

1. INTRODUCCIÓ

La cèl·lula és la unitat fonamental de la vida. Pràcticament tot el coneixement actual deriva d'anàlisis de poblacions senceres, des de milers fins a milions de cèl·lules. Aquests anàlisis són molt informatius, però a nivell unicel·lular existeix variabilitat genòmica i transcriptòmica.

Els anàlisis en massa de poblacions deixen veure una distribució Gaussiana de l'expressió genòmica, però en els transcrits de més baixa expressió s'ha caracteritzat una distribució bimodal, també anomenada de *on-off*, on només algunes cèl·lules expressen els transcrits. És més, aquests transcrits poden ser importants per al funcionament cel·lular, com per exemple factors de transcripció. En els anàlisis en massa de poblacions cel·lulars no es pot detectar si totes les cèl·lules d'una població expressen un transcrit a un nivell o bé si es dona expressió *on-off* per part d'una subpoblació.

Per poder detectar aquesta variabilitat és interessant seqüenciar el material genètic unicel·lular, però amb els mètodes de seqüenciació actuals, anomenats NGS (de l'anglès *next generation sequencing*), no pot detectar el material genètic d'una sola cèl·lula. Així doncs, es necessiten mètodes d'amplificació per a poder seqüenciar.

3. ISOLACIÓ CEL·LULAR

Taula 1: Característiques tècniques dels mètodes d'isolació cel·lular

Tècnica	Selecció	Throughput	Automatització	Volum final	Nombre cèl·lules inicial	Estadi inicial	Pertorbació transcriptoma
Micromanipulació	Aleatòria o visual	Desenes	Majoritàriament manual	µL-nL	Mitjà	Suspensió	Sí
FACS	Molts paràmetres	Centenars	Automatitzat	nL	Alt	Suspensió	Sí
LCM	Visual	Desenes	Manual	fL	Baix	Tall de teixit	No
Microarrays	Aleatòria	Centenars	Automatitzat	nL	Mitjà	Suspensió	Sí

FACS, fluorescence-activated cell sorting; LCM, laser capture microdissection.

4. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

Taula 2: Característiques tècniques dels mètodes d'amplificació de DNA

Tècnica	Polimerasa	Desplaçament de cadena	PCR	Fidelitat	Coverage	Detecció SNPs	Detecció CNVs
Basades en PCR	Taq	No	Sí	Baixa (3 en 10 ⁴)	Baix	Falsos positius i falsos negatius	No acurat
MDA	φ29	Sí	No	Bastant alta (1 en 10 ⁶⁻⁷)	Alt	Falsos negatius	No acurat
MALBAC	Bst	Sí	Sí	Baixa (4 en 10 ⁵)	Molt alt	Falsos positius	Acurat

MDA, multiple displacement amplification; MALBAC, multiple annealing and looping-based amplification circles; SNP, single nucleotide polymorphism; CNV, copy number variant.

