

Sekwencjonowanie transkryptomu pojedynczych komórek (scRNA-seq) w astmie

Single Cell Transcriptomics (scRNA-seq) in asthma

S U M M A R Y

The development of omics technologies observed in recent years has made it possible to identify many genes associated with the development of allergic diseases. Modern method with great potential is single cell RNA sequencing (scRNA-seq), which enables obtaining the gene expression profile of each analyzed cell. This allows, for example, an identification of new, rare subpopulations of cells and the analysis of regulatory cell networks. This paper summarizes recent discoveries made with scRNA-seq technology in asthma.

Zaobserwowany w ostatnich latach rozwój technologii omicznych pozwolił na identyfikację wielu genów powiązanych z rozwojem chorób alergicznych. Nowoczesną metodą o ogromnych możliwościach jest sekwencjonowanie transkryptomu pojedynczych komórek (scRNA-seq), dzięki któremu można uzyskać profil ekspresji genów każdej analizowanej komórki. Pozwala to m.in. na identyfikację nowych, rzadkich subpopulacji komórek oraz analizę sieci regulatorowych, które zachodzą między komórkami. Niniejsza praca podsumowuje ostatnie odkrycia dokonane dzięki technologii scRNA-seq w astmie.

Narożna B.: Sekwencjonowanie transkryptomu pojedynczych komórek (scRNA-seq) w astmie. *Alergia*, 2023, 2; 29-31

Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) stało się przełomowym odkryciem w dziedzinie nauk biomedycznych, dzięki jednoczesnej analizie sekwencji i ekspresji wielu genów. To za pomocą tej metody możemy analizować całe genomy i transkryptomy pacjentów i osób zdrowych, identyfikując geny powiązane z rozwojem choroby.

Analizy całego transkryptomu (RNA-seq) mają jednak pewne ograniczenia: dotyczą średniego poziomu ekspresji genów wszystkich komórek w danej próbce. Dana tkanka składa się jednak najczęściej z wielu typów komórek, przy czym niektóre z nich mogą być bardzo rzadkie i wysoce wyspecjalizowane. Używając tej metody niemożliwe jest zatem wykrycie profilu ekspresji rzadkich komórek. Heterogenność komórkowa pozostaje więc zamaskowana.

Analizy transkryptomu pojedynczej komórki

Na pomoc przychodzą analizy transkryptomu pojedynczej komórki, tzw. scRNA-seq. Choć metoda ta nie jest zupełnie nowa, bo pierwszy raz zastosowano ją w 2009 roku, to w ostatnich latach rozwój technologicz-

ny i metodologiczny znacząco przyczynił się do jej ulepszenia [1]. ScRNA-seq pozwala na analizę poziomu ekspresji genów w każdej pojedynczej komórce, co umożliwia ocenę ekspresji genów specyficznych dla danej populacji komórek, identyfikację różnych subpopulacji komórek czy analizę sieci regulatorowych, które zachodzą między komórkami.

Metodyka scRNA-seq opiera się na odpowiednim przygotowaniu próbki, wyłapaniu pojedynczych komórek, odwrotnej transkrypcji, amplifikacji cDNA, przygotowaniu biblioteki, sekwencjonowaniu i analizie bioinformatycznej [2]. Najbardziej kluczowym dla tego typu analizy jest więc uzyskanie i oznakowanie pojedynczych komórek. Popularne dawniej techniki to m.in. mikromanipulacja, mikrodysekcja laserowa i cytometria przepływową, jednak charakteryzują się one niewielkim uzyskiem i są czasochłonne. Nowoczesne metody umożliwiają umieszczenie komórki w kropli lipidowej, co pozwala na wyłapanie nawet 65% komórek w danej próbce i jednoczesną analizę 80 tysięcy komórek [3]. Inne popularne metody to wykorzystanie mikropłytki wykonanej z agarozy, która może wyłapać od 5 do 10 tysięcy komó-



Dr n. med.
Beata Narożna

Pracownia Badań Komórkowych i Molekularnych Kliniki Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

Kierownik Pracowni:
Prof. dr hab. n. med.
Aleksandra Szczepankiewicz

Kierownik Kliniki:
Dr hab. n. med.
Irena Wojsyk-Banaszak

Słowa kluczowe:
scRNA-seq, astma, płuca, transkryptomika

Key words:
scRNA-seq, asthma, lungs, transcriptomics

rek (tzw. Microwell-seq) czy SPLiT-seq, czyli znakowanie kodami kreskowymi utrwalonych komórek lub jąder komórkowych [4, 5]. Istotna w scRNA-seq jest również analiza bioinformatyczna, gdyż ogromna ilość uzyskiwanych danych wymaga odpowiedniej kontroli jakości, normalizacji, wizualizacji, grupowania komórek (tzw. klastrowania) i ich odpowiedniej adnotacji.

