio a grande rendimento. Para demonstrar isso, uma amostra de PBMC foi preparada usando MPX, conforme descrito, e sequenciada em três plataformas Illumina diferentes (ou seja, NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System). Os arquivos de dados PXL foram analisados e sua qualidade foi avaliada através do R package, [pixelatorR](#) (v0.10.2). Componentes com tamanhos extremos e agregados com potencial de interferência nos resultados foram removidos antes da análise posterior. As contagens brutas foram normalizadas através da transformação da razão logarítmica centralizada (CLR)¹⁰ e resumidas como o valor médio de CLR por marcador. Uma comparação das saídas de abundância do MPX confirmou que resultados semelhantes de alta qualidade podem ser obtidos nas plataformas de sequenciamento da Illumina ([Figura 3](#)).

A combinação da abundância de proteínas com análise espacial no nível de célula única oferece o potencial de fenotipagem profunda e caracterização detalhada do comportamento da célula imune. Demonstramos essa capacidade comparando linhagens celulares de câncer hematológico com células imunológicas saudáveis em relação à abundância de proteína ([Figura 4](#)), à polarização de proteína ([Figura 5](#)) e à colocalização de proteína ([Figura 6](#)).

Por exemplo, em linhagens celulares de linfoma de Burkitt, mostramos que o conteúdo de domínios multiproteína é alterado utilizando proteínas como o alvo terapêutico CD40, segregado por meio de domínios ricos em tetraspanina, enquanto o CD38 é enriquecido. Curiosamente, foi constatado que a ligação de CD40 com medicamentos de anticorpos induz respostas opostas em células B saudáveis e células de linfoma de Burkitt¹¹ e nossas descobertas no MPX sugerem que a organização de CD40 pode ser um condutor para essas respostas diferenciais ([Figura 6](#)).

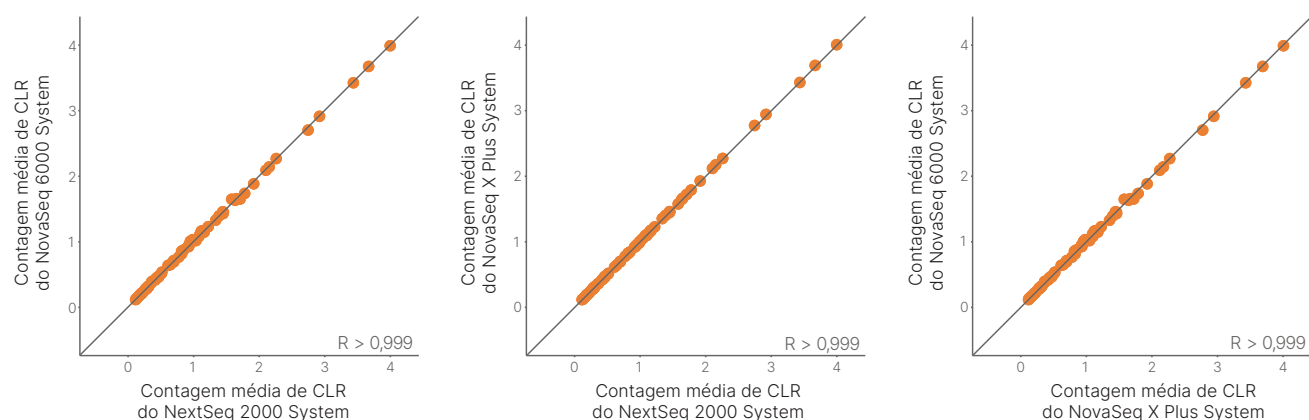


Figura 3: correlação entre as saídas de MPX nos sistemas de sequenciamento da Illumina: os dados do MPX de uma única amostra de PBMC sequenciada em três plataformas da Illumina (NextSeq 2000 System, NovaSeq 6000 System e NovaSeq X Plus System) foram analisados através do R package, pixelatorR (v0.10.2). As contagens brutas foram normalizadas mediante o uso da transformação de CLR¹⁰ e resumidas como o valor médio de CLR por marcador. A correlação linear entre todos os três sistemas, e em todos os marcadores, mostra uma correlação significativa (valor de $P \leq 0,0001$).