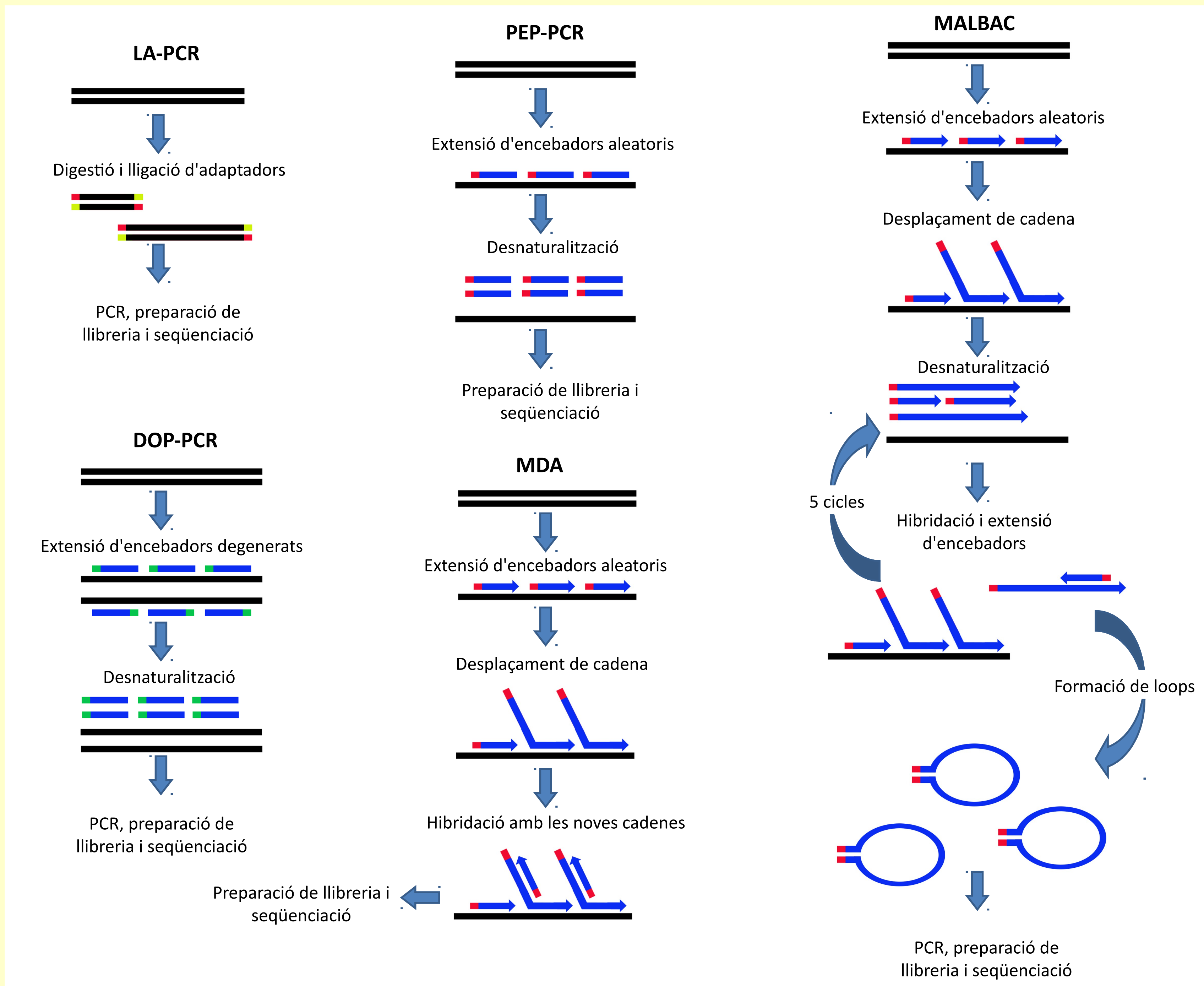


Figura 2: Tècniques d'amplificació de DNA. LA-PCR, ligation-anchored PCR; PEP-PCR, primer extension preamplification PCR; DOP-PCR, degenerate oligonucleotide-primed PCR

APLICACIONS

- Definir un arbre de línies cel·lulars per a tot un organisme. Entendre la seva dinàmica i les variacions en malaltia o envelliment podria ajudar a respondre dubtes en biologia humana. No es pot aconseguir informació sobre l'estat de cèl·lules predecessores. Per aconseguir un arbre detallat s'haurien d'anàlitzar cèl·lules en tots els estadis de la vida i per a tots els teixits. Actualment el cost de la seqüenciació unicel·lular impedeix arribar a aquesta meta.
- Càncer. Estudiant els CNVs d'un càncer es pot reconstruir la seva història, conèixer més a fons els mecanismes de desenvolupament tumoral i l'estructura de la seva població. S'ha pogut descriure el procés de creixement: una fase de rearranjaments cromosòmics seguida d'una expansió clonal, que podia donar lloc a metastasis.
- Estudi d'haplotips i SNPs. Una aplicació clínica és el diagnòstic genètic preimplantacional. Una altra aplicació és la identificació de mutacions en el DNA microstèl·lit, que permet conèixer l'estructura d'una població, detectant subpoblacions i cèl·lules mare.
- Estudi de poblacions microbianes. Permet caracteritzar microorganismes no cultivables, descobrir nous gens i identificar els organismes productors de gens que els estudis metagenòmics no poden identificar. També permet estudiar l'heterogeneïtat dins d'una espècie o fins i tot dins d'una soca.

