



Факультет биологии и биотехнологии

ОП бакалавриата «Клеточная и
молекулярная биотехнология»

Москва
5 июня 2025 г.

**ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ОПУХОЛЕВЫХ ОРГАНОИДОВ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
*IN VITRO***

Кулагин Тимур Артурович



АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рак предстательной железы (РПЖ) — второй по распространенности среди мужского населения в мире

В России (2023 г.):

- 58 тыс. заболеваний
- 13 тыс. летальных исходов

В мире (2022 г.):

- 1.4 млн. заболевших
- 375 тыс. умерших

Источники:

Bray F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229–263.

Структура заболеваемости раком среди мужчин в России

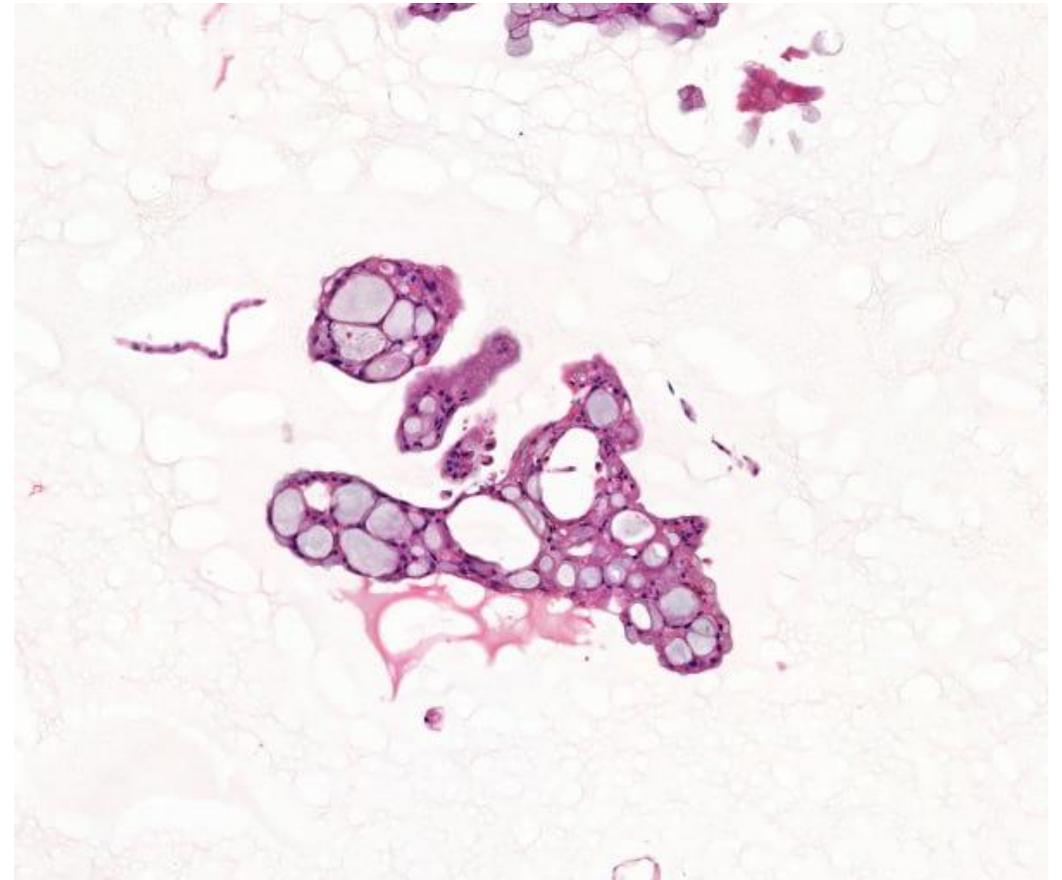


Каприн А.Д. и др. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 276 с.



АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Традиционные 2D клеточные линии РПЖ не воспроизводят пространственную организацию и молекулярную гетерогенность опухоли
- В базе CCLE представлено лишь 15 линий РПЖ, что ограничивает репрезентативность клинических исследований
- 3D органоиды являются перспективной моделью, однако успешность их получения и культивирования остаётся низкой
- Существующие протоколы культивирования органоидов недостаточно учитывают молекулярные особенности опухолевого микроокружения



Источники:

Ghandi M. et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia // Nature. 2019;569:503–508.



ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявление молекулярных механизмов и факторов, влияющих на эффективность культивирования опухолевых клеток предстательной железы *in vitro*, на основе транскриптомного анализа

ЗАДАЧИ РАБОТЫ

- 1.Собрать набор транскриптомных данных из открытых источников, содержащий результаты секвенирования единичных клеток нормальной и опухолевой ткани предстательной железы, а также аналогичные данные по толстой кишке в качестве референса
- 2.Изучить возможности применения данных секвенирования единичных клеток для идентификации сигнальных каскадов, необходимых для самоподдержания стволовых клеток, и, как следствие, для воссоздания условий при культивировании органоидов на примере данных толстой кишки

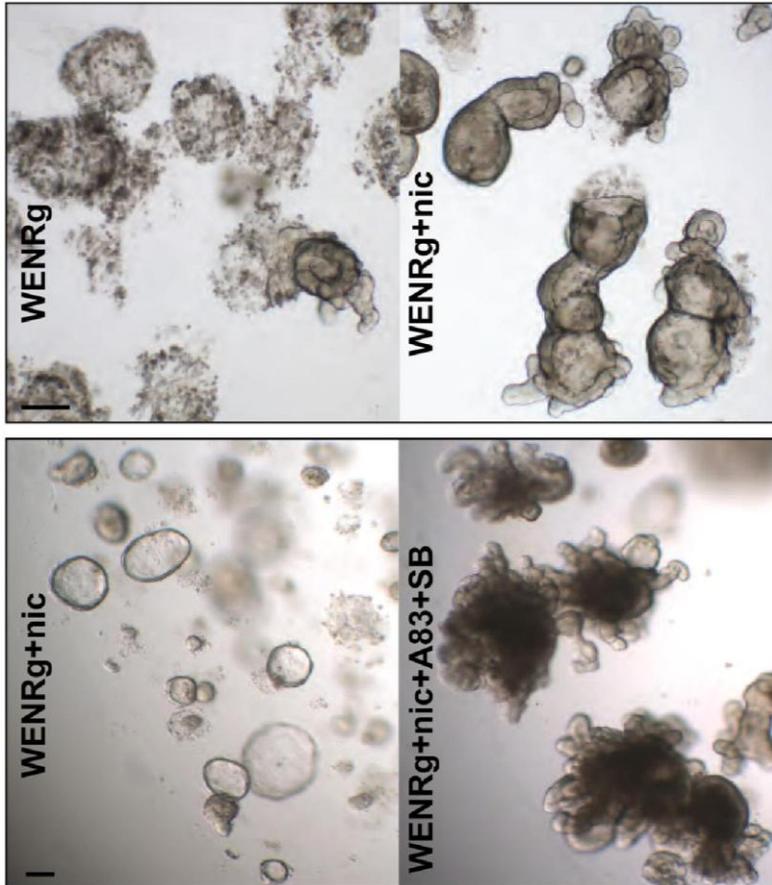


ЗАДАЧИ РАБОТЫ

3. Изучить клеточный состав и межклеточные взаимодействия как здоровой, так и опухолевой ткани предстательной железы на основе открытых данных секвенирования единичных клеток
4. Провести сравнительный транскриптомный анализ опухолевых органоидов предстательной железы на различных пассажах
5. Разработать рекомендации по оптимизации среды культивирования органоидов на основании выявленных молекулярных факторов, влияющих на рост и выживаемость клеток предстательной железы

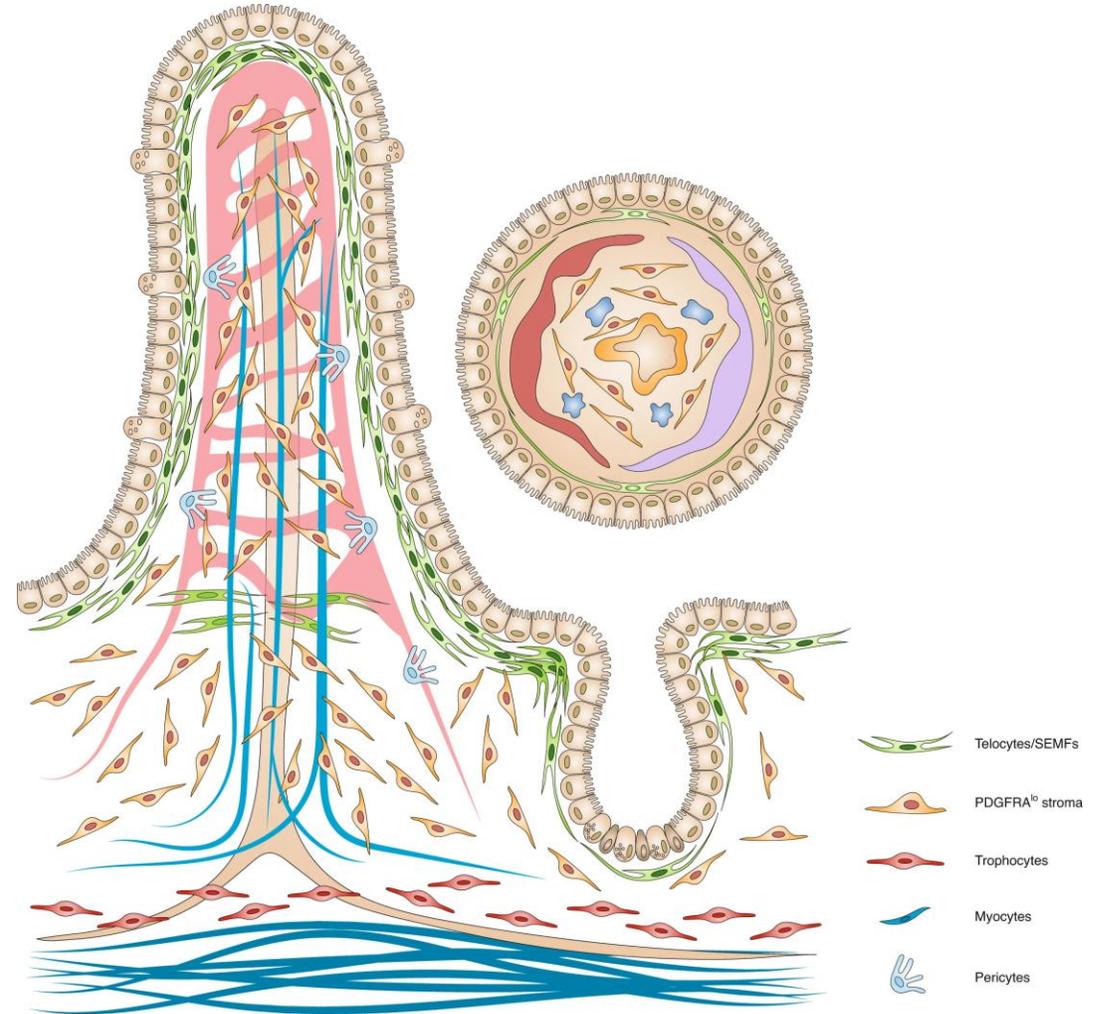


ОРГАНОИДЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ



Источники:

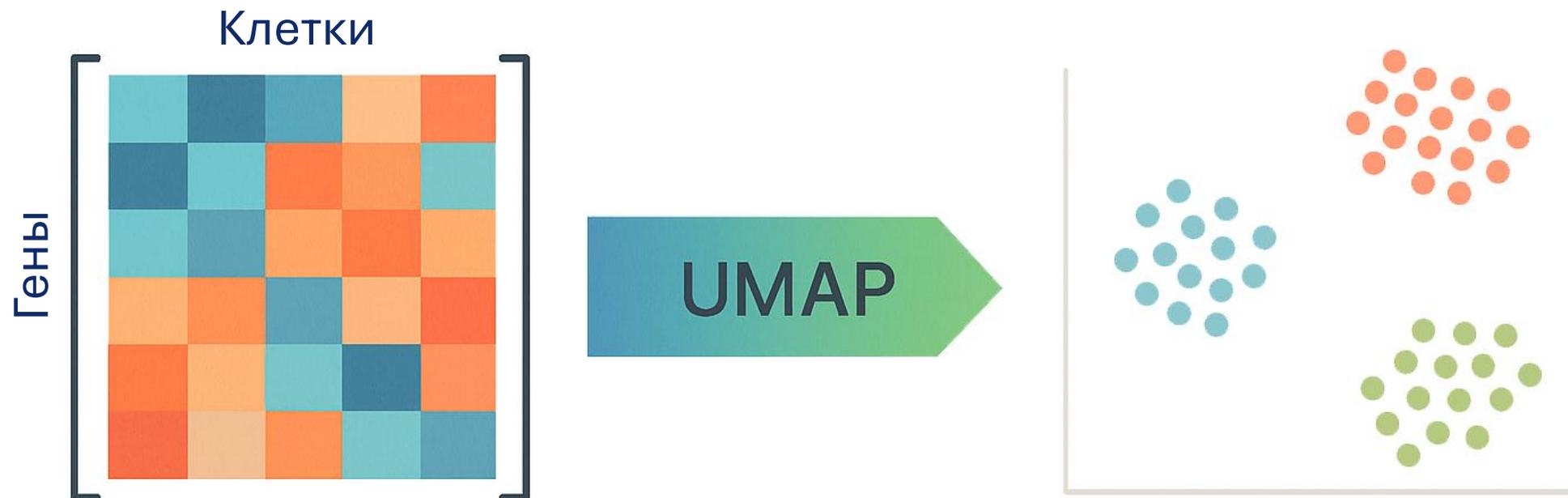
Sato T. et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium // *Gastroenterology*. 2011;141(5):1762–1772.



McCarthy N. et al. Cellular and molecular architecture of the intestinal stem cell niche // *Nat. Cell Biol.* 2020;22(9):1033–1041.

