

На правах рукописи

КОЗЛОВ ИВАН БОРИСОВИЧ

**Молекулярное баркодирование как новый метод изучения функции
Т-лимфоцитов на уровне единичных клеток**

3.2.7. Иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель:

доктор биологических наук **Кофиади Илья Андреевич**

Официальные оппоненты:

Анисимова Наталья Юрьевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Ефимов Антон Евгеньевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатория бионанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте:

<https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/zashchity-dissertatsiy/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности

Использование полистирольного субстрата в качестве носителя при синтезе олигонуклеотидной (ОН) последовательности ускорило развитие данного направления органической химии. До этого синтез последовательностей осложнялся высокими трудовыми и временными затратами, т.к. проводился при помощи жидкофазного метода, предполагающего длительные стадии выделения и отмывки. Развитие олигонуклеотидной химии привело к появлению четырех основных методов синтеза ОН, которые стали популярными и применялись для различных целей: Н-фосфонатный, фосфодиэфирный, фосфотриэфирный и фосфитный триэфирный. В большинстве своем их развитие происходило параллельно в разных лабораториях. Однако наиболее удобным с точки зрения автоматизации и стабильности процесса оказался фосфитный триэфирный метод, который занял позицию «золотого стандарта» олигонуклеотидного синтеза.

С ростом производительности приборов, которые позволяли за более короткий срок синтезировать более длинные олигонуклеотиды, развивались и направления, в которых синтетические ОН могли применяться. В частности, были разработаны дополнительные модификации нуклеиновой кислоты, которые позволили применять синтетические олигонуклеотиды в биологических, а позже и в медицинских целях. Изменения структуры нуклеотида, которые включают в себя модификации рибозного кольца, межнауклеотидной фосфатной связи и азотистого основания, нашли применение в различных научных направлениях и отраслях промышленности: антисенс-технологии на базе малых интерферирующих РНК, ПЦР и секвенирование с использованием меченных флюорофорными молекулами ОН, сингл-селл технологии, редактирование геномов, а также разработка фармацевтических субстанций.

Альтернативный способ преобразования олигонуклеотидной последовательности подразумевает внесение смысловых модификаций, таких как молекулярное мечение ОН благодаря баркодированию определенного участка последовательности. Это позволяет снизить количество ошибок и неравномерность

амплификации при проведении РНК-секвенирования (CEL-seq, MARS-seq, Drop-seq). Применение подобных методов позволяет обрабатывать информацию, получаемую от большого числа клеток. В таких случаях слабые сигналы, которые исходят от небольшого количества единичных клеток, обычно теряются. В свою очередь, данные, полученные на уровне отдельных клеток, в ряде случаев представляют значительную практическую ценность, в особенности это касается клеток иммунной системы. Информация о небольших популяциях клеток памяти, тканеспецифических лимфоцитах, эффекторных клетках, вовлеченных в противоопухолевый и аллогенный ответ, позволяет диагностировать заболевание, прогнозировать его развитие и находить эффективный способ лечения. Так, например, исследования структуры репертуаров Т-клеточных рецепторов (ТКР) и функций Т-лимфоцитов при развитии патологического процесса требуют оценки эволюции Т-клеточного адаптивного иммунного ответа с учетом данных о клональном происхождении Т-клеток эффекторов. В ряде работ предлагаются методы анализа единичных Т-лимфоцитов, однако их недостатком является невозможность одновременного анализа большого числа клеток и высокая стоимость. Существуют коммерческие решения для анализа репертуаров ТКР единичных Т-клеток или для анализа экспрессионного профиля единичных клеток, но цена такого анализа составляет порядка 20 тысяч евро за 1 эксперимент. При этом, несмотря на свою цену, предлагаемые технологии не могут быть использованы для комплексного исследования функции Т-лимфоцитов в контексте их антигенной специфичности.

Безусловно, технология, которая позволит снизить стоимость анализа и повысить эффективность обработки получаемой информации от единичных клеток, совершит прорыв в фундаментальной и клинической иммунологии.

