

---

---

# Transcriptional analysis of cystic fibrosis airways at single-cell resolution reveals altered epithelial cell states and composition

Nature Medicine volume 27, pages 806–814 (2021)

<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01332-7>

---

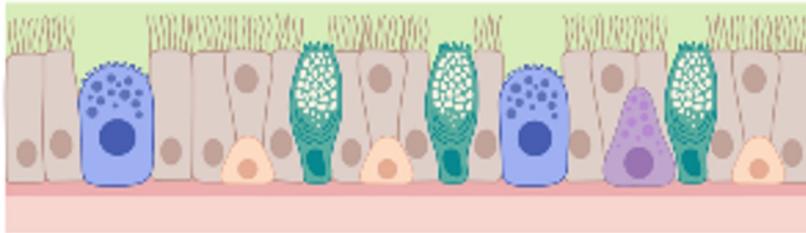
---

Di Palma Lorenzo  
Fritzschi Chiara  
Frigo Carlotta

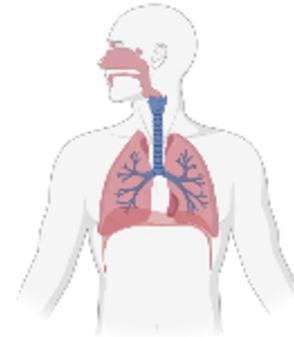
# Introduzione

→ Scopo del lavoro: utilizzare tecniche di scRNA-seq per caratterizzare le differenze tra cellule delle vie aeree di pazienti CF rispetto ai sani;

lo studio si impone di caratterizzare molecolarmente l'epitelio delle vie aeree prossimali, in modo da facilitare lo sviluppo di terapie future per CF.



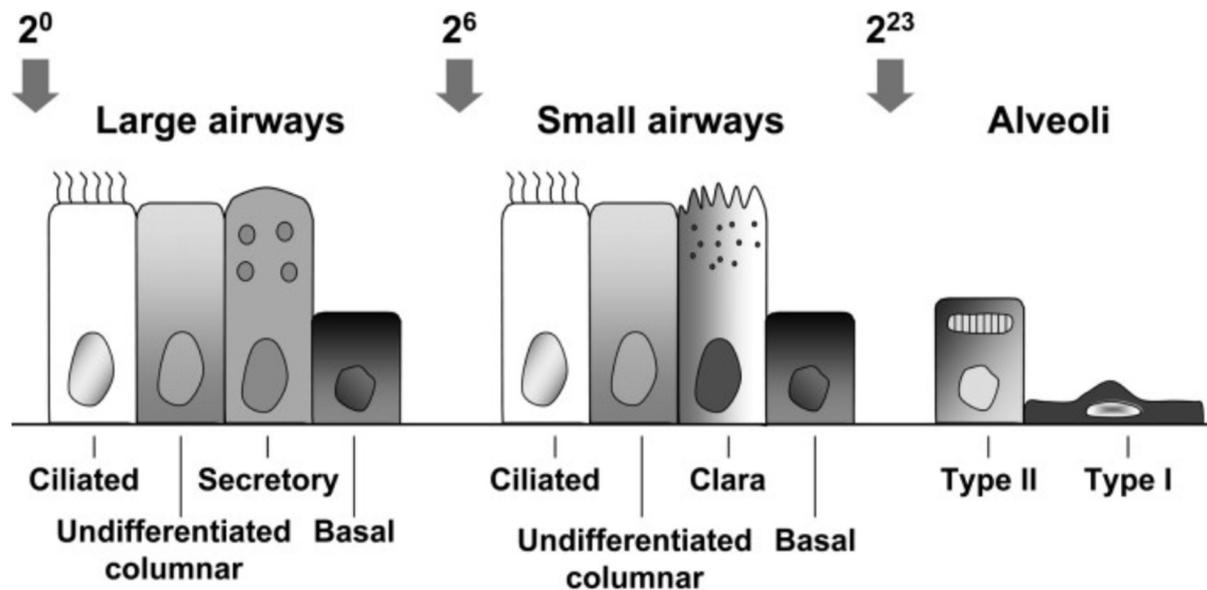
(Proximal airway)



# Cellule delle vie aeree prossimali

L'albero bronchiale umano è coperto da uno strato continuo di cellule epiteliali, le quali hanno un ruolo vitale nel mantenimento del condotto per l'aria e per la difesa contro minacce ambientali.

Nelle vie aeree prossimali riconosciamo 3 principali sottotipi: cellule ciliate, basali e secretorie.

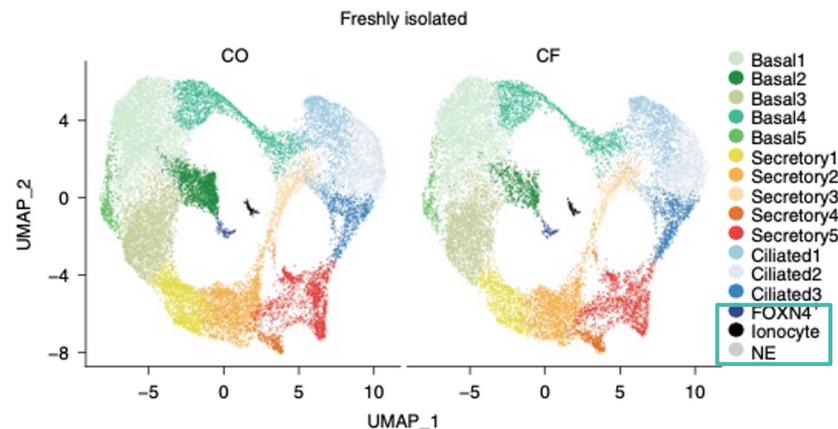
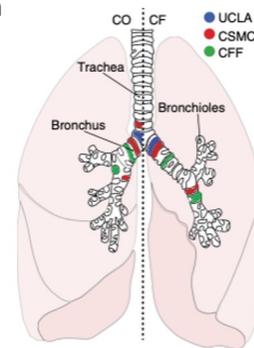