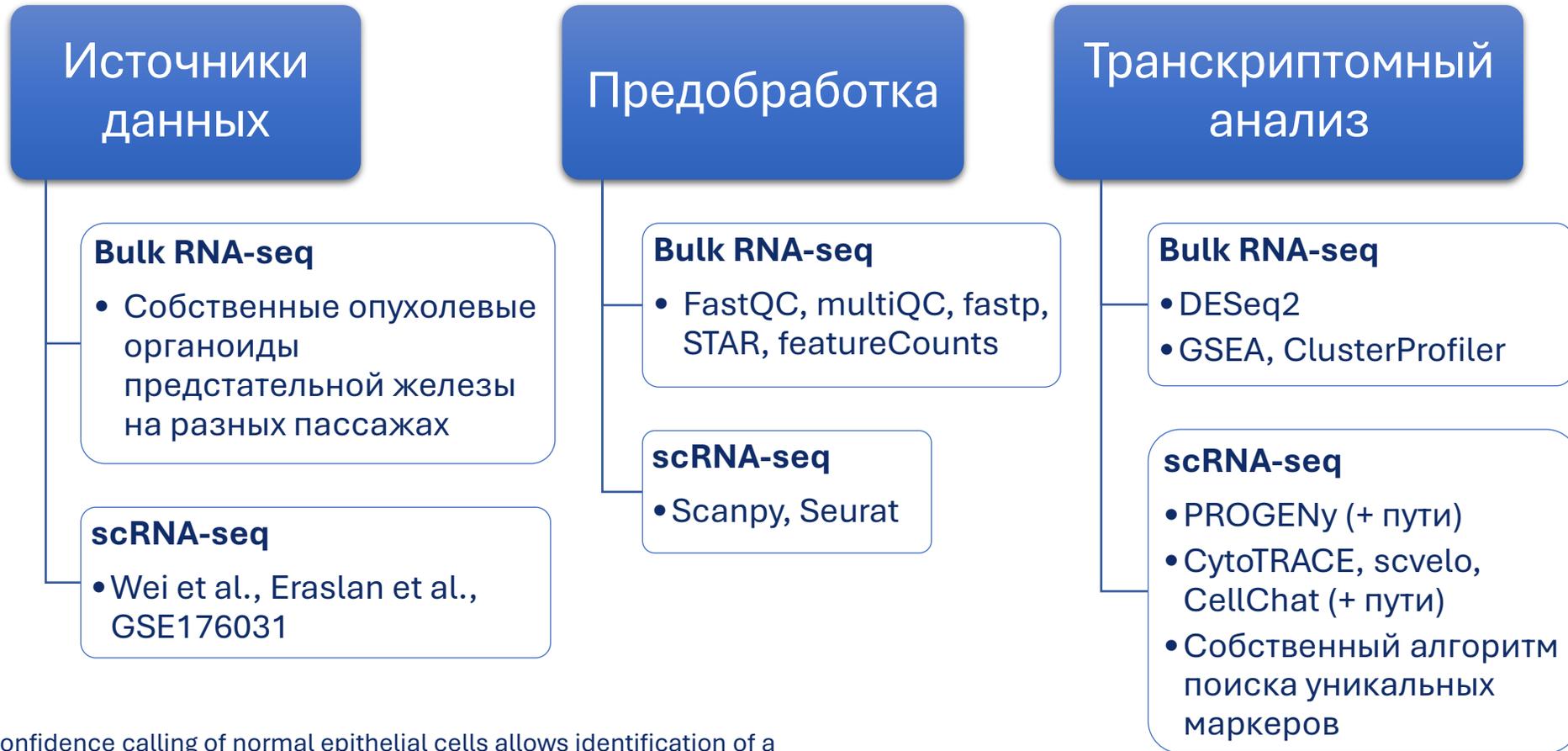


UMAP-ПРОЕКЦИЯ КЛЕТОК





МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ



Источники:

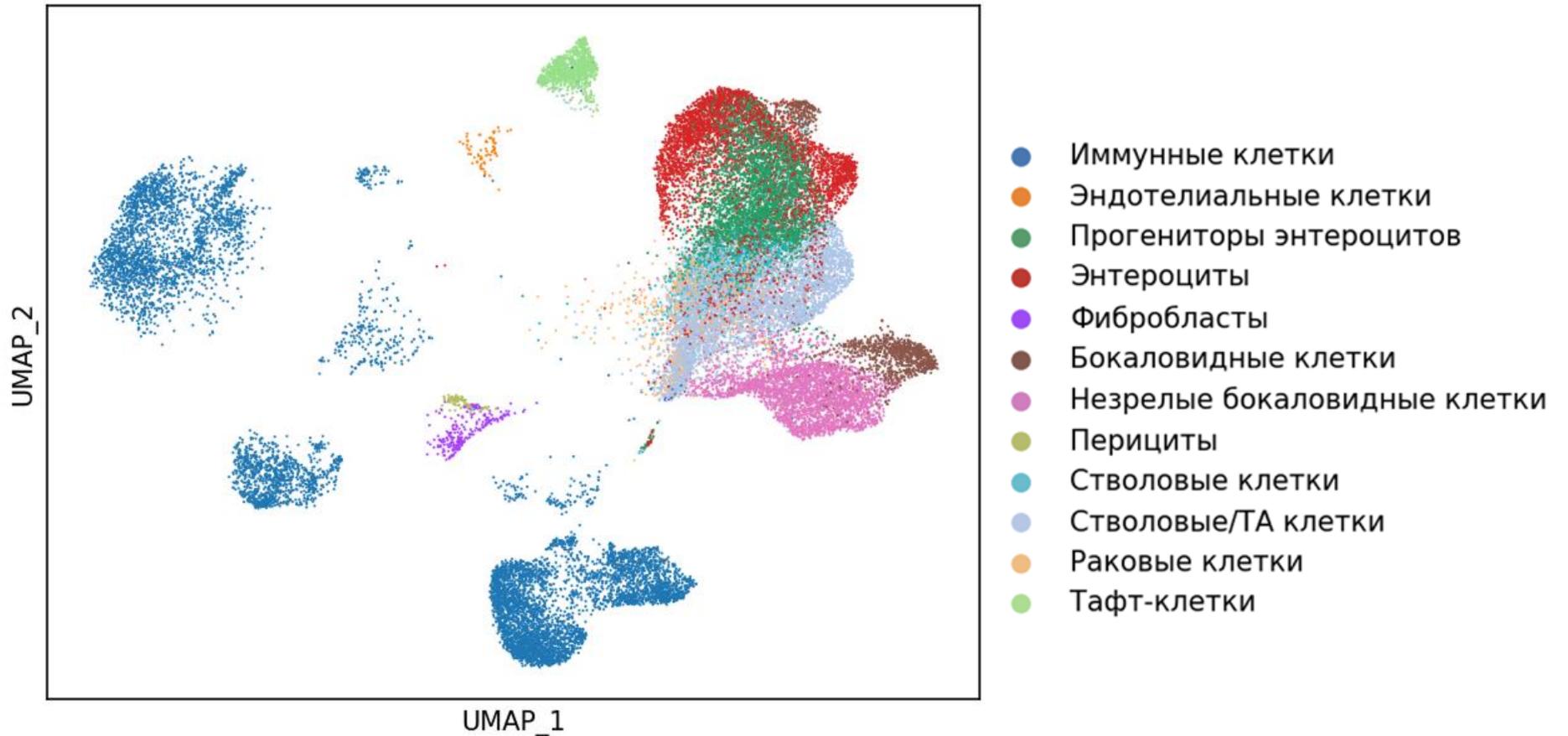
Wei T. et al. High-confidence calling of normal epithelial cells allows identification of a novel stem-like cell state in colorectal cancer // *Int. J. Cancer*. 2024;155(9):1655–1669.

Song H. et al. Single-cell analysis reveals heterogeneity of tumor-associated epithelial cell states in prostate cancer // *Nat. Commun.* 2022;13(1):141.

Eraslan G. et al. Single-nucleus cross-tissue molecular reference maps toward understanding disease gene function // *Science*. 2022;376(6594):eabl4290.

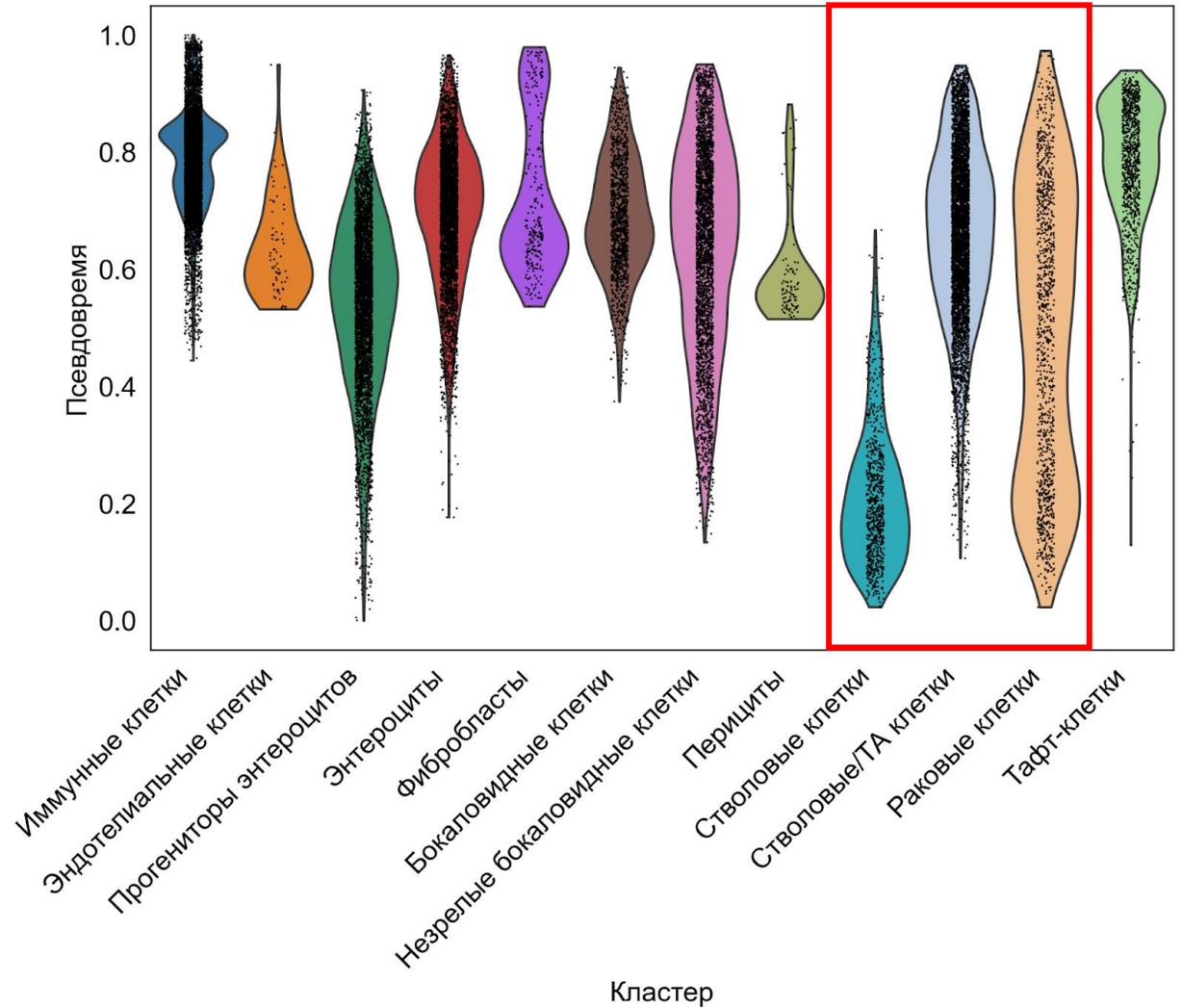
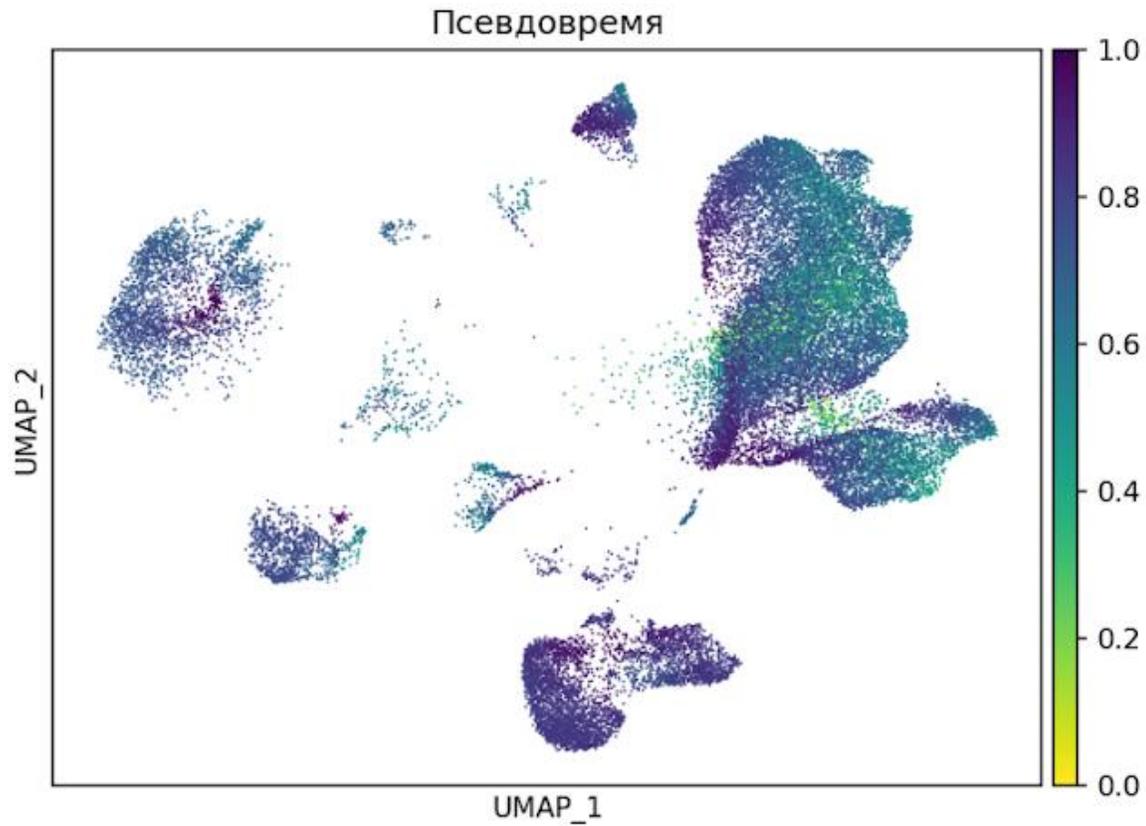