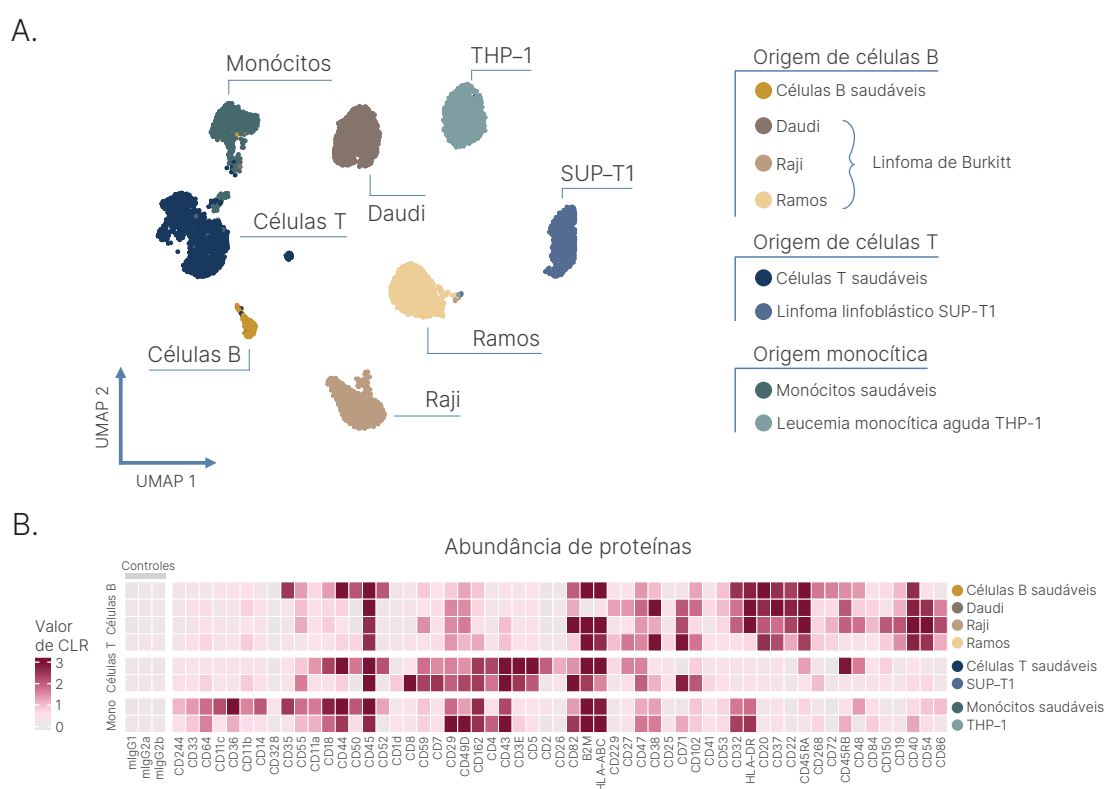
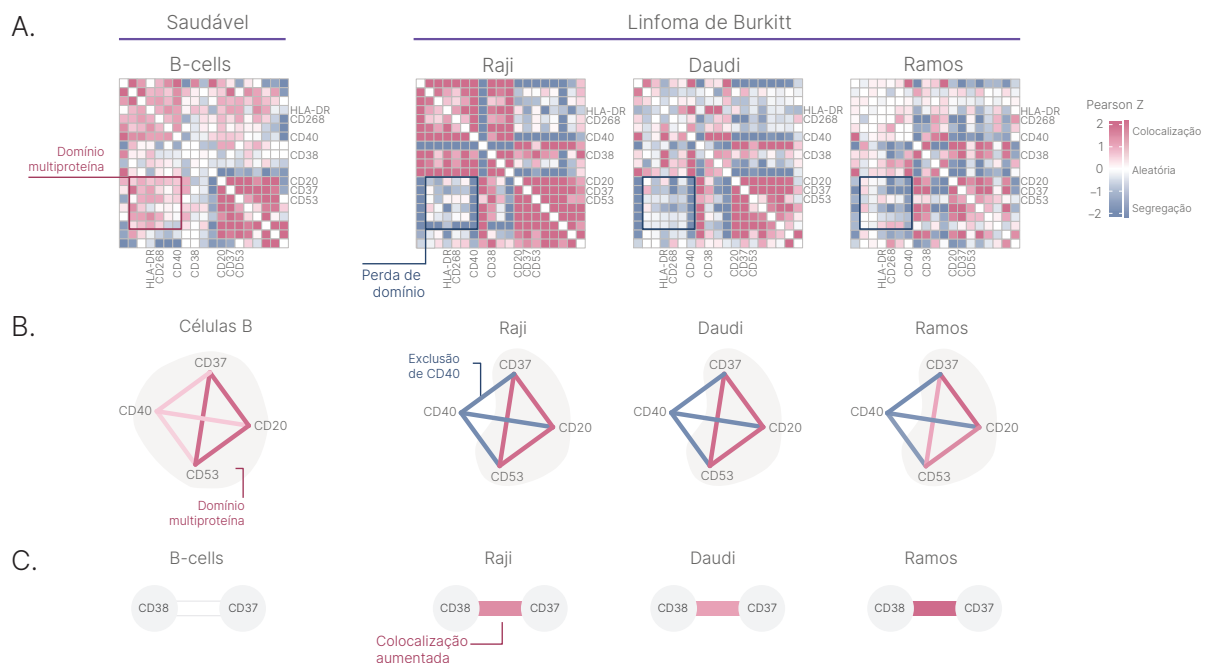
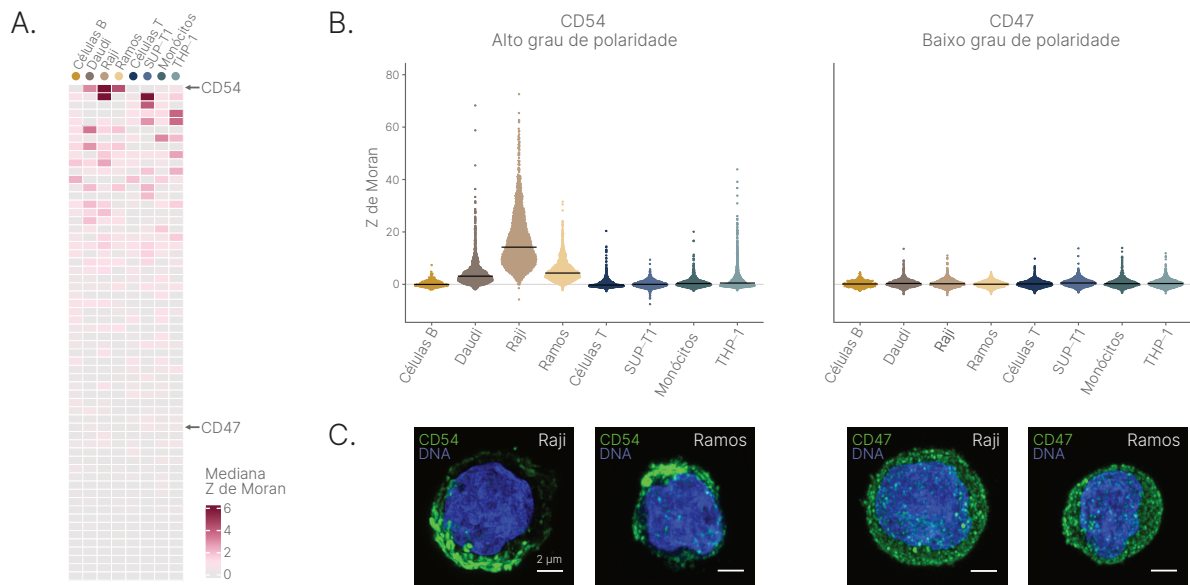