Fonte: Airway Epithelial Cells, PMID: 18757316  
Ronald G. Crystal, Scott H. Randell, John F. Engelhardt, Judith Voynow and Mary E. Sunday

# Atlante *single cell* per hBE

→ Scopo: definire sottopopolazioni cellulari nell'epitelio bronchiale (hBE) costruendo un atlante di riferimento *single cell*

- Isolati da vie aeree prossimali: donatori sani (CO) e pazienti in attesa di trapianto polmonare (CF)
- *Single cell Transcriptome* ripetuto in 3 istituzioni con metodi differenti → *ir riproducibili*
- UMAPs: alto grado di sovrapposizione tra campioni CF-CO
- Identificazione di tutti i tipi cellulari di epitelio delle vie aeree umane

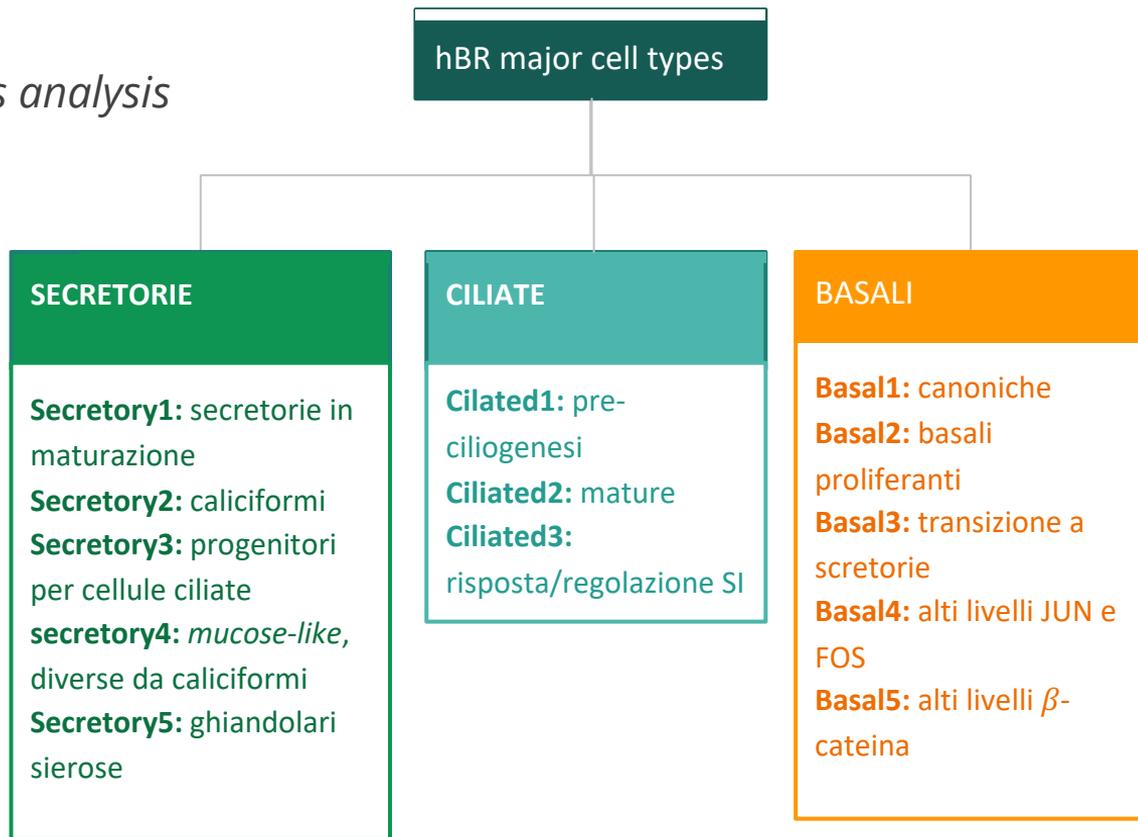


# Identificazione sottopopolazioni

**DEG:** *differentially expressed genes analysis*

→ distinzione *subsets*

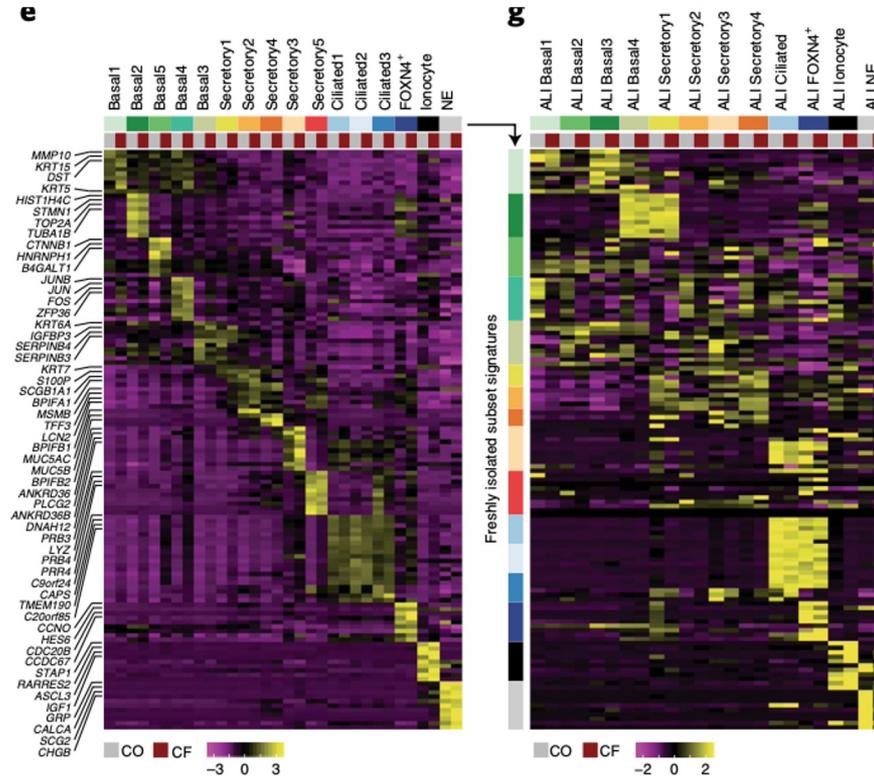
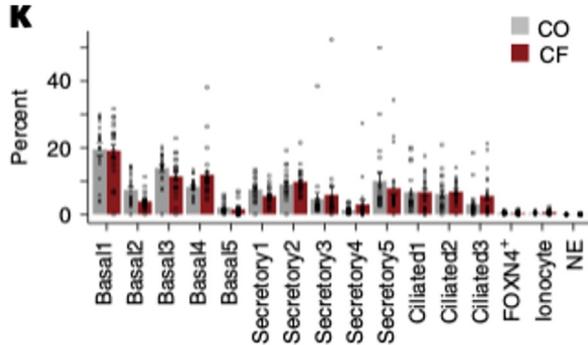
- Proporzioni simili in cellule CF e CO
- Proporzioni simili tra le istituzioni