ВАЛИДАЦИЯ ПОДХОДА НА ЭПИТЕЛИИ ТОЛСТОЙ КИШКИ



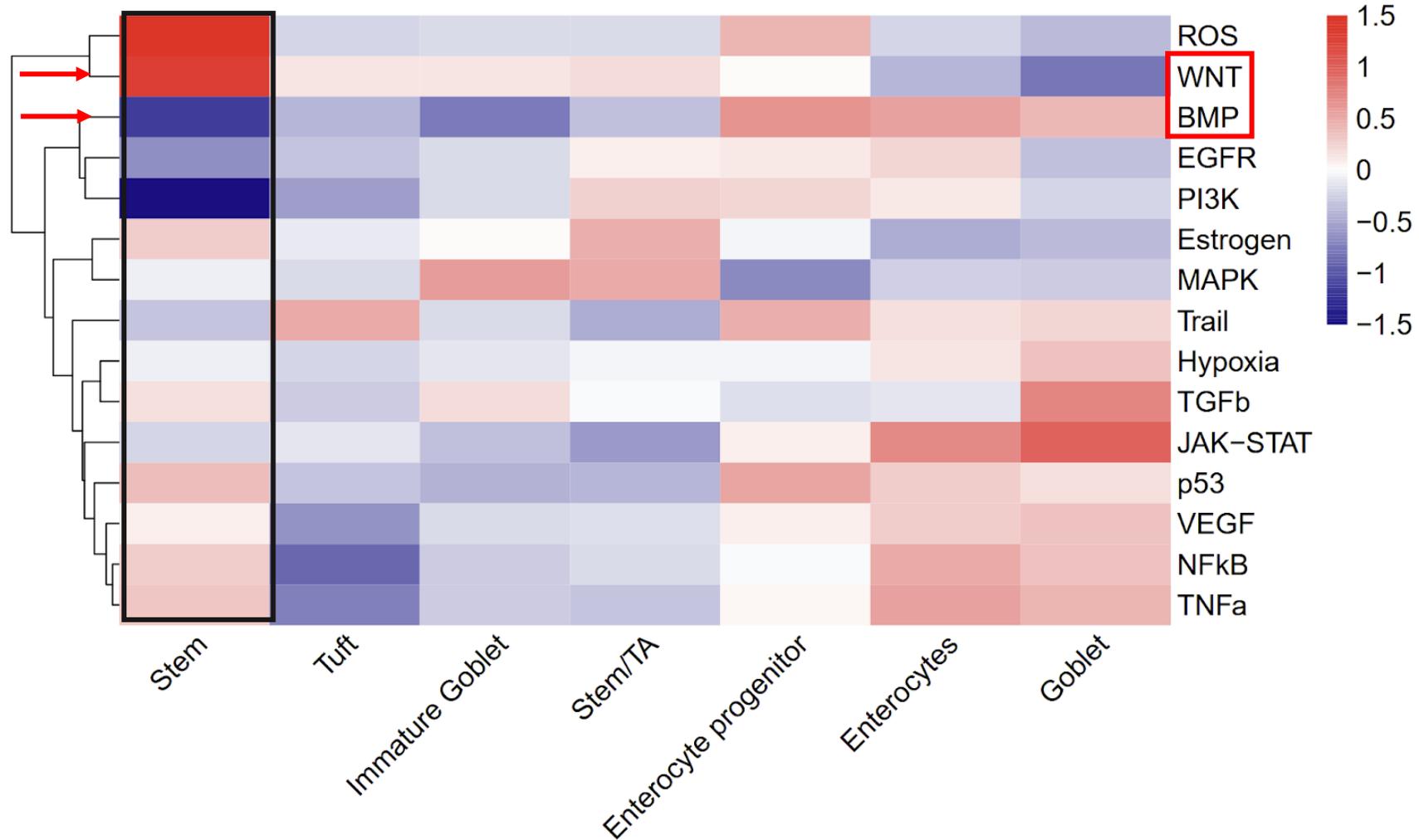


ТОЛСТАЯ КИШКА: ПСЕВДОВРЕМЯ





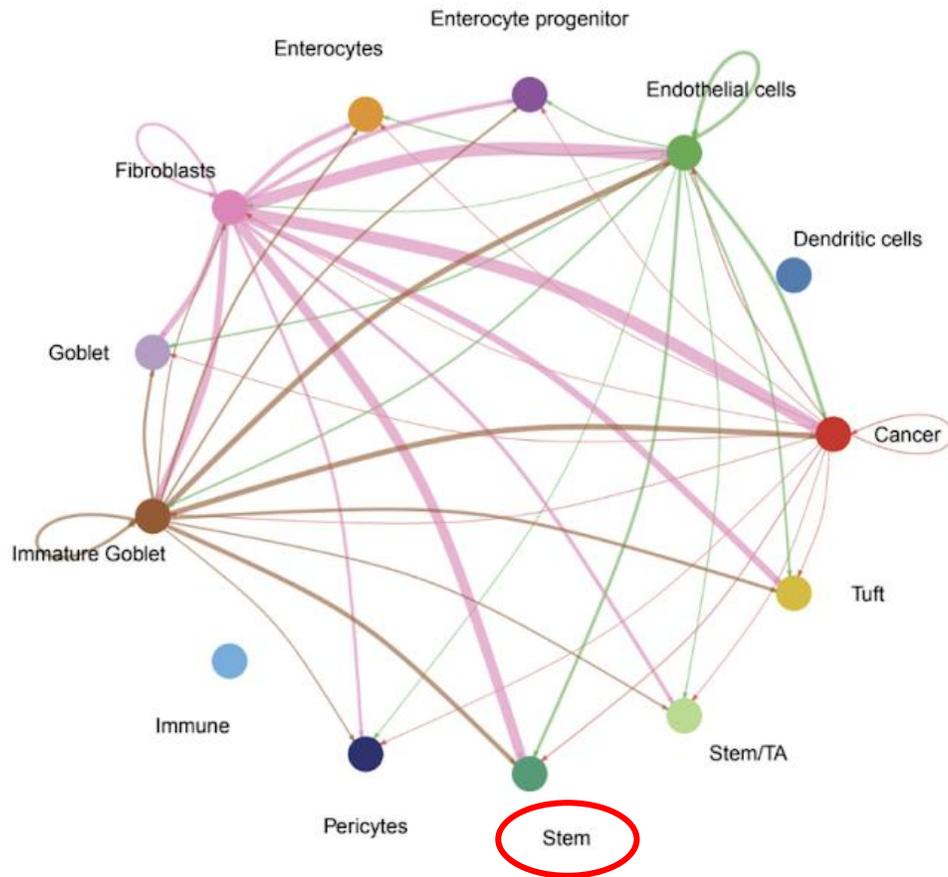
ТОЛСТАЯ КИШКА: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ



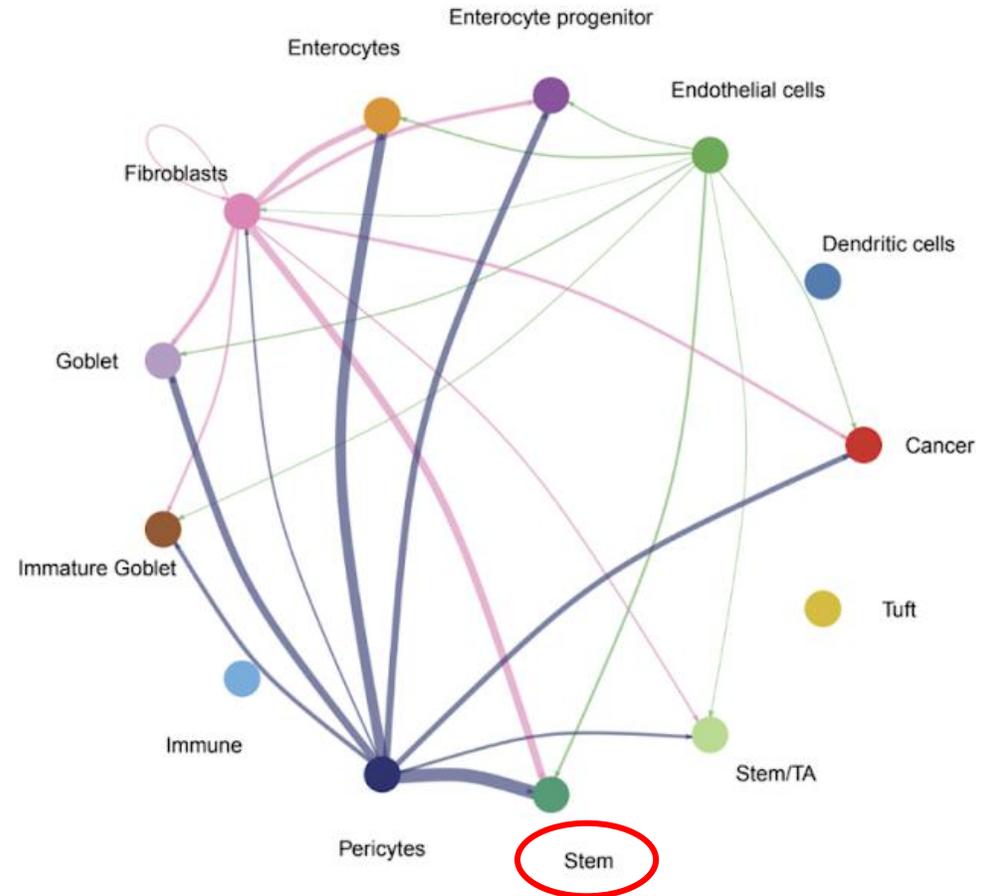


ТОЛСТАЯ КИШКА: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ

WNT

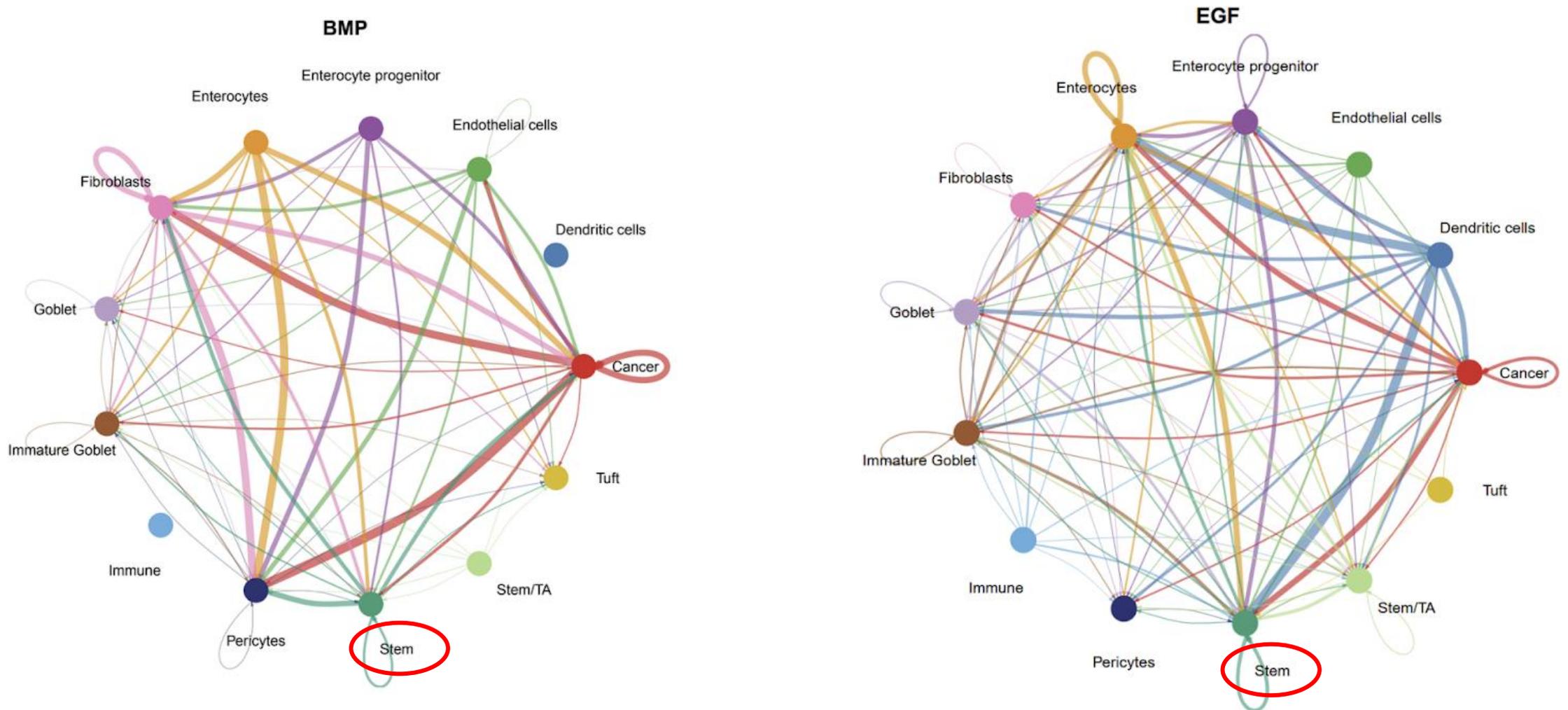


RSPO Coactivation



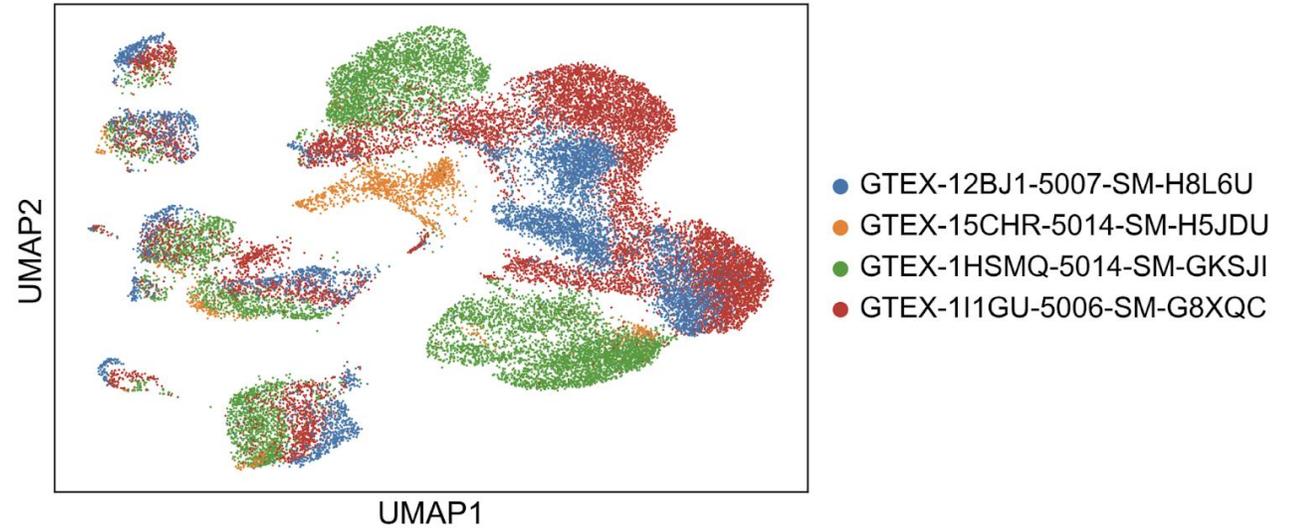
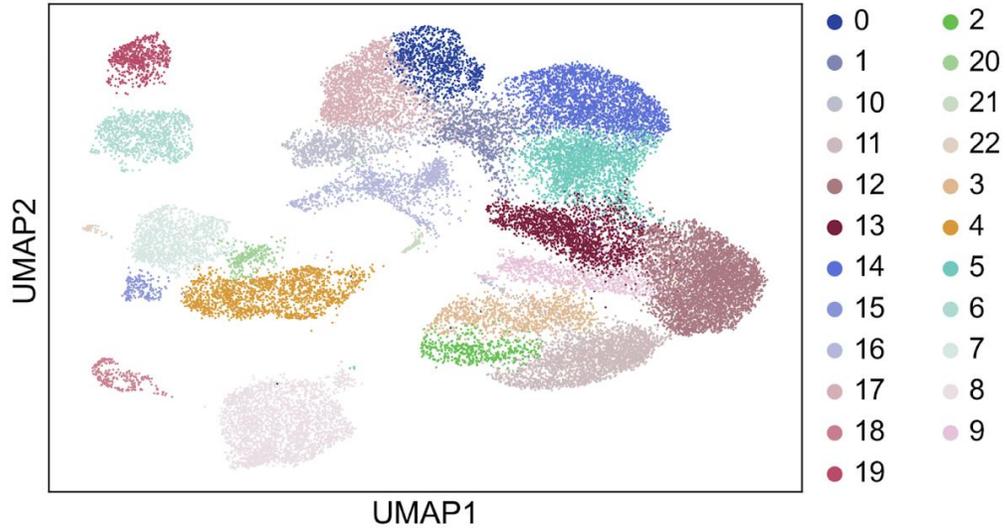