Figura 4: o MPX destaca a abundância diferencial de proteínas de superfície em PBMCs e linhagens de câncer derivadas de células imunológicas: (A) clusterização multidimensional de células T, células B, monócitos e cinco linhagens celulares de câncer de PBMC, com base na expressão de todos os marcadores do painel imunológico. (B) Mapa de calor dos níveis medianos de abundância, ajustados por CLR, de todos os marcadores de painel expressos nos clusters de células identificados. Os valores de CLR são limitados ao valor 3.



Com foco em pares de proteína-proteína individuais, também identificamos um aumento da colocalização entre CD38 e CD37 em linhagens celulares do linfoma de Burkitt (Figura 6). O CD38 é um alvo terapêutico em malignidades de células B, mas a proteína é expressa por muitas células imunes diferentes, causando efeitos imprecisos durante o tratamento.¹² O desenvolvimento de medicamentos biespecíficos direcionados a pares de proteínas colocalizantes, como a CD38 e a CD37, poderia fornecer mais especificidade tumoral e melhorar a eficiência do tratamento. Essas descobertas podem ajudar a identificar novos alvos de medicamentos e biomarcadores de diagnósticos, melhorando, em última análise, nossa compreensão sobre os processos de sinalização no câncer.

Resumo

Esta nota de aplicação demonstra as vantagens do Molecular Pixelation, com sistemas de sequenciamento Illumina, para avaliar simultaneamente a abundância e a organização espacial de 80 proteínas de superfície em 1.000 células imunes individuais por amostra. Com uma visão multidimensional do cenário de proteínas de superfície em células únicas, os pesquisadores agora podem desvendar mecanismos complexos da função de células imunes na saúde e em doenças que antes eram inacessíveis com os métodos existentes.



As equipes de suporte da Illumina e da Pixelgen Technologies estão disponíveis para ajudar durante todo o fluxo de trabalho de pixelização molecular. Entre em contato com o suporte da Pixelgen Technologies (support@pixelgen.com) para obter informações sobre ensaios e análises e entre em contato com o suporte da Illumina (techsupport@illumina.com) para obter informações sobre sequenciamentos.

Saiba mais

[Plataformas de sequenciamento da Illumina](#)

[Tecnologia de pixelização molecular](#)

[Protocolo completo de pixelização molecular](#)

[Software Pixelator para processamento e análise de dados de pixelização molecular](#)

Referências

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. Publicado em 1º de setembro 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. Publicado em 18 de fevereiro 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. Publicado em 28 de novembro de 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02722



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-03152 PTB v1.0