# Comparazione con ALI

Air liquid interface culture con hBE per 28gg

- Stessi tipi cellulari osservati da isolati per CF e CO
- **Differenze nell'espressione genica**
  - ALI B1, B2, B4 → isolati B1, B2, B3
  - ALI B3: elevato KRT14 → no controparte in isolati
  - ALI S e C mancano di marker riscontrati in isolati
- **Profili di espressione genica**
  - Riduzione 46,8% B2
  - Riduzione 26% S2
  - Aumento 44,6% C3

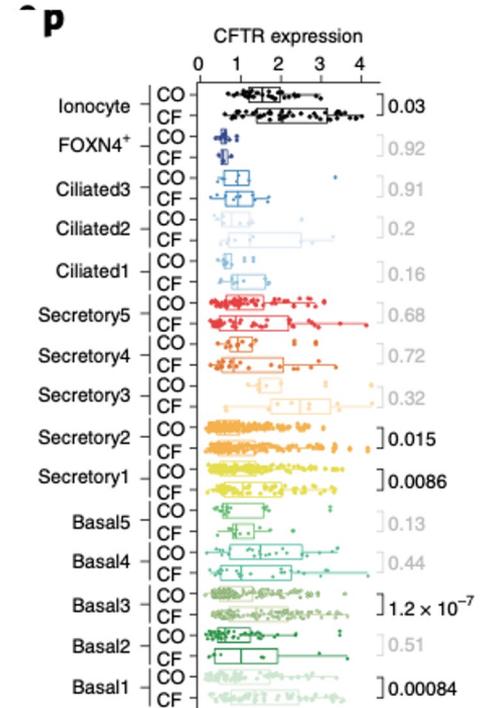
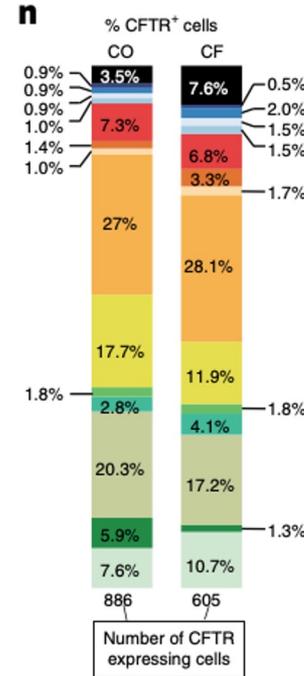
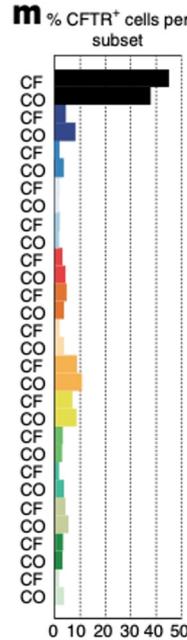


# Espressione CFTR

- Generalmente più espresso in CF che CO
  - **ionociti** (+30%) -MA: cellule rare
  - **secretorie** (S2) e **basali** (B1)

Comparando l'espressione in CF e CO

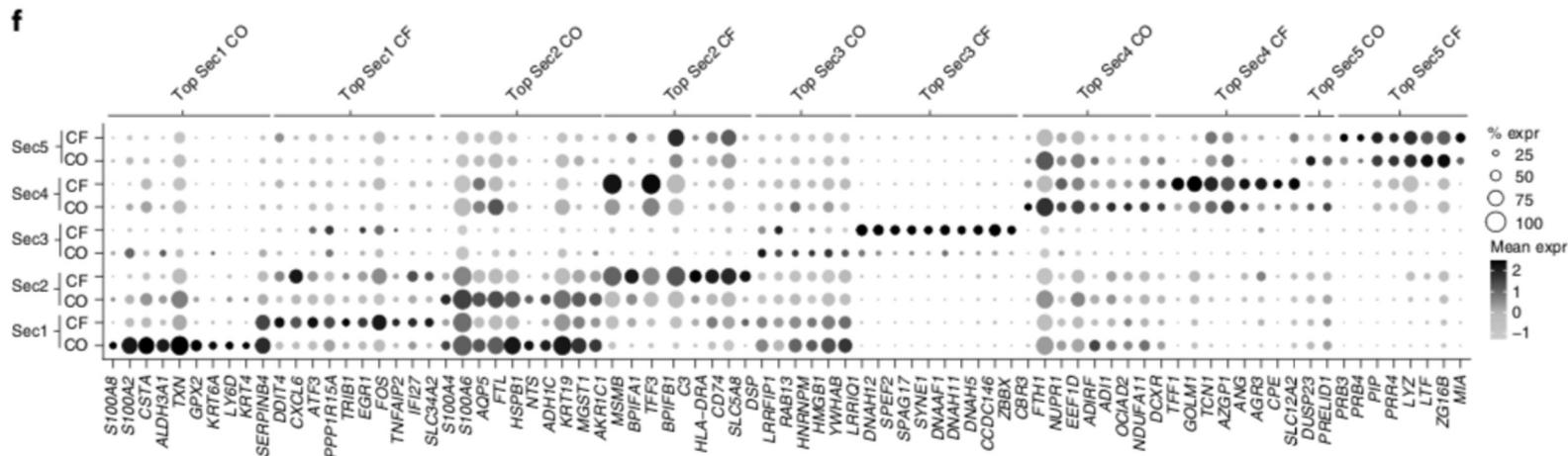
- differenze specifiche secondo tipo cellulare:
- aumento in **CF- ionociti, S1, S2, B1, B3**