ТОЛСТАЯ КИШКА: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ



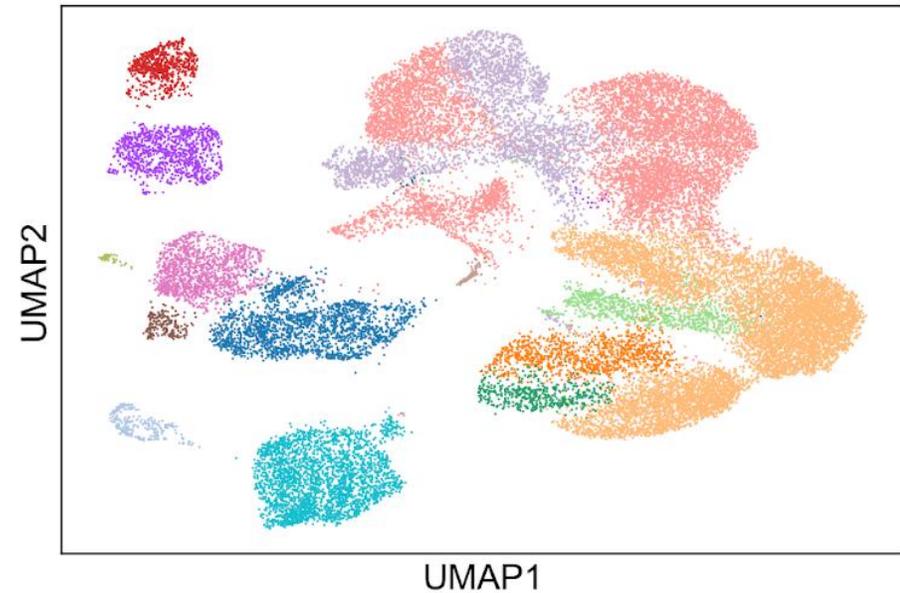


ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА



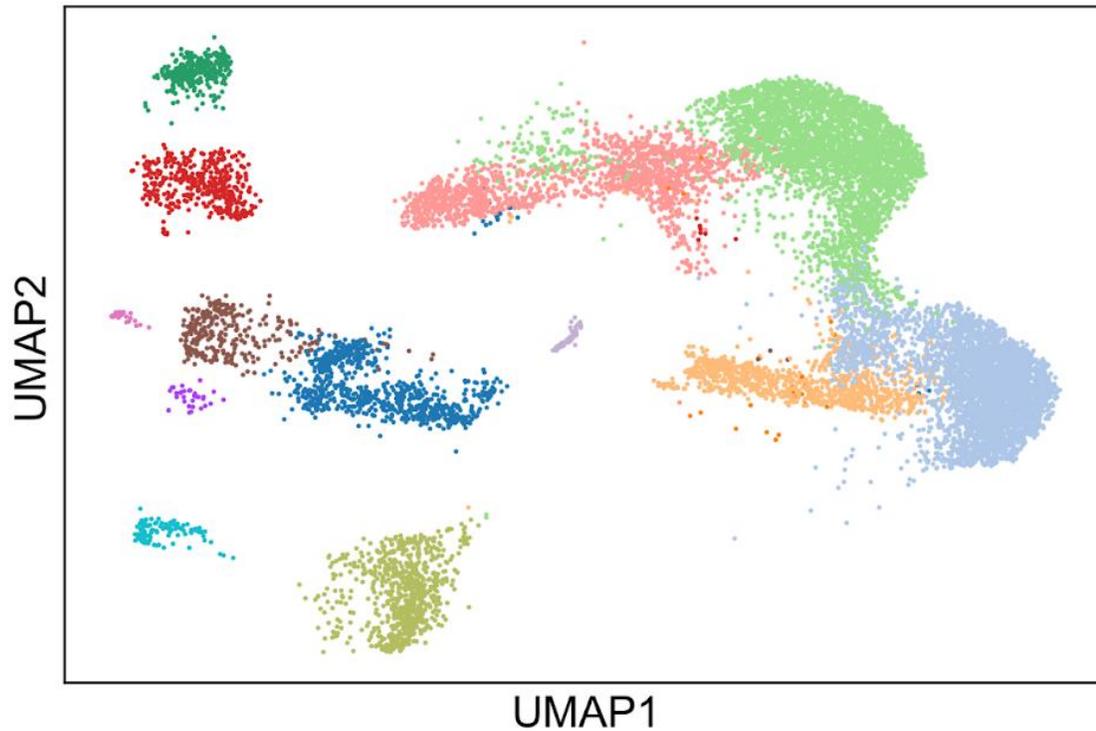
ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА: МАРКЕРЫ

- ❖ Была проведена перекластеризация
- ❖ Многие из известных маркеров совпали, однако были выявлены и те, что ранее не описывались



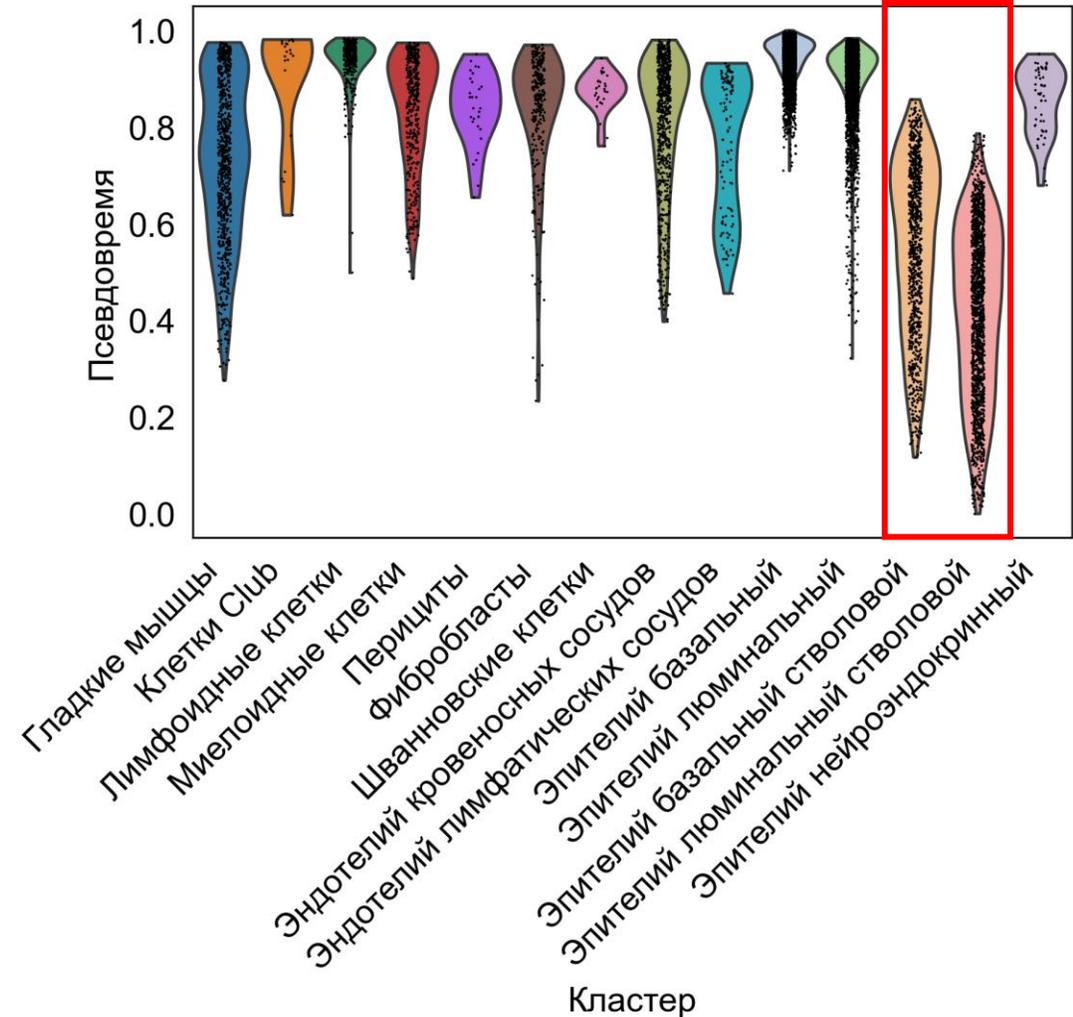
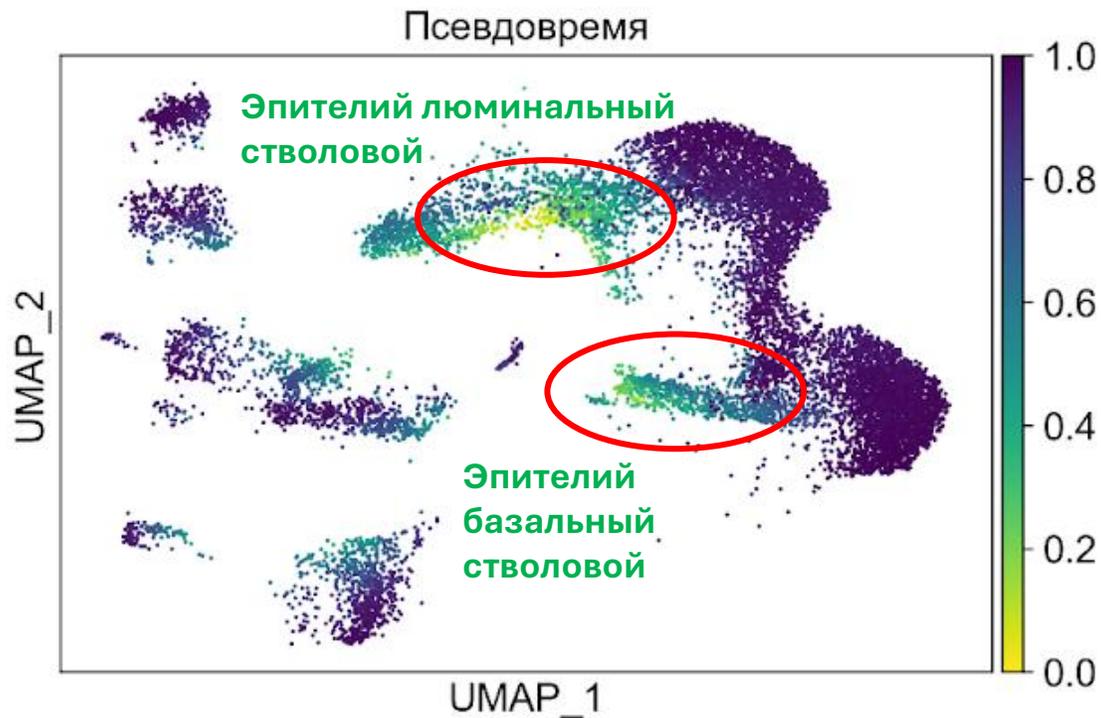
- | | |
|----------------------|-----------------------------------|
| ● Гладкие мышцы | ● Эндотелий кровеносных сосудов |
| ● Клетки Club | ● Эндотелий лимфатических сосудов |
| ● Клетки Hillock | ● Эпителий базальный |
| ● Лимфоидные клетки | ● Эпителий базальный стволовой |
| ● Миелоидные клетки | ● Эпителий люминальный |
| ● Перициты | ● Эпителий люминальный стволовой |
| ● Фибробласты | ● Эпителий нейроэндокринный |
| ● Шванновские клетки | |

ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА: АННОТАЦИЯ



- Гладкие мышцы
- Клетки Club
- Лимфоидные клетки
- Миелоидные клетки
- Перициты
- Фибробласты
- Шванновские клетки
- Эндотелий кровеносных сосудов
- Эндотелий лимфатических сосудов
- Эпителий базальный
- Эпителий базальный стволовой
- Эпителий люминальный
- Эпителий люминальный стволовой
- Эпителий нейроэндокринный

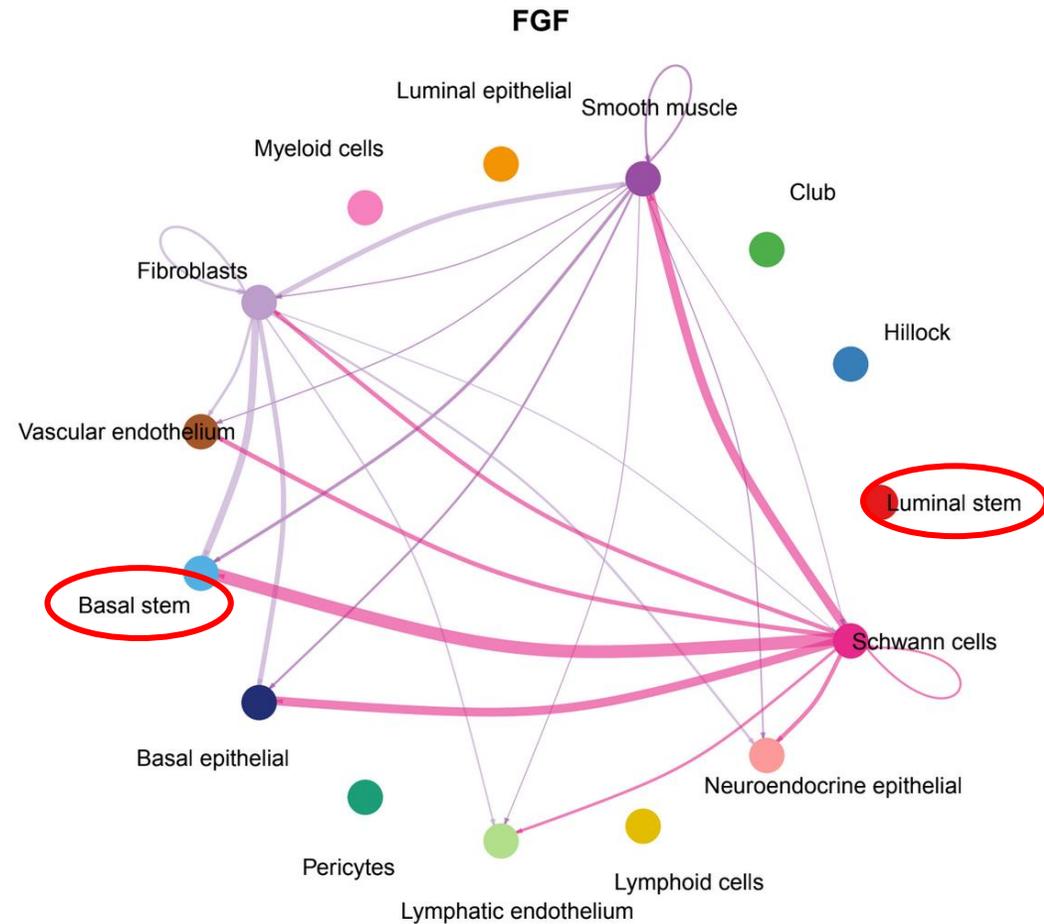
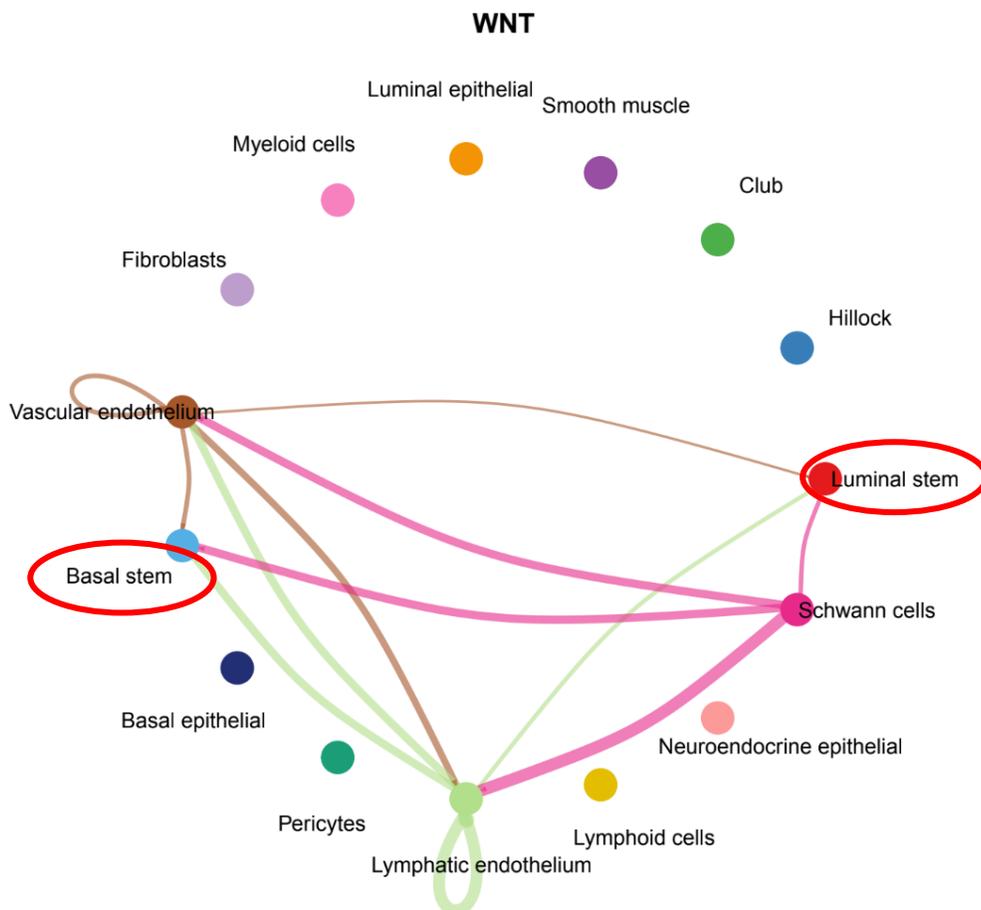
ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА: ПСЕВДОВРЕМЯ



