

Диссоциация ACME HS: универсальный метод фиксации-диссоциации клеток свежемороженой ткани надпочечника человека для scRNA-seq

Щербакова А.^{1*}, Уткина М.¹, Девятияров Р.^{1, 2, 3, 4}, Рябова А.¹, Урусова Л.¹

¹ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия

² Научный центр регуляторной геномики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Казань, Россия

³ Высшая школа медицины, Университет Джунтендо, Токио, Япония

⁴ Центр «Улучшение жизни технологиями будущего» (ЛИФТ), Москва, Россия

* nastya.shcherbakova1@gmail.com

Ключевые слова: scRNA-seq; диссоциация тканей; свежемороженые ткани; фиксированные клетки; надпочечники человека

Мотивация и цель: Главным этапом в секвенировании единичных клеток, определяющим биологическую релевантность и достоверность полученных scRNA-seq данных, является пробоподготовка образцов. Современные методы диссоциации не обеспечивают получение высококачественной суспензии живых одиночных клеток, особенно когда диссоциация затруднена морфологическими особенностями ткани или невозможна [1]. Мы представляем метод уксусно-метанольной диссоциации ACME HS (ACetic (acid)-MEthanol Hight Salt) для получения фиксированных и целых клеток из свежемороженого материала [2]. В данной работе мы провели сравнительное исследование клеточной гетерогенности в наборах данных единичных клеток мозгового слоя надпочечников человека, полученных с помощью ACME HS и ферментативной диссоциации и изоляции ядер.

Методы и алгоритмы: С помощью метода scRNAseq мы получили данные транскриптомов от 15 образцов тканей медуллярного слоя надпочечника человека с общим количеством 94.807 клеток и ядер. Каунт матрицы были получены с помощью Cell Ranger (v6.1.1). Поиск дифференциально экспрессированных генов осуществлялся Seurat (v4.9.9 и v5.0.0). Интеграция выполнялась с использованием RunHarmony для обработанных Seurat объектов. Основные клеточные типы были аннотированы с помощью Conos43 (v1.5.0). Анализ скорости РНК выполнялся с помощью Velocity (v0.17).

Результаты: Мы определили основные клеточные типы мозгового слоя надпочечника взрослого человека, включая медуллярные хромаффинные клетки, предшественники шванновских клеток (SCPs), васкулярные клетки кровеносных сосудов, перициты и иммунные клетки, которые были представлены во всех наборах данных, полученных с помощью ACME HS и ферментативной диссоциации, и отдельных ядер (рис. 1a). Хромаффинные клетки составляли большинство аннотированных клеточных типов (94 %) (рис. 1a). При изучении гетерогенности основных популяций хромаффинных клеток мы наблюдали потерю нескольких субкластеров в наборах данных ядер, за исключением ферментативных и ACME HS. С помощью UMAP визуализации было установлено, что хромаффинные клетки

экспрессировали основные тканеспецифичные маркерные гены, такие как *CHGA*, *SYP*, *DBH*, и *PNMT* [3, 4] для каждого из методов диссоциации (рис. 1b). При детальном анализе расширенной панели генов было установлено, что ACME HS сохраняет «типовые» гены, специфичные для хромаффинных клеток, включая *GSTA1*, *CYP11B1*, *HSD3B2*, *CYP17A1*, *TAC3*, *RNF17*, *MCOLN3*, *SIX3-AS1*, *CCN3*, *STAR* и *COX6*, экспрессия которых не наблюдалась в наборах данных для ферментативного и ядерного методов. Для того чтобы продемонстрировать согласованность между методом ACME HS и ферментативной диссоциацией, а также выявить их преимущества перед методом выделения ядер, нами была оценена динамика процесса транскрипции.