→ Ionociti specializzati per espressione CFTR ma espressione significativa da secretorie e basali (target)

# Cellule secretorie mostrano attività antimicrobica

→ Analisi dell'espressione differenziale dei geni tra donatori CO e pazienti CF, per evidenziare eventuali sottopopolazioni gene-specifiche;

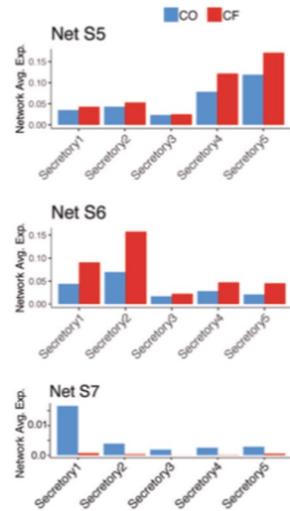
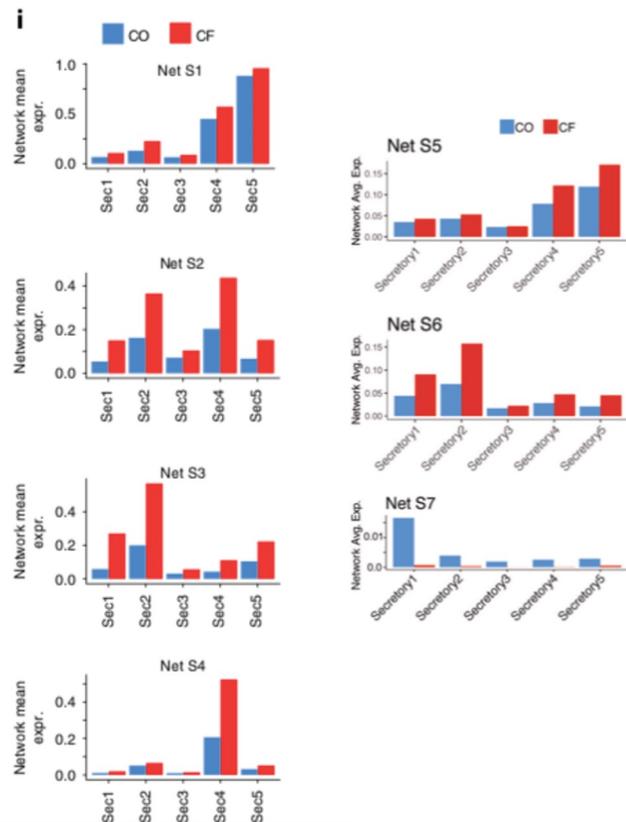
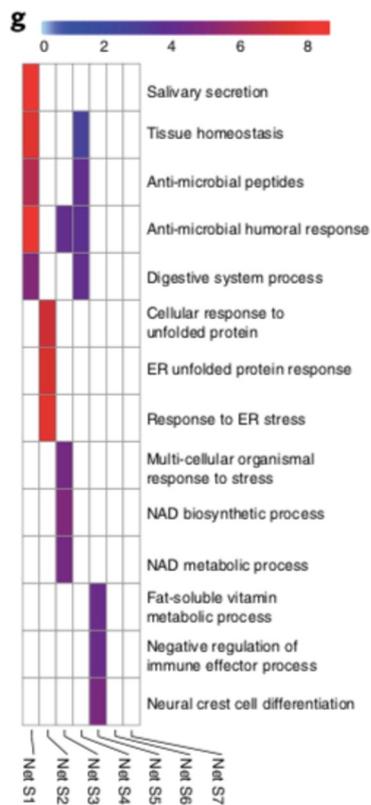


# Analisi dei network nelle diverse sottopopolazioni

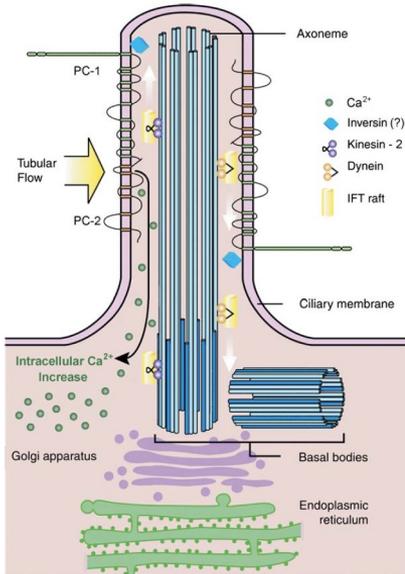
→ Lo studio mostra un totale di 7 network la cui espressione risulta modificata tra CO e CF;

nel complesso, fattori pro-infiammatori e di sviluppo vengono upregolati in CF. In CF osserviamo un'attività molto elevata di secrezione mucosale, risposta umorale, attività antimicrobica e risposta a stress;

→ questo rispecchia un fenotipo associato all'aumento di secrezione dell'epitelio CF.