Dlaczego rozwój technologii scRNA-seq jest kluczowy w badaniach dotyczących chorób alergicznych? Choroby te charakteryzują się dużą heterogennością. Stan zapalny w astmie alergicznej spowodowany jest nadmierną reakcją układu immunologicznego (głównie limfocytów pomocniczych Th2) i zlokalizowany jest w drogach oddechowych, które cechują się złożoną budową; w rozwoju choroby mogą więc brać udział różne typy komórek. Dodatkowo, wyróżniamy różne fenotypy i endotypy chorobowe oraz możemy zaobserwować u pacjentów różną odpowiedź na leczenie.

Odkrycie nowych subpopulacji komórek

Jednym z największych osiągnięć scRNA-seq w pulmonologii jest zsekwencjonowanie ponad 75 tysięcy komórek pochodzących z oskrzeli, oskrzelików i pęcherzyków płucnych oraz z krwi [6]. Badanie to pozwoliło na identyfikację i lokalizację 58 wyspecjalizowanych populacji komórkowych w płucach, z czego 14 z nich zidentyfikowano po raz pierwszy. Populacje te to: 15 populacji komórek nabłonka, 9 populacji komórek śródbłonka, 9 populacji komórek zrębu oraz 25 populacji komórek immunologicznych. Co ciekawe, autorzy porównali wyniki swoich badań z mysim atlasem komórek, wykazując brak u myszy 17 zidentyfikowanych u ludzi populacji. Z kolei 5 subpopulacji komórek immunologicznych występowało tylko u myszy. Oznacza to, iż w procesie ewolucji komórki bardzo się zróżnicowały, zapewne ze względu na inne rozmiary organizmu i jego długość życia. Możliwość porównania ewolucyjnych różnic w subpopulacji komórek i ich ekspresji pomiędzy człowiekiem a myszą pozwoli na lepsze wykorzystanie modelu zwierzęcego w praktyce; w szczególności w kontekście znajomości jego ograniczeń.

Atlas Komórek Płuc Człowieka

Pojedyncze badania scRNA-seq mają jednak pewne wady; ze względu na wykorzystanie określonego protokołu tworzenia biblioteki do sekwencjonowania i ograniczonej liczby próbek nie mogą stanowić uniwersalnego punktu odniesienia.

Właśnie to skłoniło Sikkema i wsp. do połączenia danych z 49 różnych eksperymentów, dzięki czemu uzyskano profil ekspresji z ponad 2 milionów komórek od 486 osób i stworzono Atlas Komórek Płuc Człowieka (HLCA, ang. Human Lung Cell Atlas) [7].

Ponowna analiza bioinformatyczna zebranych danych pozwoliła na wykrycie 61 grup komórek; każda z nich występowała w minimum 4 poprzednich analizach scRNA-seq. Co ciekawe, tylko 41% badanych

populacji komórkowych okazała się prawidłowo zidentyfikowana za pierwszym razem; badacze musieli dokonać drobnych poprawek dla 28% populacji i ponownie wykonać adnotację dla 31% populacji, co pozwoliło na wykrycie lub potwierdzenie istnienia w płucach niedawno odkrytych zupełnie nowych rzadkich typów komórek. Komórki te to m.in. migrujące komórki dendrytyczne (ekspresja CCR7, LAD1, COL19), hematopoetyczne komórki macierzyste (ekspresja SPINK2, STMN, PRSS57, CD34), silnie proliferujące komórki nabłonka (ekspresja KRT6A, KRT13 i KRT14), pneumocyty typu 0 (ekspresja TFPB, SCGB3A2, wysoka ekspresja SFTPC i niska ekspresja SCGB3A1), komórki wydzielnicze oskrzelików końcowych (ekspresja TFPB, SCGB3A2, niska ekspresja SFTPC i wysoka ekspresja SCGB3A1) i subpopulacja komórek mięśni gładkich (ekspresja klasycznych markerów CNN1, MYH11 oraz unikalna ekspresja FAM83D).

Badacze odkryli również, że na specyficzną ekspresję genów w pewnych podtypach komórek ma wpływ płeć, rasa, BMI oraz palenie papierosów: płeć ma związek z różną ekspresją genów w limfatycznych komórkach śródbłonka, BMI ma wpływ na różnice w ekspresji genów limfocytów B i T, z kolei rasa jest związana z różnicami w ekspresji w komórkach przechodzących przemianę z oskrzelikowych komórek maczugowatych na pneumocyty typu 2, a palenie modyfikuje ekspresję w nieswoistych komórkach limfoidalnych i komórkach NK.