Существующие в настоящее время технологии подразумевают использование полистирольных частиц с ковалентно связанными баркодированными ОН в эмульсионной ПЦР. Однако данный подход показал недостаточную эффективность в экспериментах, а долгие сроки поставки реактивов из-за рубежа делают технологию scRNA-seq неприменимой для рутинной диагностики.

Таким образом, разработка отечественной технологии формирования синтетических ОН на твердофазном носителе с заданными характеристиками и специфическими последовательностями, которая позволит получать информацию от единичных клеток, приведет к развитию фундаментальных и прикладных направлений в области изучения клеточного разнообразия, фенотипических особенностей и эволюции клетки.

Цель исследования

Разработка отечественной технологии мечения мРНК единичных клеток на базе твердофазного олигонуклеотидного синтеза и эмульсионной ОТ-ПЦР.

Задачи исследования

Для достижения поставленных целей необходимо было решить следующие задачи:

1. Осуществить синтез на поверхности полистирольной частицы, модифицированной функциональными группами, баркодированной олигонуклеотидной последовательности с помощью автоматического ДНК/РНК синтезатора.
2. Использовать «обратные» 5'-фосфорамидиты в синтезе для ориентации на частице олигонуклеотидной последовательности, которая прикреплена с 5'-конца, и формирования свободной 3'-гидроксильной группы.
3. Осуществить формирование уникальной метки частицы путем синтеза баркодированного участка последовательности ОН, используя рандомизацию подачи растворов фосфорамидитов с последующим объединением и перемешиванием частиц.
4. Оценить эффективность мечения мРНК клеток с помощью обратной транскрипции и синтезированных баркодированных ОН.
5. Охарактеризовать и исключить факторы, которые снижают эффективность процесса синтеза кДНК, благодаря дополнительного введения синтетических молекул в структуру олигонуклеотида.

Положения, выносимые на защиту

1. Впервые в отечественной практике предпринята попытка дизайна и реализации комплексной технологии обработки нескольких десятков тысяч единичных клеток, которая позволяет оценивать и сравнивать профили экспрессии различных генов между собой, изучать генетическую эволюцию в популяции и ткани.

2. Впервые предложен и реализован подход инкорпорирования спейсерных молекул для снижения влияния пространственного фактора на активность полимеразы при синтезе комплементарной ДНК на поверхности частицы. В результате встраивания дополнительных молекул в структуру олигонуклеотида привело к увеличению выхода продукта синтеза кДНК.

3. Впервые предложен и реализован подход к инкорпорированию фотодеградируемого линкера для высвобождения синтетической олигонуклеотидной последовательности, которая позволяет праймировать матричную РНК с высокой эффективностью, в раствор. Подобраны параметры проведения этого процесса в мягких условиях, для воздействия исключительно на фоточувствительный фрагмент, что не оказывает влияния на нуклеиновую кислоту.

Научная новизна исследования

Разработанная технология эффективного мечения ОН с помощью молекулярных баркодов позволяет с высокой точностью определять и характеризовать структуру переменных фрагментов генов Т-клеточных рецепторов. Подобного комплексного подхода к изучению функциональной гетерогенности Т-лимфоцитов, объединяющего новейшие технологии в сфере твердофазного олигонуклеотидного синтеза, методы химической модификации синтетических ОН и разработки в области высокопроизводительного анализа единичных клеток, ранее описано не было.

Применены и описаны современные методы формирования баркодированных последовательностей в процессе синтеза ОН на твердофазном носителе с применением автоматических синтезаторов.

Впервые использован ПЭГ-спейсер (Spacer phosphoramidite 18) для инкорпорирования в структуру синтетического ОН. Показано, что его встраивание приводит к устранению пространственного фактора, снижающего активность ферментов. Для этого перед синтезом олигонуклеотидной последовательности проводилась модификация полистирольных частиц ПЭГ-спейсером.

Впервые использован фотодеградируемый линкер (PC-linker Phosphoramidite) для инкорпорирования в структуру синтетического ОН. Показано, что его применение обеспечивает стабильное закрепление олигонуклеотидной последовательности на поверхности частицы. За счет чувствительности линкера к мягкому УФ-излучению, воздействие которого приводит к полной деструкции фрагмента его молекулы, происходит быстрое высвобождение синтетического ОН в раствор.