Источники:

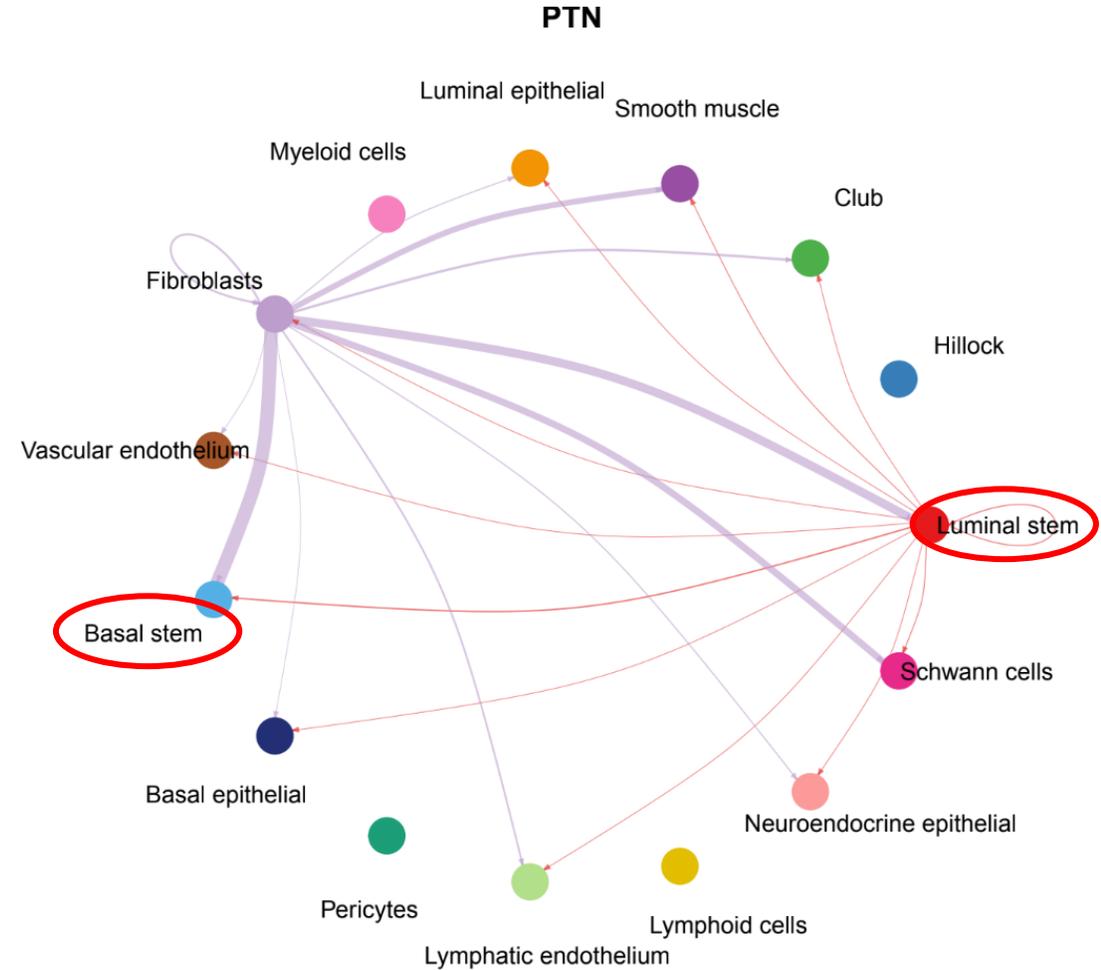
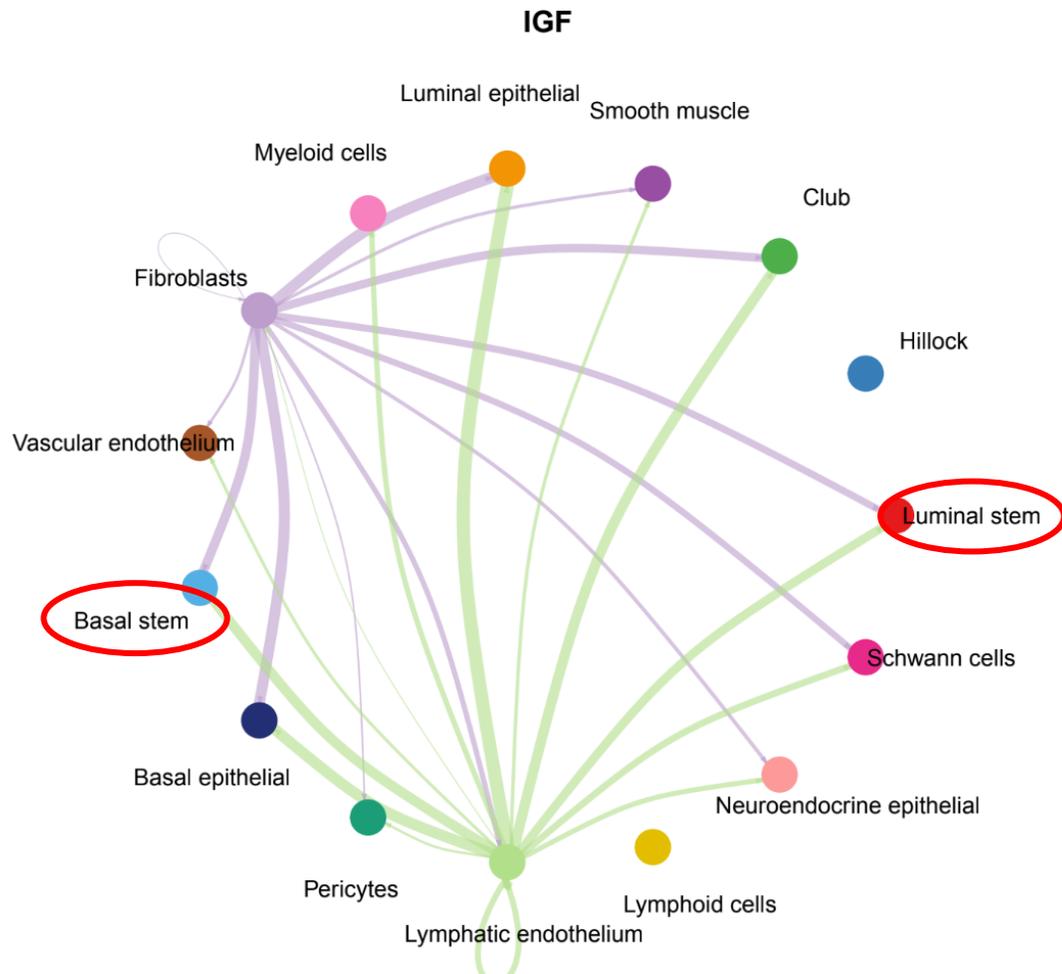
Crowley L. et al. A single-cell atlas of the mouse and human prostate reveals heterogeneity and conservation of epithelial progenitors // eLife. 2020;9:e59465.

ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ





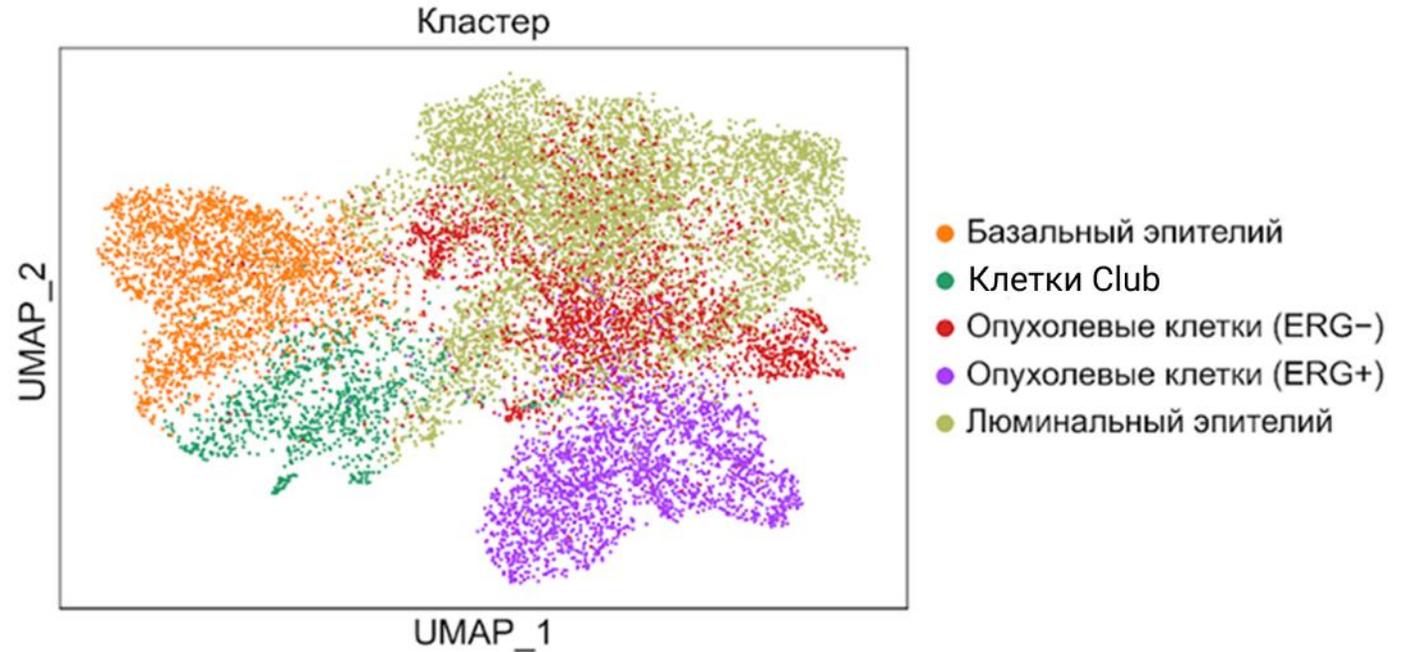
ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ





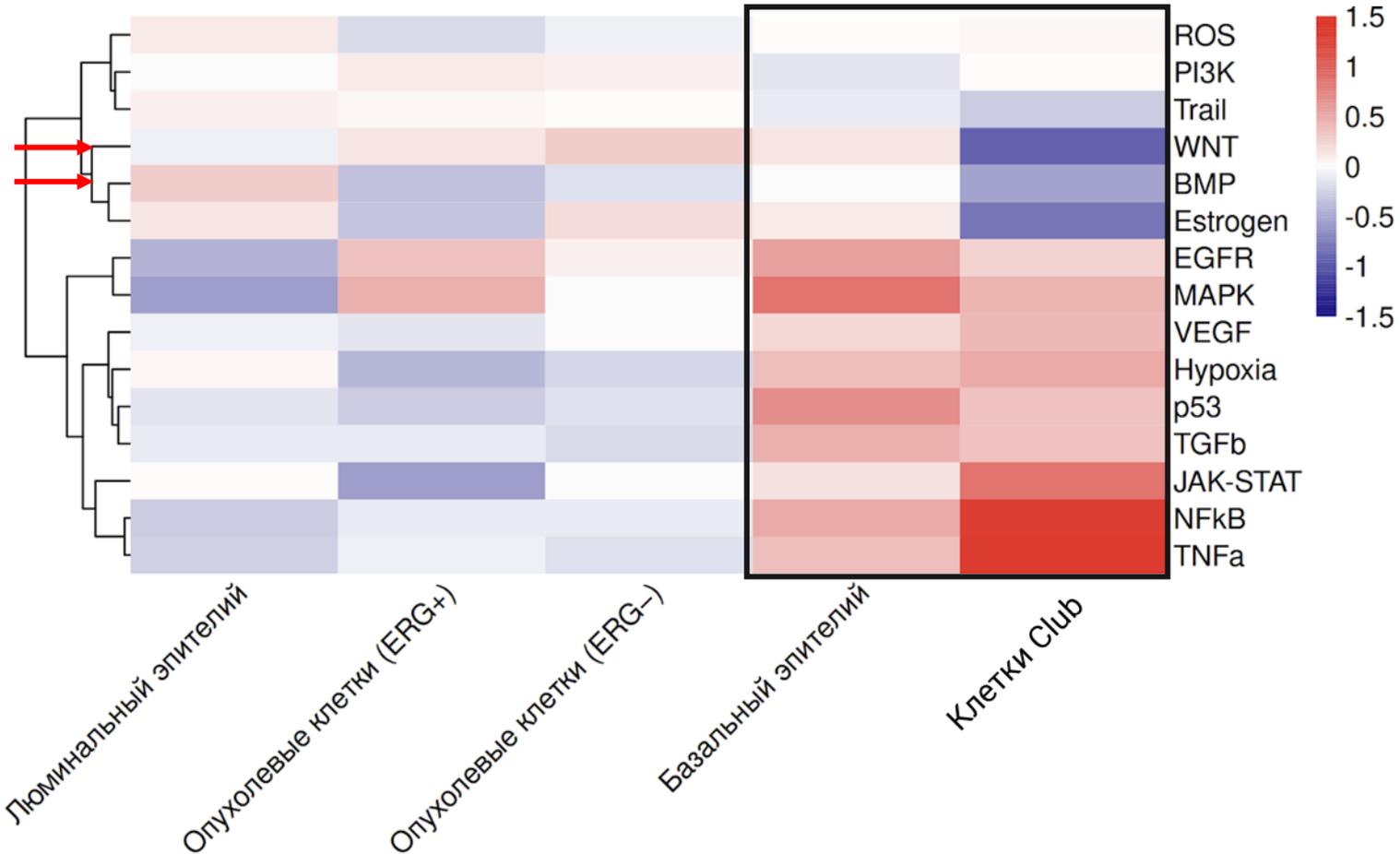
ОПУХОЛЕВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА

- ❖ Использовалась оригинальная аннотация
- ❖ Присутствовало меньшее количество люминальных и базальных кластеров