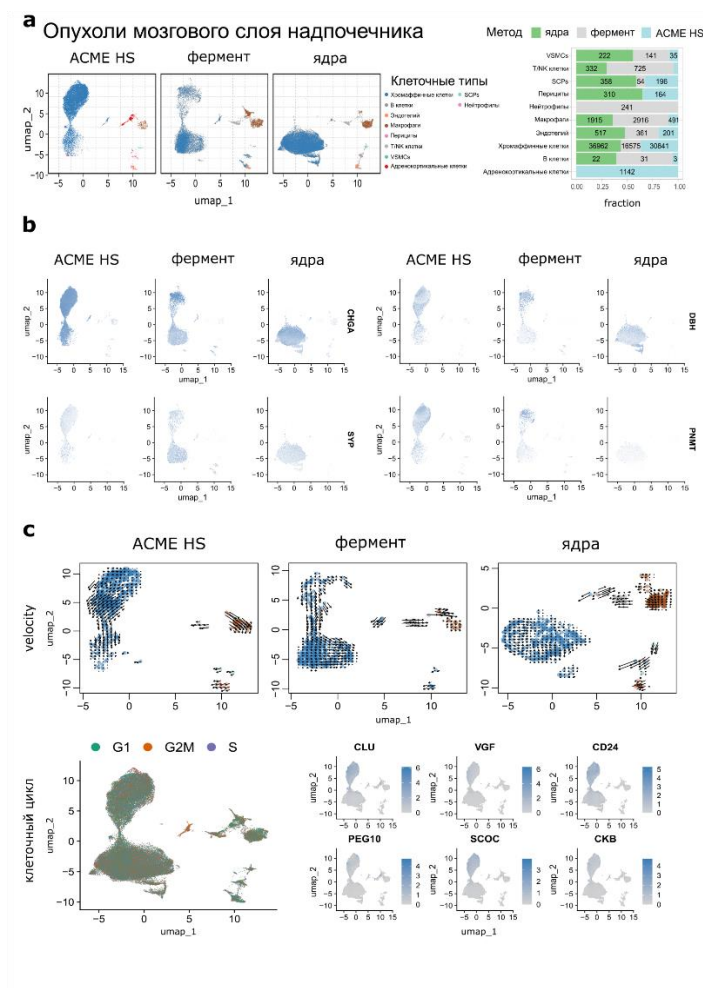


Рис. 1. Анализ данных scRNA-seq мозгового слоя надпочечника человека, полученных различными методами диссоциации – ACME HS, ферментативным и изоляцией ядер. **a.** Представленность клеточных типов и фракций среди трех методов диссоциации. **b.** UMAP визуализация экспрессии основных тканеспецифичных генов, включая *CHGA*, *SYP*, *DBH*, и *PNMT*. **c.** Анализ скорости РНК (Velocity) и клеточного цикла. Дифференциально экспрессируемые гены, связанные с контролем клеточного цикла, показаны на отдельных эмбедингах

Анализ скорости РНК (velocity) обнаружил схожее движение дифференцирующихся хромаффинных клеток, включая движение к промежуточному состоянию дифференцировки и от него для двух методов диссоциации – АСМЕ HS и ферментативного. Кроме того, мы идентифицировали активно пролиферирующие клетки, которые находились в начальной точке траектории скорости РНК и экспрессировали гены, ответственные за G2M/S фазовый переход – *CLU*, *VGF*, *CD24*, *PEG10*, *SCOC* и *СКВ* (рис. 1с). Данные ядерного метода изоляции не содержали информации о направлении дифференцировки и связи между фазами клеточного цикла.

Выводы: В данном исследовании мы продемонстрировали эффективность и сопоставимость метода диссоциации АСМЕ HS с ферментативным подходом, подчеркнув преимущества АСМЕ HS перед изоляцией ядер. Транскрипционные профили АСМЕ HS отражают тканеспецифичную экспрессию генов и подходят для изучения промежуточных состояний дифференцировки популяций раковых клеток и клеток-предшественников. АСМЕ HS – надежный и универсальный метод получения фиксированных клеток из свежемороженых тканей человека, разработанный для транскриптомики единичных клеток и обеспечивающий анализ с высоким разрешением.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2022-310 от 20 апреля 2022 г.).

ACME HS dissociation: an adaptable cell fixation-dissociation method for fresh-frozen human adrenal gland tissues for scRNA-seq

Shcherbakova A.^{1*}, Utkina M.¹, Deviatiiarov R.^{1, 2, 3, 4}, Ryabova A.¹, Urusova L.¹

¹ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

² Regulatory Genomics Research Center, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

³ Graduate School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan

⁴ Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Moscow, Russia

* nastya.shcherbakova1@gmail.com

Key words: scRNA-seq; tissue dissociation; fresh-frozen tissue; fixed single cell; human adrenal glands

Motivation and Aim: Sample preparation is a crucial step in single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) of human tissues to obtain biologically relevant data. Current methods encounter challenges in obtaining high-quality single-cell suspensions, especially in tissues where live cell isolation is difficult [1]. To address this gap, we introduce ACME HS (ACetic (acid)-MEthanol Hight Salt), an optimized approach that facilitates the retrieval of intact and whole cells from fresh-frozen tissues [2]. In this study, we conducted a comparative analysis of cellular heterogeneity in datasets of single cells from the human adrenal medulla obtained from ACME HS, enzymatic dissociation, and nuclei isolation.

Methods and Algorithms: We analyzed transcriptomes from adult human adrenal glands using a single-cell transcriptomics approach (10X Genomics Chromium). Samples from

15 patients were included in the study for comparative analyses, totaling 94,807 cells and nuclei. The Raw sequenced reads were processed with 10X Cell Ranger (v6.1.1). Integrated embeddings and expression matrices were generated using Seurat (v4.9.9 and v5.0.0). Sample integration was carried out using RunHarmony on preprocessed Seurat objects. The major cell types were identified by the label propagation function in Conos43 (v1.5.0). Velocity analysis was performed with Velocyto (v0.17) and visualized using Velocyto.R (v0.6) on integrated embeddings.