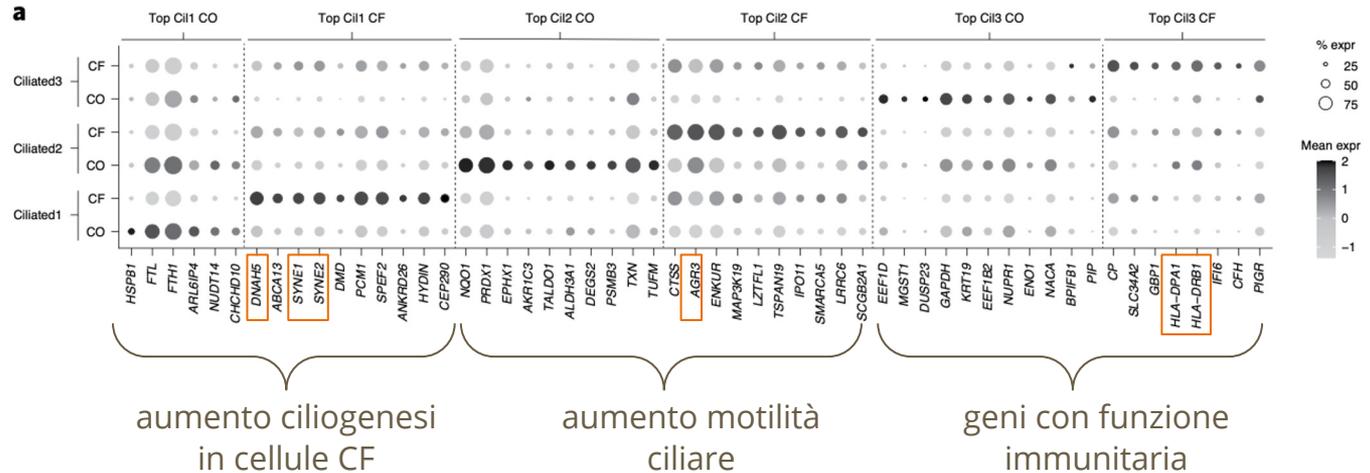


# Ciliogenesi in cellule CF



**Ciliogenesi** → induzione programmi trascrizionali

**DGA:** geni specifici per subset di cellule ciliate CO oppure CF

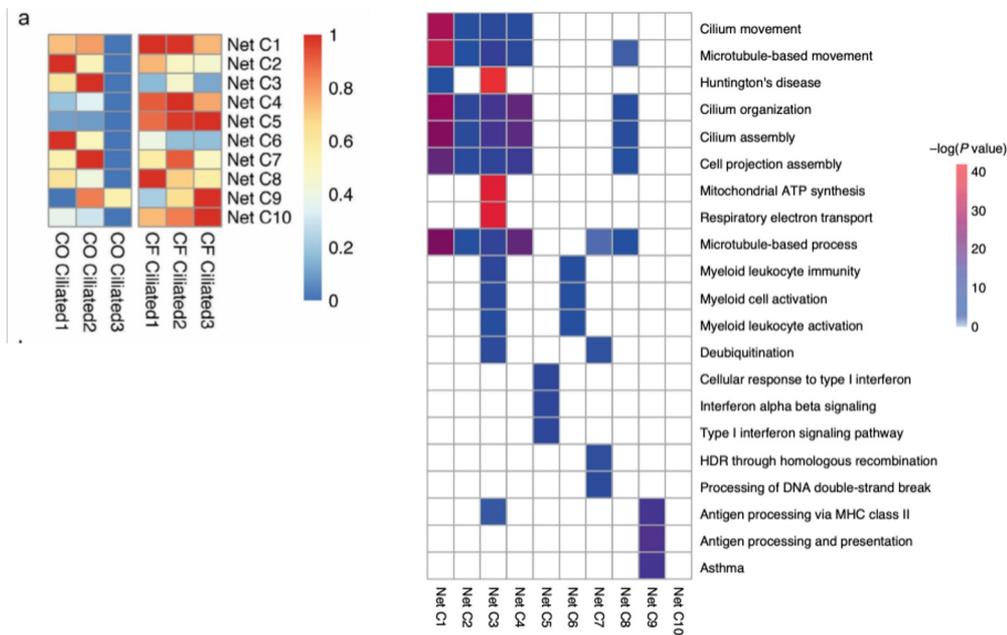


<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.06.009>

# Network di ciliogenesi

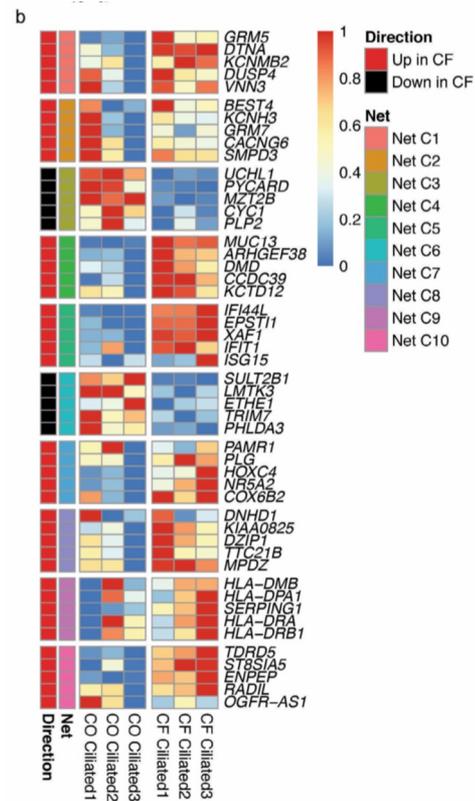
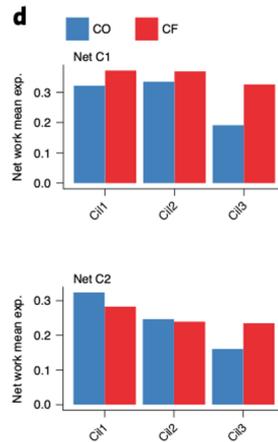
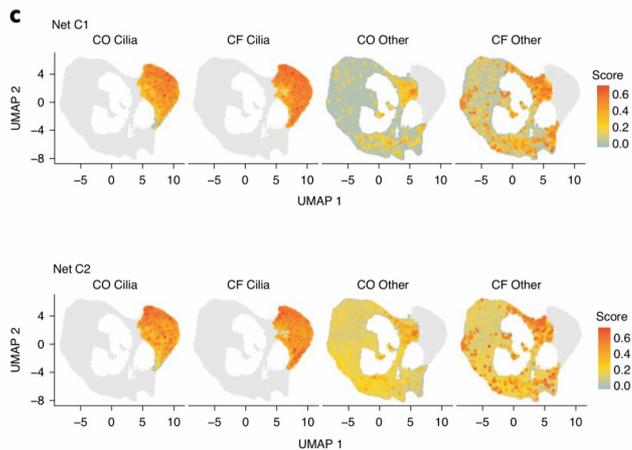
Gene Expression Network Discovery → 10 network con espressione differenziale

- i network contengono geni diversi ma molti sono arricchiti per ciliogenesi e movimento ciliare
- aumento regolatori trascrizionali (**RFX3** e **FOXJ1**)
  - Net C3: trasporto elettroni
  - Net C7: riparazione ciglia
  - Net C5/6/3: funzioni immunitarie