Показано, что свободный ОН эффективнее участвует в праймировании клеточной мРНК, а отсутствие влияния стерических факторов благоприятно сказывается на активности ферментов, что в сумме приводит к повышению эффективности синтеза кДНК.

Впервые осуществлен процесс эмульгирования полученных частиц с синтетическими олигонуклеотидами и клеток в системе вода-в-масле. Подобраны условия и реагенты для формирования устойчивой эмульсии, а также ее деструкции. Коллегами из Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова разработан прибор, позволяющий эмульгировать клетки с частицами в масле в мягких условиях.

На основе международного опыта создания систем для высокопроизводительного анализа большого количества единичных клеток проанализированы направления модернизации разработанных технологий.

Теоретическая значимость работы

Разработан и внедрен подход к уменьшению влияния стерического фактора на эффективность работы полимеразы при синтезе комплементарной ДНК на поверхности частицы. Применение системы спейсеров и линкеров позволило

повысить выход продукта синтеза кДНК при сохранении минимального количества частиц, вовлеченных в процесс праймирования мРНК. Разработанные технические решения существенно сократили издержки, обусловленные себестоимостью метода, а также привели к созданию технологии, которая будет значительно дешевле зарубежных аналогов, оставаясь конкурентоспособной.

Результаты исследования могут быть включены в научно-методические программы для студентов химических, биологических и медицинских ВУЗов, а также в образовательные программы учреждений высшего профессионального и последипломного образования.

Научно-практическая значимость работы

Разработаны и внедрены методы твердофазного синтеза длинной последовательности олигонуклеотида с использованием автоматического ДНК/РНК синтезатора и модификации программы синтеза. Это позволяет снизить расходы на дорогостоящие реактивы и повысить эффективность процесса синтеза, обеспечивая высокие выходы продукта.

Модернизирован процесс синтеза ОН последовательности на твердофазном носителе с использованием инвертированных фосфорамидитов, применение которых позволяет синтезировать последовательность в направлении 5' → 3'. Синтез олигонуклеотидной последовательности с использованием «обратных» фосфорамидитов создает возможность закрепленному ОН праймировать нуклеиновые кислоты, а также осуществлять мечение вновь синтезированных молекул кДНК.

Внедрение результатов в исследовательскую практику

Результаты работы использованы в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, ООО «ДНК-Технология ТС», ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН.

Публикации по теме диссертации

Основные результаты диссертации опубликованы в 7 печатных работах, в том числе 6 статьях в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых

периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций («Иммунология», «Генетика» «Вестник РГМУ», Allergy). Также по результатам работы получен 1 патент.

Апробация диссертации

Результаты работы представлены в устном докладе, с которым автор выступил на международном конгрессе Федерации Европейских биохимических обществ (FEBS Congress 2020, Краков), а также в рамках конференции II Научно-практическая школа «Секвенирование единичных клеток» (2020, Томск).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах текста, содержит 15 рисунков и 8 таблиц. Работа включает следующие разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Список литературы состоит из 165 источников, в том числе 18 отечественных и 147 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Твердофазный синтез олигонуклеотидов

Синтез олигонуклеотидов проводился на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе Polygen (Германия) с помощью амидофосфитного метода. В качестве твердофазного носителя, на котором осуществлялся рост олигонуклеотидной последовательности в ходе синтеза, использовали Toyopearl HW-65S (Tosoh Bioscience LLC, Япония) со средним диаметром частиц 30 мкм. В одну лунку слайдера помещали по 20 мг носителя.

Присоединение нуклеотидов осуществлялось по следующим стадиям: детритилирование, присоединение нуклеотида (конденсация), кэпирование и окисление. Время конденсации для 5'-фосфорамидитов увеличили до 1,5 мин по сравнению с обычными нуклеотидами.

Деблокирование защитных групп проводили в стандартных условиях.

Модификация твердофазного носителя ПЭГ-спейсером и РС-линкером

Перед синтезом олигонуклеотидной последовательности первоначально осуществляли модификацию твердофазной поверхности полистирольных частиц ПЭГ- и РС-фосфорамидитами (Spacer Phosphoramidite 18 и PC Linker Phosphoramidite).