Wpływ konkretnych alergenów

Roztocza kurzu domowego (HDM) są jedną z najczęstszych przyczyn alergii wziewnych. Seumois i wsp. chcieli przeanalizować heterogenność w odpowiedzi limfocytów Th CD4+ w odpowiedzi na alergen HDM, aby odnaleźć odpowiedź na dwa pytania: dlaczego nie wszyscy pacjenci rozwijają odpowiedź typu Th2 na alergen oraz dlaczego tylko u części pacjentów chorych na alergię rozwija się astma [8].

Badacze dodali peptydy HDM do komórek krwi obwodowej od pacjentów chorych na astmę ze stwierdzoną alergią na HDM (odpowiedź typu Th2), pacjentów chorych na astmę bez alergii na HDM (brak odpowiedzi typu Th2) oraz osób zdrowych. Następnie wyizolowali subpopulację aktywnych limfocytów T i wykonali zarówno analizę RNA-seq oraz scRNA-seq. Co ciekawe, dopiero scRNA-seq umożliwiła stwierdzenie istotnej heterogenności subpopulacji limfocytów Th i Treg pomiędzy pacjentami, a także identyfikację specyficznego subpopulacji limfocytów Th wykazujących nadekspresję genów INFR (ang. interferon response gene) i TRAIL (ang. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) u osób bez alergii na HDM (ale nadwrażliwych na inne alergeny).

Cząsteczka TRAIL należy do rodziny genu TNF i może blokować szlak sygnałowy receptora limfocytów T (TCR), a także powodować aktywację komórek Th oraz powodować rozwój stanu zapalnego, co sugeruje że obecność subpopulacji limfocytów T aktywowanych

HDM z ekspresją TRAIL może hamować odpowiedź alergiczną typu Th2 w alergii i astmie.

Ponadto, analizując limfocyty Th u pacjentów z alergią i astmą oraz pacjentów tylko z astmą, badacze zidentyfikowali subpopulację komórek Th2 z nadekspresją IL-9 jedynie u pacjentów chorych na astmę. Wcześniejsze prace wykazały istotną rolę IL-9 w alergii pokarmowej na orzeszki ziemne, a także potencjał terapeutyczny w modelu zwierzęcym astmy [9, 10].

Astma ciężka

Analizę transkryptomu pojedynczych komórek krwi obwodowej wykonał także Chen i wsp.; w pracy tej grupą badaną byli pacjenci chorzy na ciężką astmę w porównaniu do osób zdrowych [11]. Największej ekspresji w komórkach osób chorych na astmę ulegała kinaza Janus (JAK1), IL-32 oraz długie niekodujące RNA NEAT1. JAK1 aktywowana jest przez wiele cytokin i czynników wzrostu (m.in. IL-4, IL-9, IL-13, IFN, TSLP), a badania na modelu zwierzęcym wykazują wysoki potencjał terapeutyczny inhibitorów tej kinazy w astmie [12]. Z kolei IL-32 może indukować produkcję m.in., IL-8 i TNF, a NEAT1 powiązany jest z różnicowaniem limfocytów Th2 [13, 14]. Ponadto, u osób chorych na astmę, limfocyty T CD4+ oraz limfocyty B wykazały większą ekspresję CCL5, aktywatora eozynofili, a limfocyty T CD8+ wysoki poziom genu CCL4., związanego z zaostrzeniami astmy [15].

Zaostrzenie astmy

Zaostrzenie astmy charakteryzuje się nadmiernym stanem zapalnym, nadprodukcją śluzu w drogach oddechowych oraz nadreaktywnością oskrzeli, najczęściej spowodowaną kontaktem z alergenem, infekcją oddechową, zanieczyszczeniami powietrza lub dymem tytoniowym. Ponadto, leki stosowane w rutynowej terapii astmy mają umiarkowany efekt terapeutyczny w przypadku zaostrzenia. Tradycyjne analizy transkryptomiczne nie pozwoliły na identyfikację indywidualnych komórek układu odpornościowego, które mogą być odpowiedzialne za taki stan rzeczy. Z kolei analiza scRNA-seq

populczyn pęcherzykowo-oskrzelowych od pacjentów z zaostrzoną astmą oraz osób zdrowych wykazała wyższy poziom monocytów, limfocytów T CD8+ oraz makrofagów u tych pierwszych, co potwierdza wcześniejsze doniesienia o istotnej roli tych komórek w rozwoju zaostrzenia.

Analiza profilu ekspresji cytokin w zidentyfikowanych komórkach wykazała, iż neutrofile, makrofagi i monocyty mają podwyższoną ekspresję IL-1β i IL-18; obie te interleukiny wykazują wpływ na rozwój zaostrzenia [16, 17]. Z kolei IL-27, cytokina powiązana z odpowiedzią Th1 i infekcjami wirusowymi, ulegała wysokiej ekspresji głównie w makrofagach i monocytach [18].