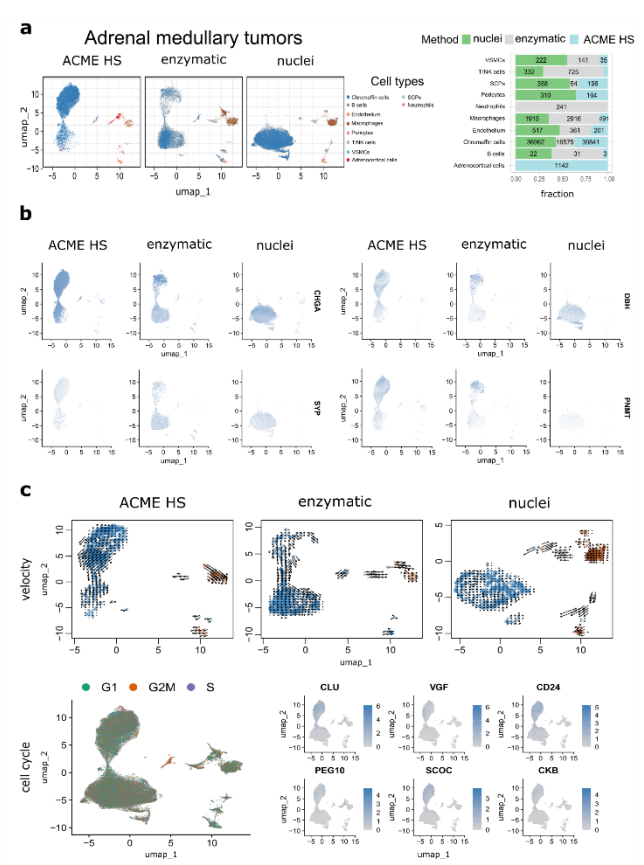


Fig. 1. scRNA-seq data analysis for human adrenal medullary glands by different dissociation methods – ACME HS, enzymatic, and nuclei isolation. **a.** Major cell type compositions and fractions among preparation methods. **b.** The key tissue-specific genes expression by UMAP visualization namely, *CHGA*, *SYP*, *DBH*, and *PNMT*. **c.** Velocity and cell cycle estimation for adrenal medullary tumor dataset. Examples of differentially expressed genes associated with cell cycle control are shown on the individual embeddings

Results: To compare the representation of distinct cell types among enzyme, nuclei, and ACME HS datasets, we generated integrated embeddings and annotations. Our analysis revealed all major cell types of the adult adrenal medulla, including numerous subtypes of medullary chromaffin cells, Schwann cell precursors (SCPs), vascular smooth muscle cells (VSMCs), pericytes, and immune cells represented and integrated in all three methods – enzymatic, ACME HS, and nuclei isolation (Fig. 1a). Chromaffin cells

constituted the majority of annotated cell types (94 %) (Fig. 1a). While studying the heterogeneity of major chromaffin cell populations, we observed the absence of several chromaffin subclusters in the nuclei datasets, which were consistently present in both ACME HS and enzymatic dissociation methods. We found that chromaffin cells expressed key tissue-specific marker genes such as *CHGA*, *SYP*, *DBH*, and *PNMT* in each method [3, 4] (Fig. 1b). To assess the broader efficacy of each method, we analyzed a comprehensive panel of genes specific for chromaffin cells and revealed that ACME HS retained the top genes, including *GSTA1*, *CYP11B1*, *HSD3B2*, *CYP17A1*, *TAC3*, *RNF17*, *MCOLN3*, *SIX3-AS1*, *CCN3*, *STAR*, and *COX6*, which were missing in the nuclei and enzyme datasets. In order to demonstrate consistency between ACME HS and enzymatic protocols together with their advantages over the nuclei isolation method we conducted RNA velocity analysis on individual samples. RNA velocity recapitulated the transcriptional dynamics within ACME HS and enzyme datasets, illustrating the overall movement of differentiating chromaffin cells, including movement towards and away from the intermediate differentiation state. Additionally, we identified cells associated with a proliferative state by determining their starting point in the velocity trajectory, marked by specific G2M/S phase genes such as *CLU*, *VGF*, *CD24*, *PEG10*, *SCOC*, and *CKB* (Fig. 1c). Nuclei-based data were largely lacking information regarding differentiation directions and connectivity between cell cycle phases.

Conclusion: In this study, we demonstrated the consistency of the ACME HS dissociation approach compared to the enzymatic method, highlighting its advantages over nuclei isolation. ACME HS transcriptional profiles maintain tissue-specific gene expression and are suitable for studying intermediate differentiation states of cancer and progenitor cell populations. Overall, ACME HS is a robust and practical method for obtaining fixed intact cells from primary human tissues, specifically designed for single-cell RNA transcriptomics and enabling high-resolution analysis.

Funding: The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2022-310 from April 20, 2022).

Список литературы/References

1. Machado L., Relaix F., Mourikis P. Stress relief: emerging methods to mitigate dissociation-induced artefacts. *Trends Cell Biol.* 2021;31(11):888-897
2. Garcia-Castro H., Kenny N.J., Iglesias M. et al. ACME dissociation: a versatile cell fixation-dissociation method for single-cell transcriptomics. *Genome Biol.* 2021;22:89
3. Mete O. et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Paragangliomas and Pheochromocytomas. *Endocr Pathol.* 2022;33:90-114
4. Konosu-Fukaya S. et al. Catecholamine-Synthesizing Enzymes in Pheochromocytoma and Extraadrenal Paraganglioma. *Endocr Pathol.* 2018;29:302-309