Время конденсации модификаторов увеличили до 3 мин по сравнению с обычными нуклеотидами. Присоединение каждого модификатора осуществляли последовательно.

Синтез баркодированной олигонуклеотидной последовательности

Формирование клеточного баркода методом «split-and-pool»

Генерацию клеточного баркода осуществляли в четырех лунках (реакторах) слайдера. В каждом из реакторов проводили полный цикл присоединения одного из четырех нуклеозидов. После содержимое реакторов переносили в пробирку, заливали C_2H_5OH (0,8 мл) и перемешивали на вортексе. Полученную суспензию аккуратно разносили с помощью дозирующего устройства по четырем реакторам в равных пропорциях.

Повторяли описанную процедуру требуемое количество раз (от 10 до 12).

Формирование UMI баркода

Генерацию UMI баркода осуществляли в одной лунке (реакторе) слайдера. Для этого в ходе стадии конденсации подавали заранее смешанный раствор четырех фосфорамидитов (в эквимольном соотношении).

Повторяли описанную процедуру требуемое количество раз (от 10 до 12).

Фотолиз баркодированных олигонуклеотидов

Оценку скорости деградации РС-линкера проводили с использованием частиц с олигонуклеотидными последовательностями, присоединенными к поверхности через фотодеградируемый линкер (PC Linker Phosphoramidite).

Водную суспензию частиц помещали в УФ-проницаемое стекло (Fluorodish) и облучали мягким УФ (300-350 нм) в течение 1 часа. В указанные промежутки времени (10 сек, 30 сек, 1, 2, 4, 8, 16, 30 и 60 мин) отбирали аликвоты водной

эмульсии для фиксации изменения оптической плотности раствора за счет увеличения концентрации высвобожденного олигонуклеотида.

Подтверждение синтеза баркода методом «split-and-pool» с помощью биологических методов

Оценку успешности синтеза баркода исследовали на примере олигонуклеотида:

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT**JJJ**GAGCTGGTACACGGCAGGGTC-3',

в котором имелся трех-нуклеотидный участок (**JJJ**), сформированный в процессе синтеза методом «split-and-pool».

Синтезированные последовательности использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР на базе ГНЦ ИБХ РАН. Продукты амплификации использовали для лигирования в вектор pGEM-T Easy (или pAL-2T). Инкубацию проводили при +14°C в течение ночи.

Для трансформации компетентных клеток XL1-Blue или DH5α использовали полученную лигазную смесь. Для этого клетки подвергали тепловому шоку, с помощью которого обеспечивается проникновение векторов в клетку.

Затем высевали клетки на твердую среду (LB-агар), содержащую антибиотик (ампициллин или канамицин), а в случае проведения бело-голубой селекции добавляли X-Gal и IPTG.

Отбор полученных клонов методом бело-голубой селекции проводили с помощью проверки методом ПЦР. Для этого выбранные колонии ресуспендировали в ПЦР-смеси. Полученную смесь подвергали амплификации.

Определение нуклеотидной последовательности вставок проводили в компании «Евроген» с помощью автоматического секвенатора ДНК с последующим анализом хроматограмм в программе SnapGene.

Инкапсуляция клеток и частиц с олигонуклеотидами в каплях эмульсии вода-в-масле

Приготовление эмульсии и инкапсуляция полученных частиц с клетками проводились сотрудниками ГНЦ ИБХ РАН.

Т-лимфоциты получали выделением из лимфоидной фракции клеток крови методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографин. Водную фазу для инкапсуляции в каплях эмульсии готовили с Т-клетками (из расчета 150 000 клеток/мл) и реагентами для ОТ-ПЦР. В качестве масляной фазы использовали фторуглеродное масло производства компании Biorad.

Эмульгирование осуществляли на микрофлюидной установке с использованием PDMS-чипа. Для формирования капель правильной формы на подающих реагенты насосах устанавливали следующие параметры: скорость масла - 63 мкл/мин, водные фазы - 15 мкл/мин каждая.