Ponadto, większość komórek wykazywała także nadekspresję IFN-γ, co tłumaczy dlaczego leczenie zaostrzeń astmy jest utrudnione; wcześniejsze badania wykazują bowiem synergiczne działanie IL-27 i IFN-γ w indukcji szlaków stanu zapalnego odpornych na leczenie sterydami [19].

Podsumowanie

Badania scRNA-seq pozwoliły na odkrycie dotąd nie znanych populacji komórkowych w płucach i krwi obwodowej, a także identyfikację genów markerowych różnych typów komórek oraz porównanie danych z modelów zwierzęcych i modeli in vitro zarówno u osób zdrowych, jak i konkretnych jednostkach chorobowych. Ich głównymi ograniczeniami jest niewielka ilość próbek czy specyfika grupy badanej, która może istotnie wpływać na profil ekspresji genów. Jednym z największych osiągnięć tego roku jest powstanie Atlasu Komórek Płuc Człowieka, który opisuje aż 61 różnych subpopulacji komórkowych, które można zlokalizować w płucach u osób o różnym wieku i rasie. Z kolei dane z badań scRNA-seq w astmie wskazują istotną rolę pojedynczych typów komórek w rozwoju choroby. Identyfikacja rzadszych subpopulacji komórek oraz określenie ich interakcji z innymi komórkami może się przyczynić do wyjaśnienia heterogenności choroby i powstania nowych terapii.

**Prace nadesłano
12.07.2023
Zaakceptowano do
druku 25.07.2023**

Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Wu X, Yang B, Udo-Inyang I, Ji S, Ozog D, Zhou L, et al. Research Techniques Made Simple: Single-Cell RNA Sequencing and Its Applications in Dermatology. *J Invest Dermatol.* 2018;138(5):1004-9. 2. Xia D, Wang Y, Xiao Y, Li W. Applications of single-cell RNA sequencing in atopic dermatitis and psoriasis. *Front Immunol.* 2022;13:1038744. 3. Vallhrach L, Androvic P, Kubista M. Platforms for Single-Cell Collection and Analysis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3). 4. Han X, Wang R, Zhou Y, Fei L, Sun H, Lai S, et al. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell.* 2018;172(5):1091-107 e17. 5. Rosenberg AB, Roco CM, Muscat RA, Kuchina A, Sample P, Yao Z, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding. *Science.* 2018;360(6385):176-82. 6. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature.* 2020;587(7835):619-25. 7. Sikkema L, Ramirez-Suastegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madisson E, et al. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med.* 2023;29(6):1563-77. 8. Seumois G, Ramirez-Suastegui C, Schmiedel BJ, Liang S, Peters B, Sette A, et al. Single-cell transcriptomic analysis of allergen-specific T cells in allergy and asthma. *Sci Immunol.* 2020;5(48). 9. Brough HA, Cousins DJ, Munteanu A, Wong YF, Sudra A, Makinson K, et al. IL-9 is a key component of memory TH cell peanut-specific responses from children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(6):1329-38 e10. 10. Gong F, Pan YH, Huang X, Zhu HY, Jiang DL. From bench to bedside: Therapeutic potential of interleukin-9 in the treatment of asthma. *Exp Ther Med.* 2017;13(2):389-94. 11. Chen A, Diaz-Soto MP, Sanmamed MF, Adams T, Schupp JC, Gupta A, et al. Single-cell characterization of a model of poly I:C-stimulated peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Respir Res.* 2021;22(1):122. 12. Georas SN, Donohue P, Connolly M, Wechsler ME. JAK inhibitors for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(4):953-63. 13. Xin T, Chen M, Duan L, Xu Y, Gao P. Interleukin-32: its role in asthma and potential as a therapeutic agent. *Respir Res.* 2018;19(1):124. 14. Huang S, Dong D, Zhang Y, Chen Z, Geng J, Zhao Y. NEAT1 regulates Th2 cell development by targeting STAT6 for degradation. *Cell Cycle.* 2019;18(3):312-9. 15. Wang YH, Voo KS, Liu B, Chen CY, Uygungil B, Spoede W, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med.* 2010;207(11):2479-91. 16. Hayashi N, Yoshimoto T, Izuhara K, Matsui K, Tanaka T, Nakanishi K. T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN-gamma and IL-13 production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(37):14765-70. 17. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(4):851-8. 18. Xiong P, Liu T, Huang H, Yuan Y, Zhang W, Fu L, et al. IL-27 overexpression alleviates inflammatory response in allergic asthma by inhibiting Th9 differentiation and regulating Th1/Th2 balance. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2022;44(5):712-8. 19. Nguyen TH, Maltby S, Tay HL, Eyers F, Foster PS, Yang M. Identification of IFN-gamma and IL-27 as Critical Regulators of Respiratory Syncytial Virus-Induced Exacerbation of Allergic Airways Disease in a Mouse Model. *J Immunol.* 2018;200(1):237-47.