  - Net C9: geni infiammatori
  - Net C10: immuno-ciliari



# Cellule CF non ciliate esprimono geni di network ciliari

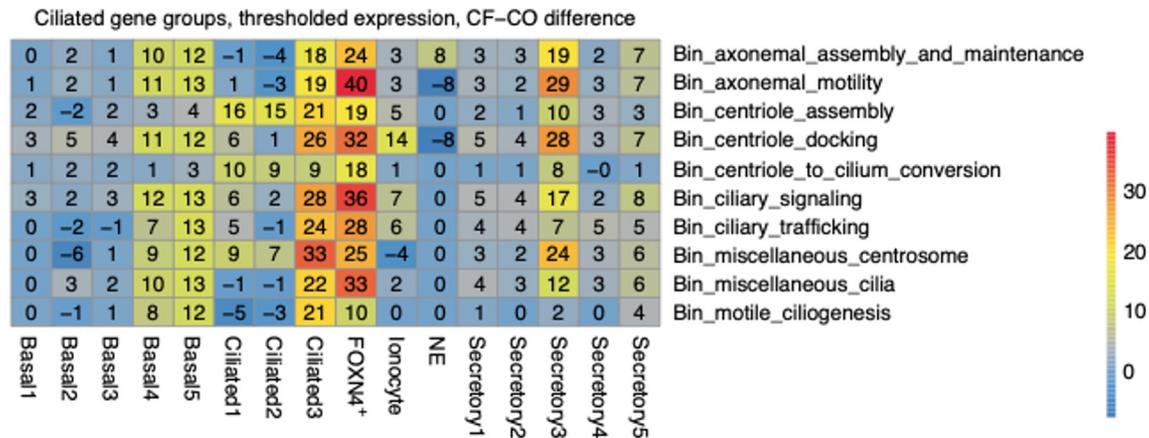
- Ciliated3: aumento di tutti i network
- Net C1-C4, C8 (Microtubuli e ciliogenesi) hanno maggior espressione in non-ciliate CF



# Cellule CF non ciliate esprimono geni di network ciliari

- Lista assemblata manualmente: **491** geni in **10** categorie → differenza in CF-CO
  - **FOXN4+**: elevata espressione geni ciliari (FOXj1+ in transizione)
  - Basal4, Basal5, Secretory3: upregolazione geni ciliari

**e**



→ *Transizione di cellule basali e secretorie a ciliate in CF*

# Ciliogenesi cellule basali

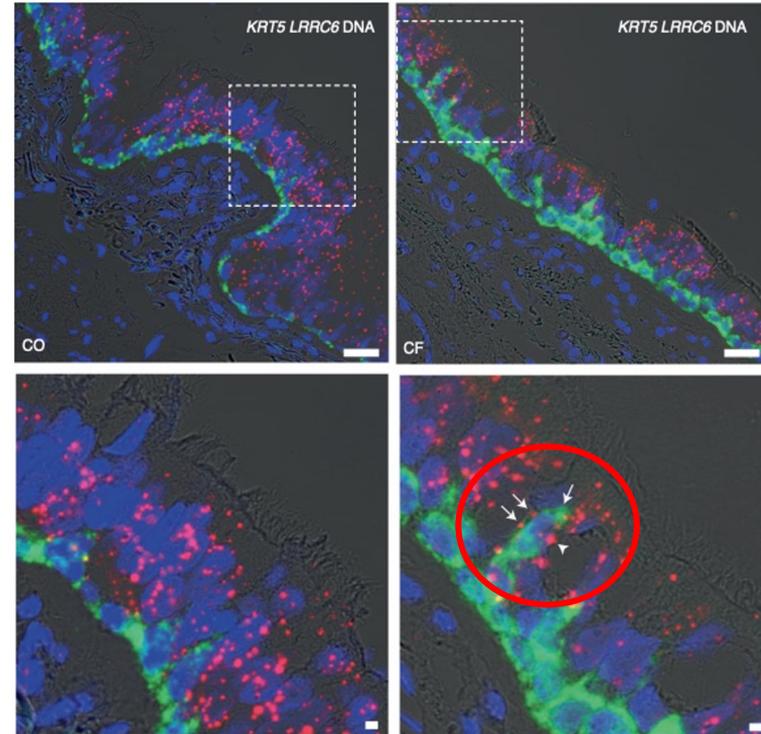
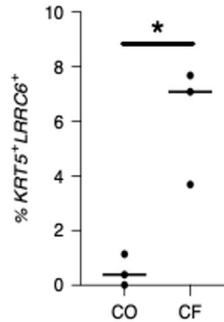
## Ibridazione in situ