РПЖ: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ



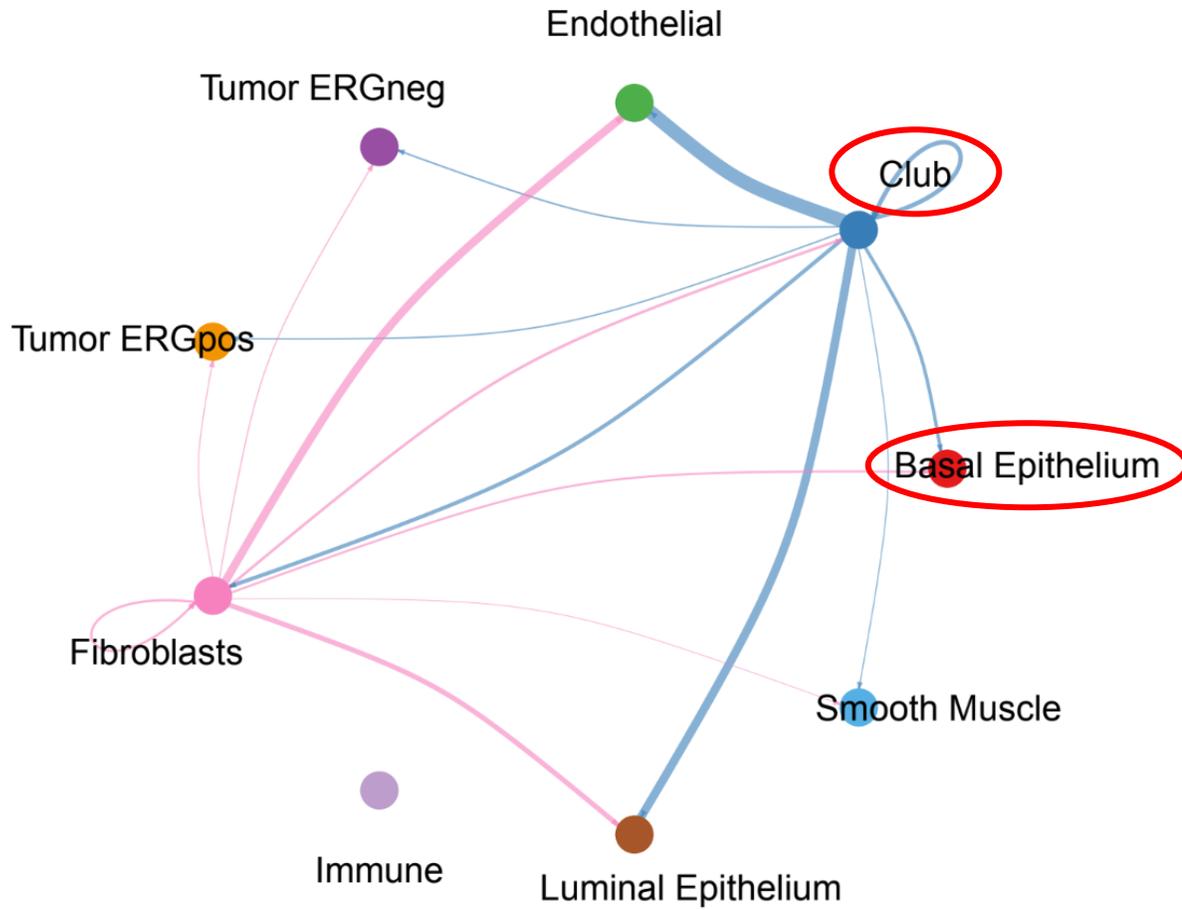
Источники:

Huang F.W. et al. Club-like cells in proliferative inflammatory atrophy of the prostate // J. Pathol. 2023;261(1):85–95.

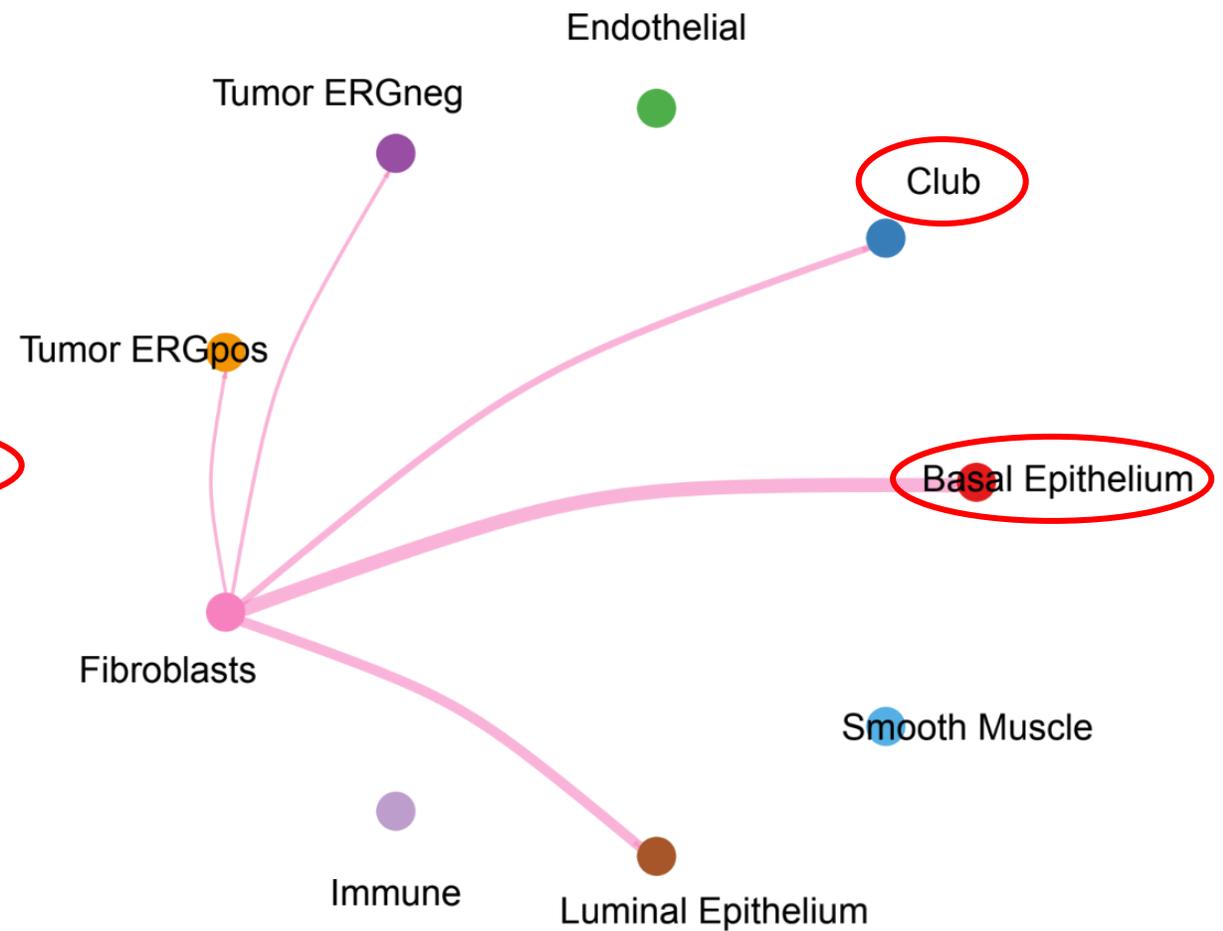


РПЖ: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ

WNT

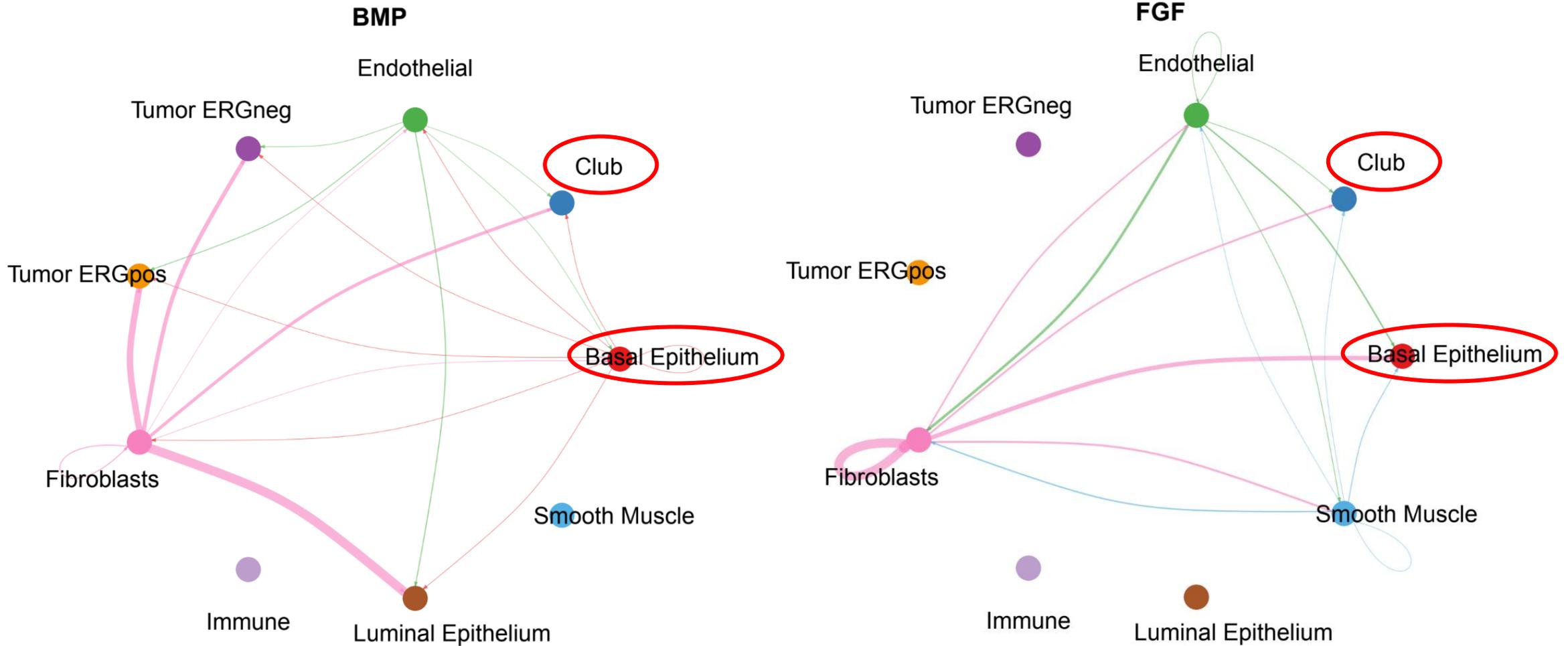


RSPO Coactivation



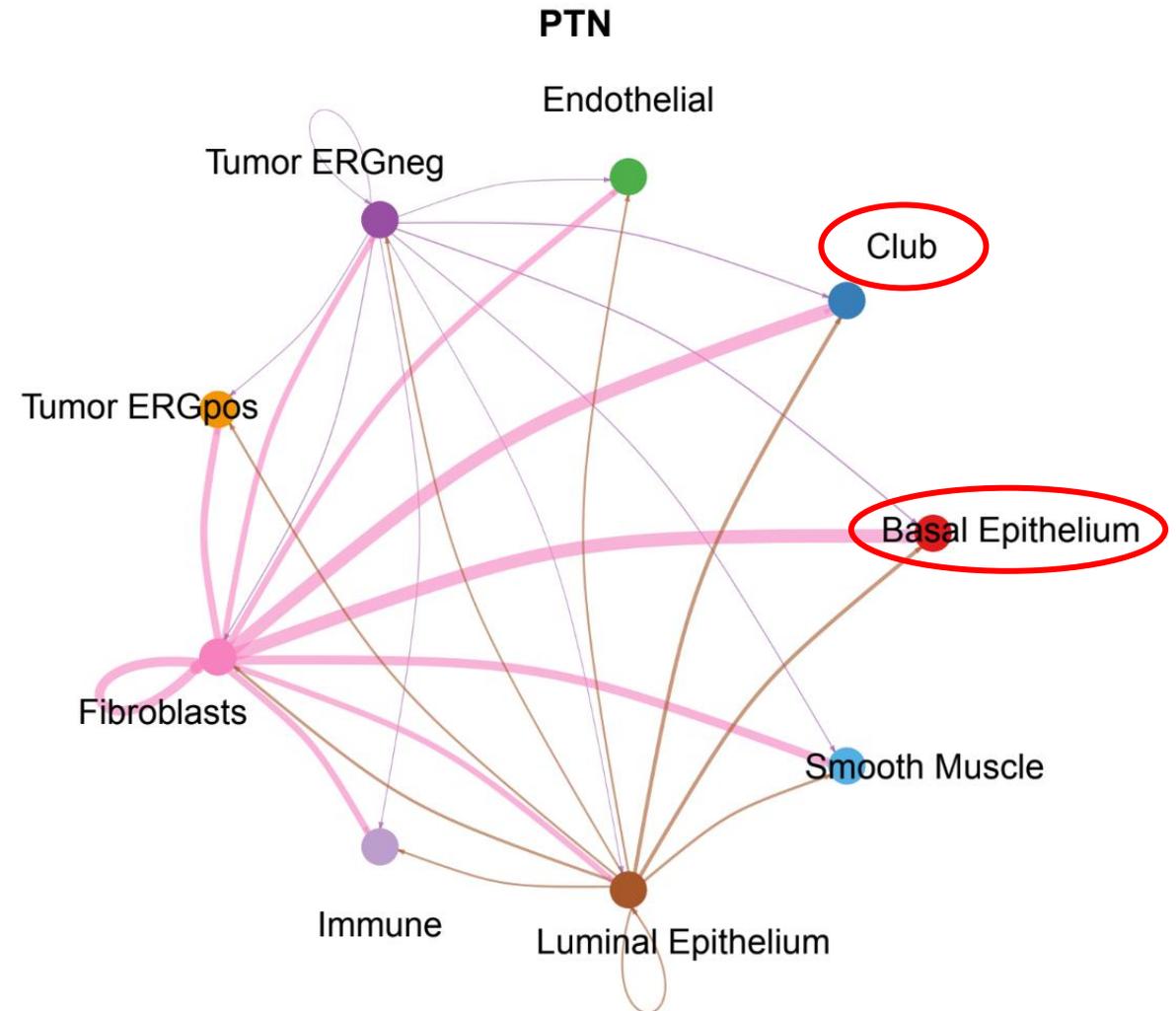
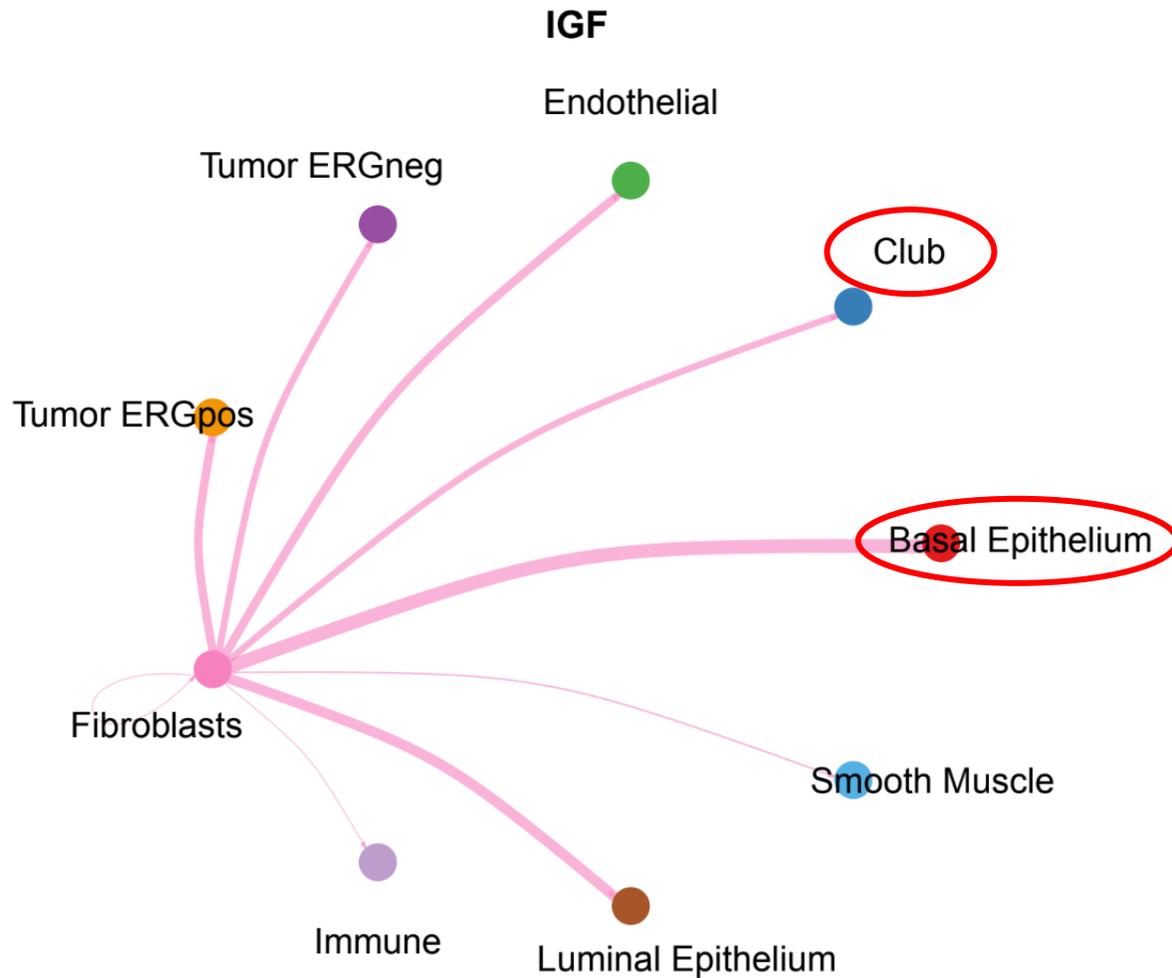