6. CONCLUSIONS

- Tècnica molt potent que dona coneixements d'heterogeneïtat cel·lular com no s'havien pogut veure fins ara.
- Per arribar a un coneixement més profund de la biologia unicel·lular s'han d'ajuntar les dades obtingudes de genoma i transcriptoma unicel·lulars amb el proteoma i l'epigenoma, i correlacionar tota aquesta informació a nivell fisiològic
- Conjunt de tecnologies molt noves que necessita moltes millores per arribar a complir tots els objectius que promet:
 - S'ha d'aconseguir mantenir la informació espacial i l'estat transcriptòmic de les cèl·lules amb una tècnica d'alt rendiment.
 - S'ha de reduir la quantitat de DNA inicial necessària per evitar les desviacions introduïdes pels mètodes d'amplificació actuals. Idealment, s'hauria de desenvolupar una tècnica que permetés seqüenciar a partir d'una sola cèl·lula sense cap pas d'amplificació, amb alt rendiment i processant moltes cèl·lules alhora.
- Actualment els costos de seqüenciació fan impossibles molts projectes. S'ha d'aconseguir baixar el preu de seqüenciació per cèl·lula, i millorar els aparells d'automatització per tal de baixar els volums de reacció i augmentar el rendiment.

2. METODOLOGIA

Revisió bibliogràfica sobre les tècniques de seqüenciació unicel·lular. Cerca d'articles i revisions al catàleg de l'editorial Elsevier i a l'eina PubMed. Criteris de cerca: single-cell sequencing, single-cell isolation, mRNA-seq, single-cell sequencing applications, etc.

El treball es centra en revisar la isolació cel·lular, les tècniques d'amplificació de DNA i de RNA i les seves possibles aplicacions.

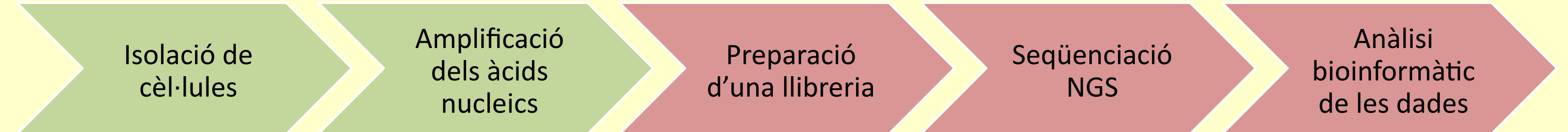


Figura 1: Protocol d'anàlisi unicel·lular. Ressaltats en verd els passos en què es centra aquest treball.

5. SEQÜENCIACIÓ DE RNA

Taula 3: Característiques tècniques dels mètodes d'amplificació de RNA

Tècnica	Principi tècnic	Desviació de posició	Detecció splicing alternatiu	Detecció nous transcrits
Mètode de Tang	Adició cua poli-A	Extrem 3'	Només extrem 3'	Només extrem 3'
CEL-seq	Transcripció <i>in vitro</i>	Força a extrem 3'	No	No
Quartz-seq	Adició cua poli-A	Extrem 3'	Només a extrem 3'	Només a extrem 3'
Smart-seq	Desplaçament de cadena	Baixa a extrem 3'	Sí	Sí
STRT	Desplaçament de cadena	Força a extrem 5'	No	No
Seqüenciació quantitativa	Identificació amb UMIs	Força a extrem 5'	No	No

CEL-seq, cell expression by linear amplification and sequencing; Smart-seq, switching mechanism at the 5' end of the RNA template sequencing; STRT, single-cell tagged reverse transcription; UMI, unique molecular identifier.