- KRT5 -> Marker cellule basali (verde)
- LRRC6 -> Up-regolato nella ciliogenesi (rosso)



Co-localizzazione dei markers in posizione soprabasale -> Abbondante in CF

Transizione diretta da cellule basali a cellule ciliate in CF rispetto CO

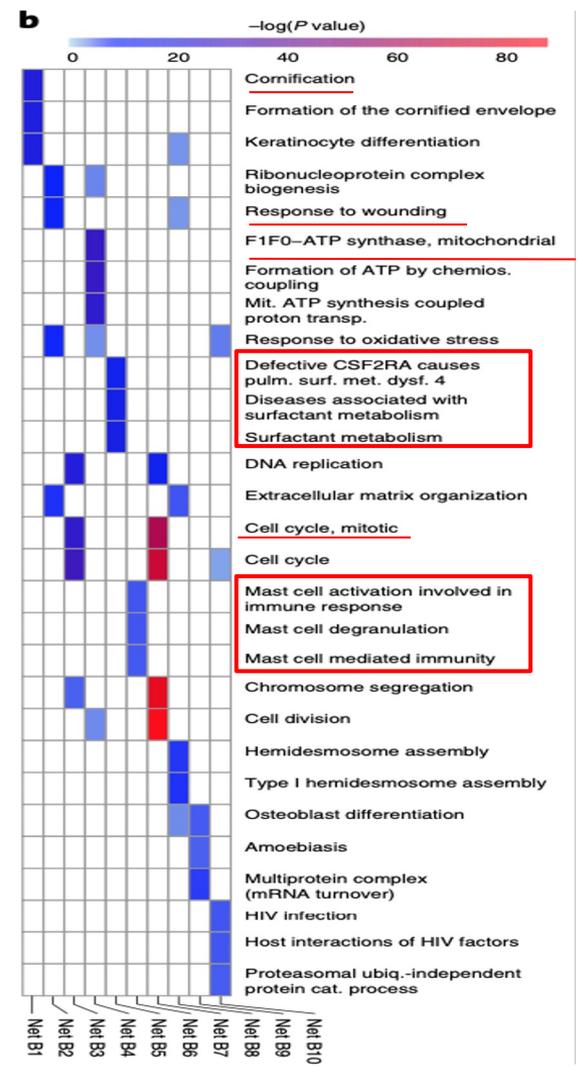
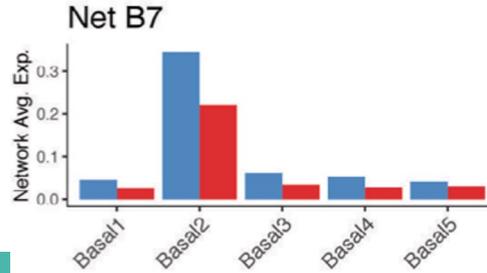
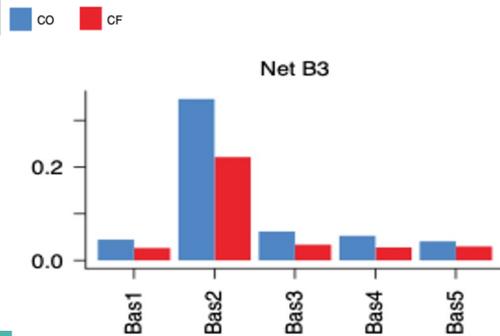




# Gene expression networks (cellule basali)

## Gene correlation grouping approach (10 network d'espressione)

- Net B1-B4 e B7-B10 -> Espressione elevata in CO
  - Net B3/7: replicazione del dna, ciclo cellulare
  - Net B2/10 : risposta a stress ossidativo
  - Net B4: sintesi ATP
- Net B5 e B6 -> Espressione elevata in CF
  - Net B5: metabolismo del surfactante
  - Net B6: attività immunitaria
- Significativa down-regolazione in CF Basal2 dei geni implicati nel ciclo cellulare



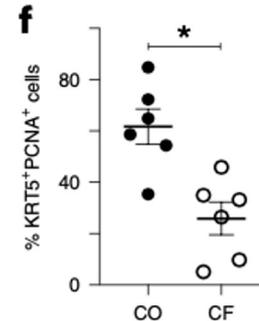
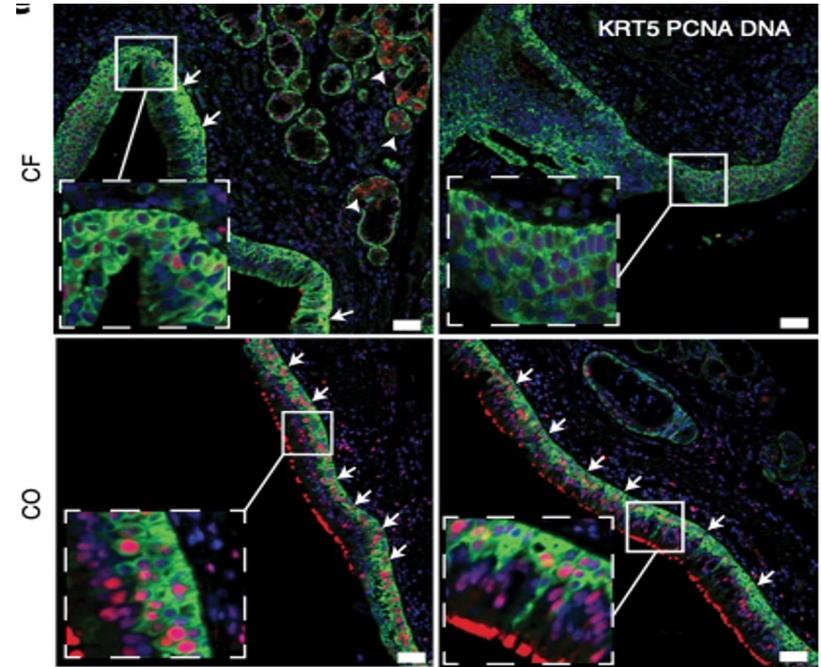
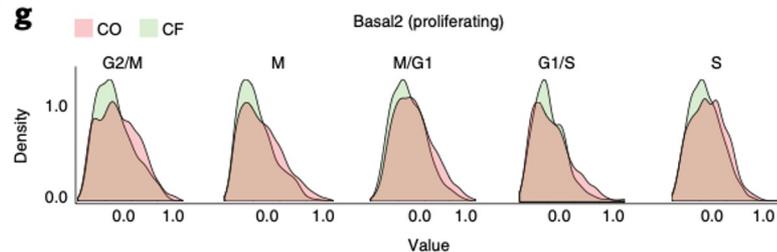
# MITOSI in cellule basali CF vs CO