РПЖ: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ





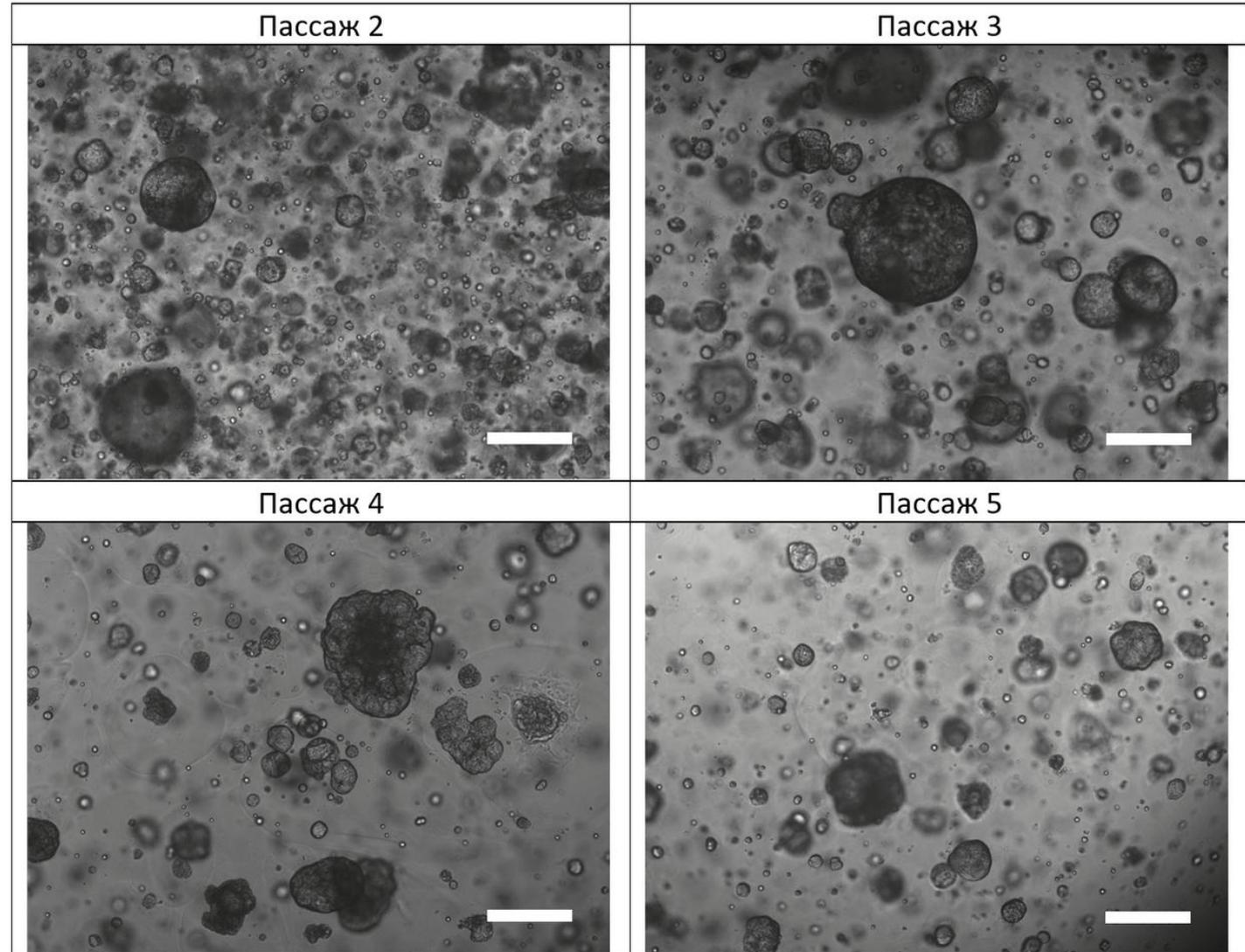
РПЖ: АКТИВНОСТЬ ПУТЕЙ





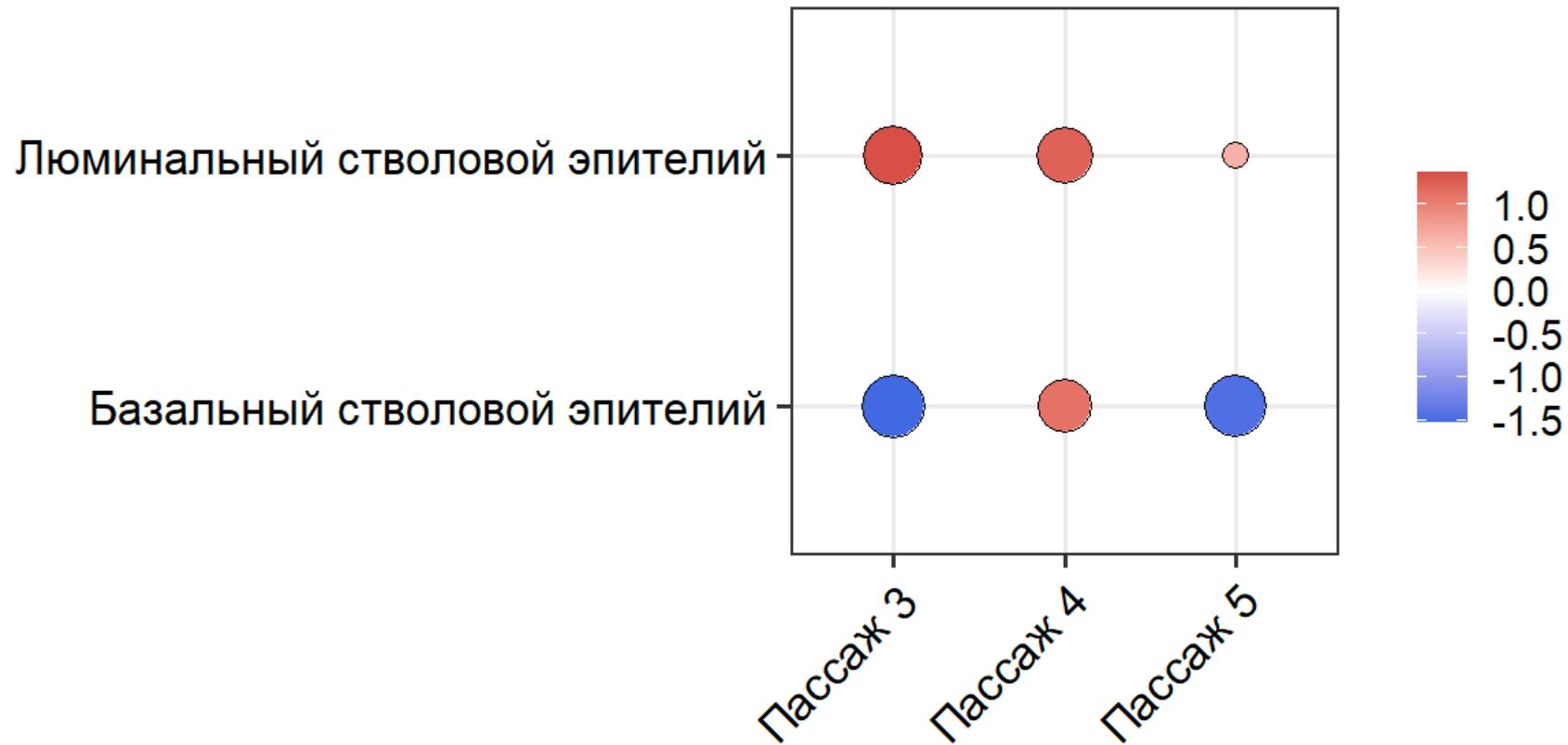
ОРГАНОИДЫ РПЖ

При длительном культивировании органоидов в улучшенной среде на основе стандартной отмечалось снижение доли сферических структур, характерных для ранних пассажей, и увеличение количества органоидов неправильной формы; на поздних пассажах вокруг отдельных органоидов выявлены области, напоминающие скопления муцина





ОРГАНОИДЫ РПЖ





ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов, определяющих эффективность культивирования опухолевых органоидов предстательной железы *in vitro*, является важной задачей современной онкологии. Возможность длительного поддержания органоидных культур обеспечивает более точное воспроизведение опухолевого микроокружения и позволяет проводить персонализированный лекарственный скрининг. Проведённый комплексный транскриптомный анализ единичных клеток позволил выявить потенциальные ключевые молекулярные факторы и межклеточные взаимодействия, обеспечивающие поддержание клеточной гетерогенности и жизнеспособности органоидов, а также предложить рекомендации по оптимизации условий их культивирования



ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного анализа были отобраны следующие наборы транскриптомных данных единичных клеток: из работы Wei и соавторов (здоровая и опухолевая толстая кишка), из работы Eraslan и соавторов (здоровая предстательная железа), а также GSE176031 (рак предстательной железы), как наиболее полные на сегодняшний день и релевантные для задач данного исследования
2. Анализ транскриптомных профилей клеток эпителия толстой кишки подтвердил ключевую роль сигнальных путей WNT, BMP и EGF в регуляции клеточного гомеостаза и поддержании стволовых клеток, а также важность применения соответствующих ростовых факторов и ингибиторов сигнальных путей для поддержания нужных фенотипов клеток в органоидных культурах, что свидетельствует о применимости данного типа анализа для выполнения задач данной работы



ВЫВОДЫ

3. В результате проведенного анализа были идентифицированы и описаны все известные эпителиальные субпопуляции предстательной железы, включая люминальные, базальные, клубноподобные («club-like») и hillock-клетки, а также основные стромальные, иммунные и эндотелиальные популяции; Была разработана расширенная и уточнённая панель транскриптомных сигнатур, позволяющая надёжно идентифицировать перечисленные клеточные подтипы, и были описаны ключевые взаимодействия между ними
4. В результате проведенного сравнительного транскриптомного анализа опухолевых органоидов предстательной железы, культивированных на различных пассажах, было установлено, что при длительном культивировании органоидов существенно снижается доля дифференцированных люминальных клеток и то же время повышается экспрессия базальных маркеров; Данные молекулярные изменения согласуются с фенотипическими проявлениями вырождения органоидов, что подтверждает важность молекулярного мониторинга и необходимость коррекции условий культивирования



ВЫВОДЫ

5. На основании проведённого анализа с целью поддержания люминального фенотипа и клеточной гетерогенности рекомендуется включить в состав питательной среды факторы IGF-1 и IGF-2, FGF-2 и FGF-7, HB-EGF, исключить из состава агонисты пути WNT, проводить культивирование в условиях гипоксии и перейти к культивированию в суспензионных условиях без внеклеточного матрикса



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе впервые был проведён детальный транскриптомный анализ различных клеточных популяций предстательной железы, что расширяет понимание молекулярных основ их гетерогенности и взаимодействий. Практическая значимость исследования заключается в разработке рекомендаций, которые после экспериментальной проверки позволят повысить эффективность получения и длительного культивирования опухолевых органоидов предстательной железы, что создаст основу для их внедрения в клиническую практику в целях персонализированной терапии и разработки новых лекарственных препаратов



**Благодарю
за внимание!**



Факультет биологии и биотехнологии

ОП бакалавриата «Клеточная и
молекулярная биотехнология»

Москва
5 июня 2025 г.

**ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ОПУХОЛЕВЫХ ОРГАНОИДОВ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
*IN VITRO***

Кулагин Тимур Артурович



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Алгоритм отбора маркерных генов

- ❖ Для каждого кластера рассчитывалось средняя сырая экспрессия гена
- ❖ Фильтр: суммарная экспрессия $< 0,05$ → ген исключался
- ❖ Критерий уникальности: $\geq 70\%$ экспрессии в целевой группе и $\text{ratio} (\text{min_in} / \text{max_out}) > 2$
- ❖ Резервный порог (если < 3 маркеров): $\geq 60\%$ и $\text{ratio} > 1,5$
- ❖ Полученные списки использовались для вычисления сигнатур в независимых данных

Модификация PROGENy

- ❖ В базу добавлены пути BMP и ROS; сигнатуры собраны из публикаций и MSigDB

Расширение БД CellChat

- ❖ Создан пользовательский путь «RSPO Coactivation» (RSPO1-4 \leftrightarrow LGR4/5/6)
- ❖ Учтена ключевая роль RSPO-сигналов в активации WNT-ниши стволовых клеток



ЗДОРОВАЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА: МАРКЕРЫ

Кластер	Маркерные гены	Аннотация
0	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB + ADIRF, CD177, DBI, MSMB, MT1G	Эпителий люминальный стволовый
1	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB + ADIRF, CD177, DBI, MSMB, MT1G	Эпителий люминальный стволовый
2	CHP2, DUOX2, DUOXA2, KRT13, LY6D	Клетки Hillock
3	SCGB1A1, SCGB3A1	Клетки Club
4	ACTC1, ACTG2, ALDH1B1, ASB2, ASB5	Гладкие мышцы
5	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB	Эпителий люминальный
6	ADAMDEC1, AIF1, APOBR, APOC1, APOE	Миелоидные клетки
7	BMP5, COMP, DCN, LUM, PAMR1	Фибробласты
8	ACKR1, ANO2, AQP1, CCL23, CLEC1A	Эндотелий кровеносных сосудов
9	KRT5, TP63, NGFR, KRT14 + CCL2, CHI3L1, CRP, DLK2, KRT14	Эпителий базальный стволовый
10	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB + ADIRF, CD177, DBI, MSMB, MT1G	Эпителий люминальный стволовый

11	KRT5, TP63, NGFR, KRT14	Эпителий базальный
12	KRT5, TP63, NGFR, KRT14	Эпителий базальный
13	ANKRD1, CXCL3, CP	Club-like клетки
14	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB	Эпителий люминальный
15	ADRA2A, CCL19, CNR1, COX4I2, FHL5	Перициты
16	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB	Эпителий люминальный
17	KLK3, NKX3-1, DPP4, ACP3, MSMB	Эпителий люминальный
18	ADGRG3, CCL21, CD36, CLEC4M, F2RL3	Эндотелий лимфатических сосудов
19	BFSP2, C16orf54, CCL4, CCL5, CD2	Лимфоидные клетки
20	ACTC1, ACTG2, ALDH1B1, ASB2, ASB5	Гладкие мышцы
21	CHGA, ASCL1, TPH1, CELF3, SLC18A1	Эпителий нейроэндокринный
22	ADAMTS8, AQP7, CADM2, CDH19, FAM181B	Шванновские клетки