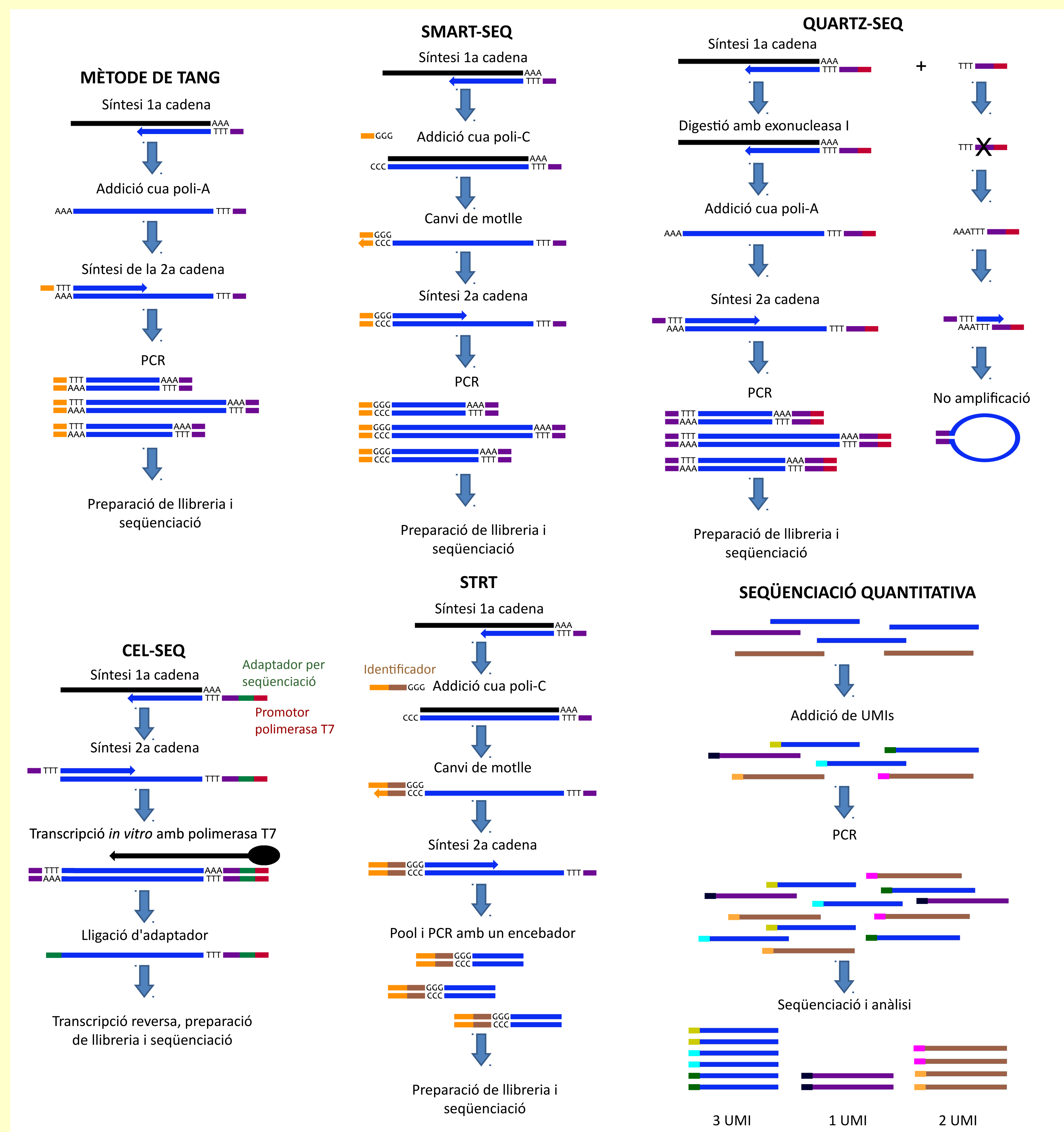


Figura 3: Tècniques d'amplificació de RNA.

APLICACIONS

- Estudi de l'heterogeneïtat transcripcional en les poblacions. Elaboració d'un mapa transcripcional dels estadis intermedis durant la diferenciació i reprogramació. Es podria arribar a redefinir el concepte de tipus cel·lulars.
- Medicina. Caracteritzant els estadis transcripcionals clau per a les malalties i comparant teixits sans i malalts es poden trobar nous biomarcadors. També es pot monitoritzar l'avanç de les malalties i estudiar la resposta i desenvolupament de resistència a fàrmacs.
- Càncer. Es poden detectar tipus cel·lulars escassos, com les cèl·lules mare canceroses i les cèl·lules tumorals en circulació (CTCs). Amb el seu estudi es podran conèixer els mecanismes de metastasi i contrarestar-los. També es poden caracteritzar els diferents estadis de la malaltia.

7. REFERÈNCIES

- Baslan, T., & Hicks, J. (2014). Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev*, 26, 59-65.
- Blainey, P.C. (2013). The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 37(3), 407-427.14.
- Liang, J., Cai, W., & Sun, Z. (2014). Single-cell sequencing technologies: current and future. *J Genet Genomics*, 41(10), 513-528.24.
- Shapiro, E., Biezuner, T., & Linnarsson, S. (2013). Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*, 14(9), 618-630.