## Immunofluorescence (IF)

- PCNA -> Marker di proliferazione (rosso)
- KRT5 -> Marker cellule basali (verde)

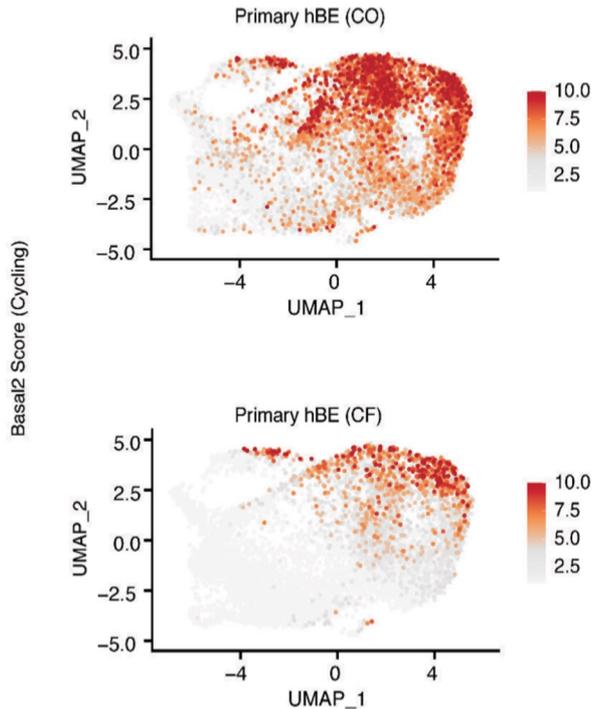


Riduzione significativa delle cellule KRT5+PCNA+ (proliferanti) in CF rispetto a CO e per tutte le fasi del ciclo cellulare in Basal2

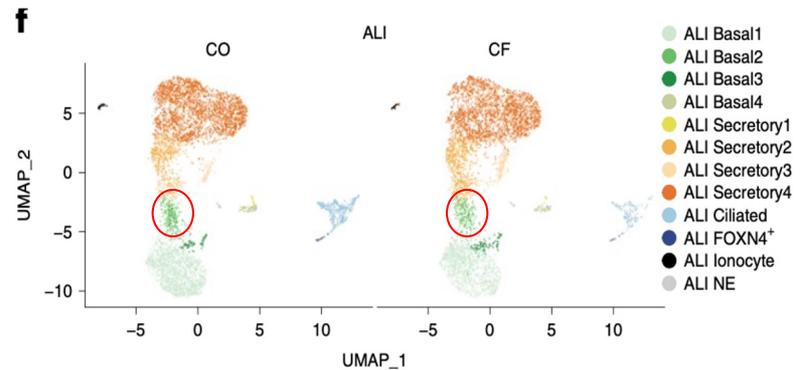


# Isolato hBE vs ALI (divergenze)

- Nell'isolato hBE significativa presenza delle Basal2 in CO rispetto a CF



- In ALI no significativa differenza in Basal2 tra CO e CF

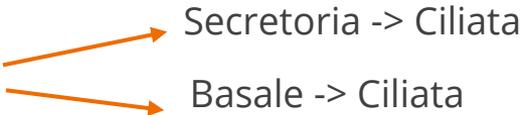


## PRO e CONTRO

- No studio decorso patologico
- Informativo -> proliferazione come effetto dell'ambiente

# DISCUSSIONE

- Atlante di trascrittoma single-cell CF vs CO

- Aumentata ciliogenesi in CF 
  - Secretoria -> Ciliata
  - Basale -> Ciliata
- Stem cell exhaustion in CF per prolungato turnover epiteliale 
  - Infiammazione
  - Danno

} Diminuzione proliferazione e aumentata transizione a cellule ciliate -> Non chiaro

## Criticità

- Incongruenze tra freshly isolated hBEs e colture ALI -> Non è possibile determinare se l'elevata transizione cellulare in CF sia dovuta a:
  - Ciliogenesi disfunzionale
  - Aumentato turnover cellule ciliate
- Impossibilità a distinguere in isolati hBEs CF effetti diretti della mutazione CFTR o quelli derivati dal decorso della malattia



## Prospettive future

- Possibili target molecolari per sviluppo di farmaci
- Ulteriore approfondimento sulla possibilità delle basali e delle secretorie di essere target
- Molecular Roadmap CF vs CO -> Correzione di funzioni complessi (es. trasporto elettroliti)

***GRAZIE PER L'ATTENZIONE***