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОРГАНОИДОВ РПЖ

Опухолевые органоиды предстательной железы культивировали во внеклеточном матриксе Matrigel (Corning, США) и специальной питательной среде для органоидов РПЖ. Для этого полученную ранее органоидную культуру субкультивировали при помощи добавления диссоциирующего раствора TrypLE Express (Gibco, США). Центрифугировали получившуюся клеточную суспензию с ускорением 200 g в течение 5 минут, отбирали надосадочную жидкость и промывали осадок раствором DPBS (ПанЭко, Россия). Повторно центрифугировали при таких же параметрах, отбирали надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в культуральной среде Advanced DMEM/F-12 (Gibco, США). Затем пробирку с суспензией клеток помещали на лед и смешивали с внеклеточным матриксом Matrigel (Corning, США) в соотношении 1:5. Далее 50 мкл получившейся суспензии переносили в лунки культурального 24-луночного планшета. Планшет помещали в клеточный инкубатор (37°C, 5% CO₂) до застывания геля



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОРГАНОИДОВ РПЖ

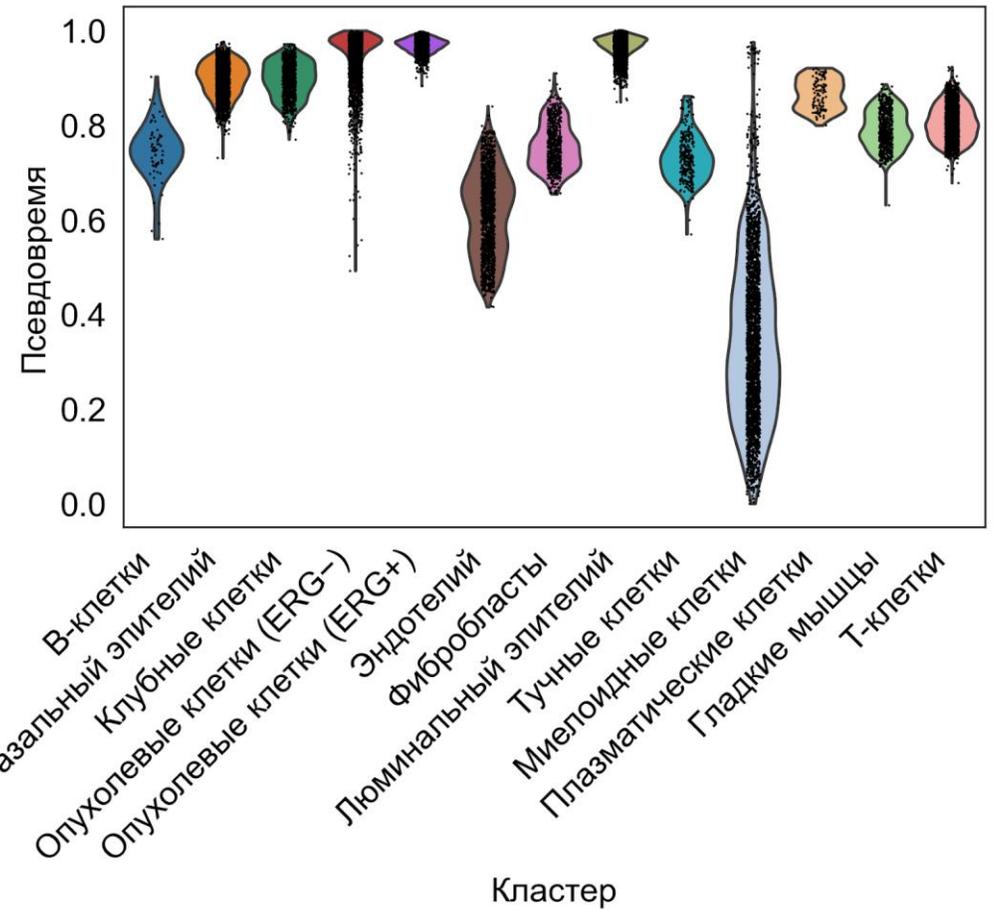
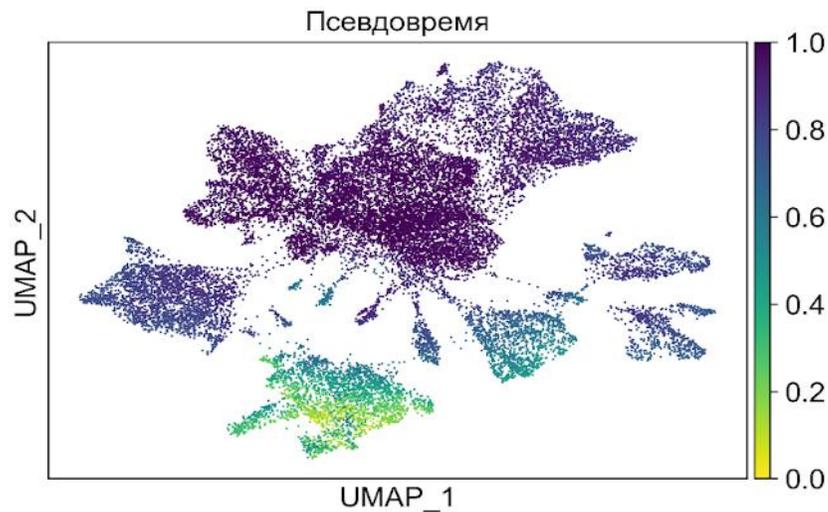
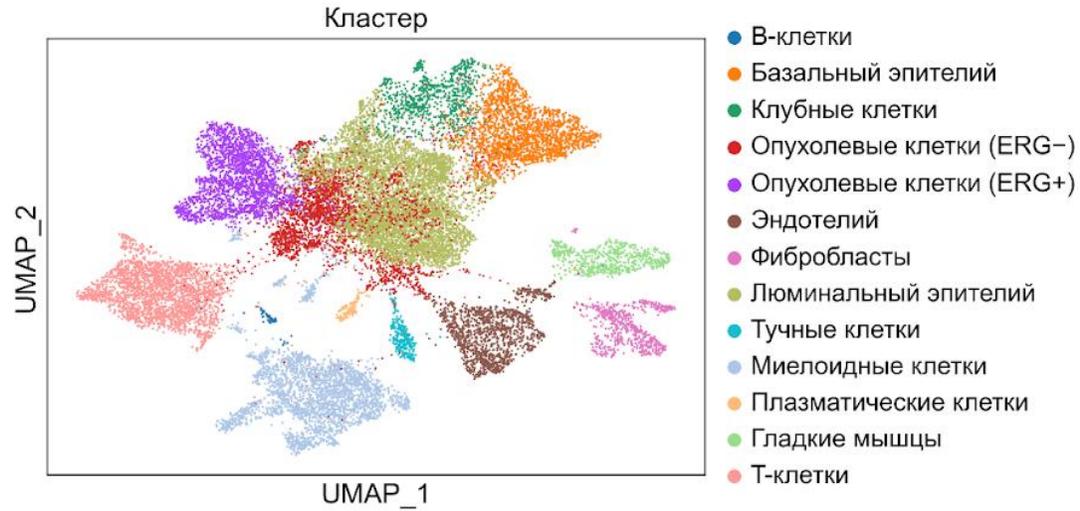
Затем в лунки добавляли по 500 мкл питательной среды, состоящей из базовой среды Advanced DMEM/F12 (Gibco, США), с добавлением 10 мМ HEPES (Gibco, США), 2 мМ GlutaMax (Gibco, США), 2% B27 vitA free (Gibco, США), 1% раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, США), 1,25 мМ N-ацетилцистеина (Sigma, США), 10 мМ никотинамида (Sigma, США), 50 нг/мл Wnt3A (R&D Systems, США), 500 нг/мл R-spondin 1 (PeproTech, США), 100 нг/мл Noggin (PeproTech, США), 25 нг/мл EGF (Gibco, США), 5 нМ херегулин-β1 (PeproTech, США), 20 нг/мл FGF2 (R&D Systems, США), 20 нг/мл FGF7 (PeproTech, США), 20 нг/мл FGF10 (PeproTech, США), 10 нг/мл IGF1 (PeproTech, США), 10 нг/мл IGF2 (PeproTech, США), 10 нМ гастрин I (Sigma, США), 10 мкМ PGE2 (STEMCELL Technologies, Канада), 500 нМ A83-01 (STEMCELL Technologies, Канада), 500 нМ SB202190 (Tocris Bioscience, США), 10 мкМ Y-27632 (STEMCELL Technologies, Канада), 1 нМ 5α-дигидротестостерон (Sigma, США). Далее планшет помещали в клеточный инкубатор (37°C, 5% CO₂), смену среды производили каждые 48 часов. Динамику роста клеток оценивали визуально при помощи инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия)



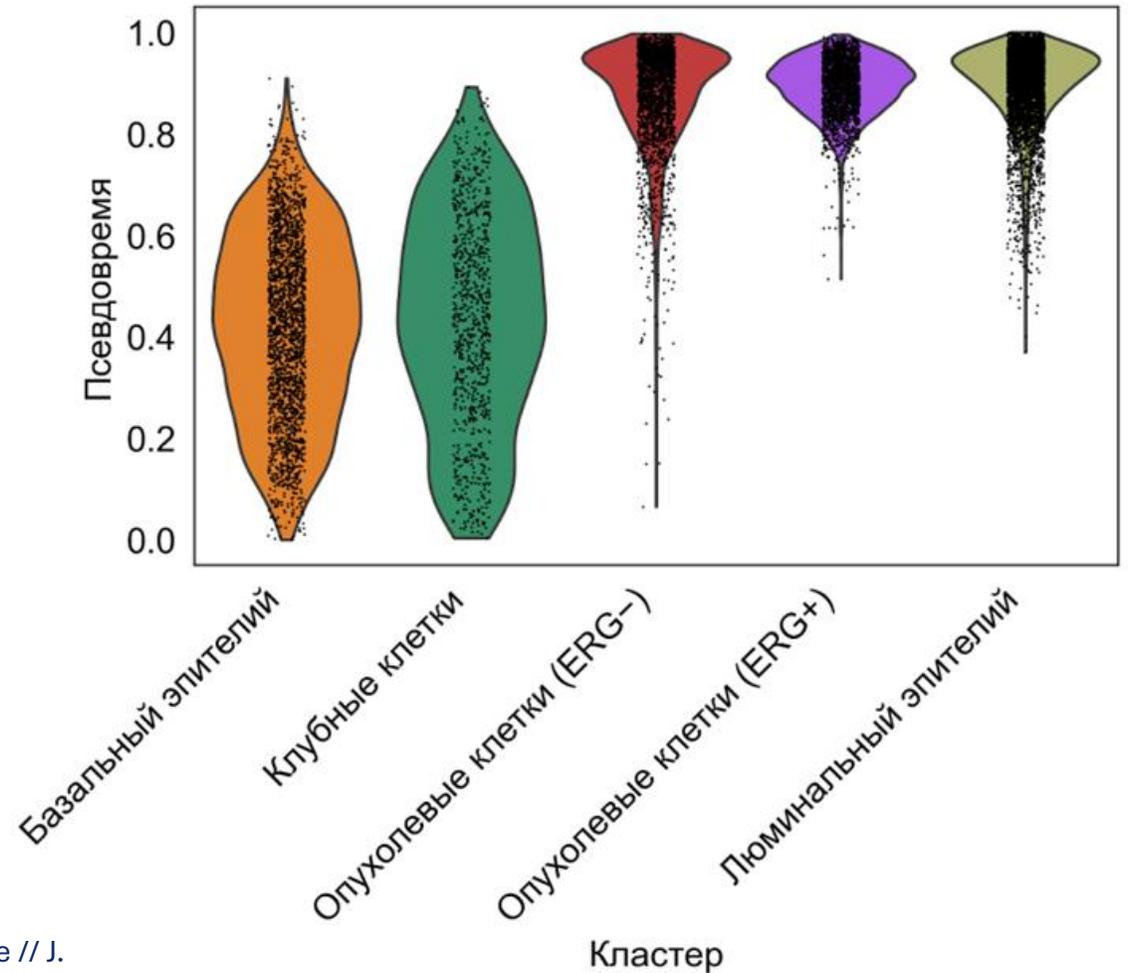
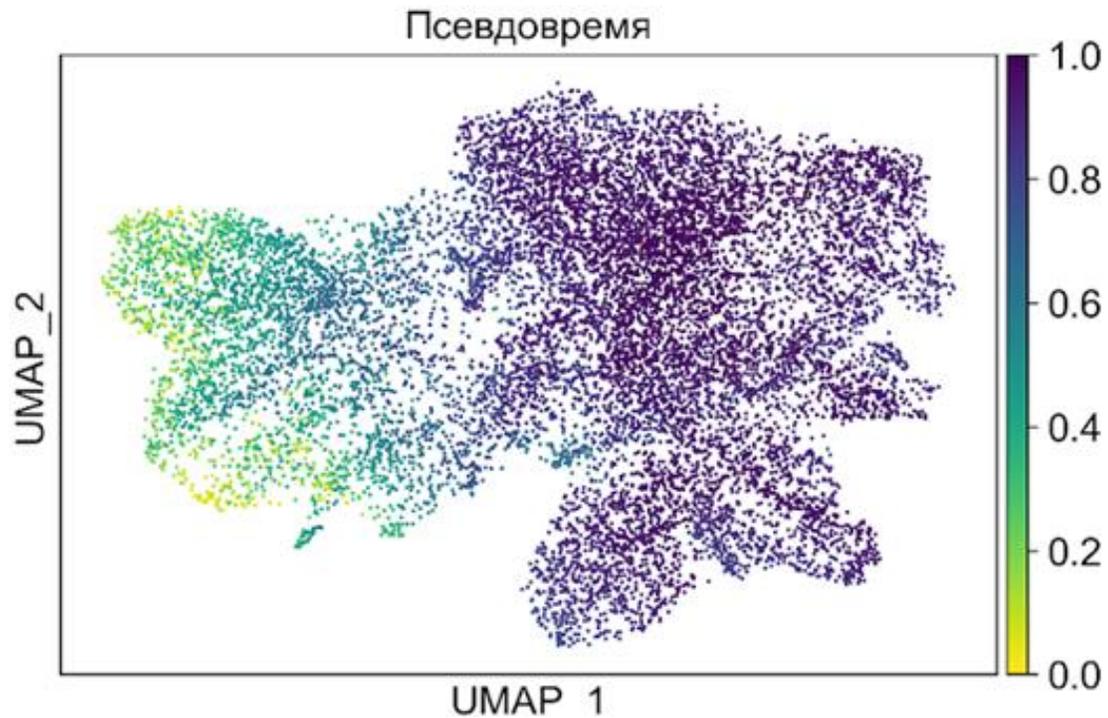
ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕК ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Для выделения РНК полученные на разных пассажах культуры органоидов рака предстательной железы диссоциировали при помощи раствора TrypLE Express (Gibco, США). Затем получившуюся клеточную суспензию центрифугировали с ускорением 200 g в течение 5 минут и отбирали надосадочную жидкость. К клеточным осадкам добавляли по 700 мкл лизирующего раствора Qiazol (Qiagen, Германия) и хранили лизаты при температуре -80 °С до выделения тотальной РНК. Тотальную РНК выделяли при помощи набора miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК сначала измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США), а затем более точно с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Для контроля качества выделенной из образцов тотальной РНК использовали биоанализатор Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Секвенирование проводили на платформе Illumina NovaSeq X Plus в режиме парных прочтений длиной 150 п.н.. Библиотеки были приготовлены согласно протоколу производителя

РПЖ: ПСЕВДОВРЕМЯ



РПЖ: ПСЕВДОВРЕМЯ



Источники:

Huang F.W. et al. Club-like cells in proliferative inflammatory atrophy of the prostate // J. Pathol. 2023;261(1):85–95.