Проведение обратной транскрипции в эмульсии и подготовка библиотеки ДНК-фрагментов к секвенированию

Собранную эмульсию аликвотировали (по 50 мкл) в несколько пробирок и помещали в амплификатор для проведения ОТ-ПЦР.

Затем реакционные объёмы объединяли из 4 пробирок в одну (до 200 мкл) и добавляли ЭДТА для блокировки активности ревертазы. Экстракцией водной фазы из эмульсии с помощью диэтилового эфира выделяли продукт реакции. Затем экстракт обрабатывался по протоколу набора реагентов Qiagen Qiamr DNA (Qiagen, Нидерланды) согласно инструкции производителя.

Селекцию фрагментов нужной длины проводили с использованием набора реактивов AMPure beads (Beckman Coulter, США) согласно инструкции производителя.

Полученную из эмульсии кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с заглубленными праймерами. Продукт амплификации анализировали с помощью гель-электрофореза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики синтеза олигонуклеотидной последовательности

Для решения задач исследования необходимо было синтезировать олигонуклеотидную последовательность, которая закреплена с 5'-конца на частице, а ее 3'-конец находится в растворе. Для реализации этой задачи были использованы «обратные» 5'-фосфорамидиты, обладающие пониженной степенью конденсации к цепи за счет своей слабой нуклеофильной активности. Для этого была разработана методика синтеза олигонуклеотидной последовательности с увеличением времени конденсации присоединяемого фосфорамидита.

В ходе синтеза выполнялась последовательная подача реагентов и было увеличено время конденсации для обеспечения полного прохождения реакции на каждой из стадий, включающих детритилирование, активацию, присоединение активированного фосфорамидита, кэпирование и окисление. После чего, цикл повторялся заново.

Для удаления защитных групп с азотистых оснований и цианоэтильной защиты частицы с синтезированными ОН последовательностями обрабатывали раствором АМА (1:1 раствор метиламина/раствор аммиака) и выдерживали при 65°C в течение 25 мин.

Устранение пространственного фактора, приводящего к снижению активности ферментов при амплификации и синтезе кДНК методом обратной транскрипции

В процессе амплификации или обратной транскрипции происходит многократное избирательное копирование определённого участка нуклеиновой кислоты в искусственных условиях *in vitro*. В обычных условиях эти реакции проводятся с растворенными олигонуклеотидами (праймерами) и образцом нуклеиновой кислоты, полученной из биоматериала.

В описанном в литературе методе используются баркодированные ОН, ковалентно связанные с полистирольной поверхностью. Их помещают в эмульсию вместе с клетками и реагентами для лизиса и обратной транскрипции. В каждой

капле происходит праймирование мРНК клетки и синтез кДНК. После деструкции эмульсии наработанная кДНК выделяется вместе с частицами.

Однако, в попытке повторить опыт коллег, мы столкнулись с проблемой недостаточной наработки продукта синтеза кДНК. Вероятно, возникновение стерического фактора при плотной посадке ОН на поверхности частицы мешает эффективной работе ферментов. Полосы на электрофореграмме (рис. 1), соответствующие наработанной кДНК, не имели достаточной интенсивности, что свидетельствовало о неэффективном процессе. Было предположено, что из-за высокой концентрации синтезированного олигонуклеотида на поверхности частицы возникают пространственные ограничения, препятствующие воздействию ферментов. Дополнительно, достаточно крупный размер самой полимеразы, вероятно, не позволял нескольким ферментам одновременно занять соответствующее положение на комплексе (ДНК-РНК) и построить комплементарную мРНК последовательность.

Выход продукта синтеза кДНК был значительно повышен за счет модификации поверхности полистирола полиэтиленгликолиевым спейсером (ПЭГ, Spacer phosphoramidite 18, GlenResearch, США). Его вытянутая структура привела к удлинению последовательности и увеличению пространства между олигонуклеотидами.

Дополнительный положительный эффект оказало увеличение поли-dT участка с 7 до 18 нуклеотидов, таким образом смысловая часть была значительно удалена от поверхности частицы. Новая синтезированная последовательность выглядела следующим образом:

ПС частица – ПЭГ – Т(18) – GAGCTGGTACACGGCAGGGTC – 3'

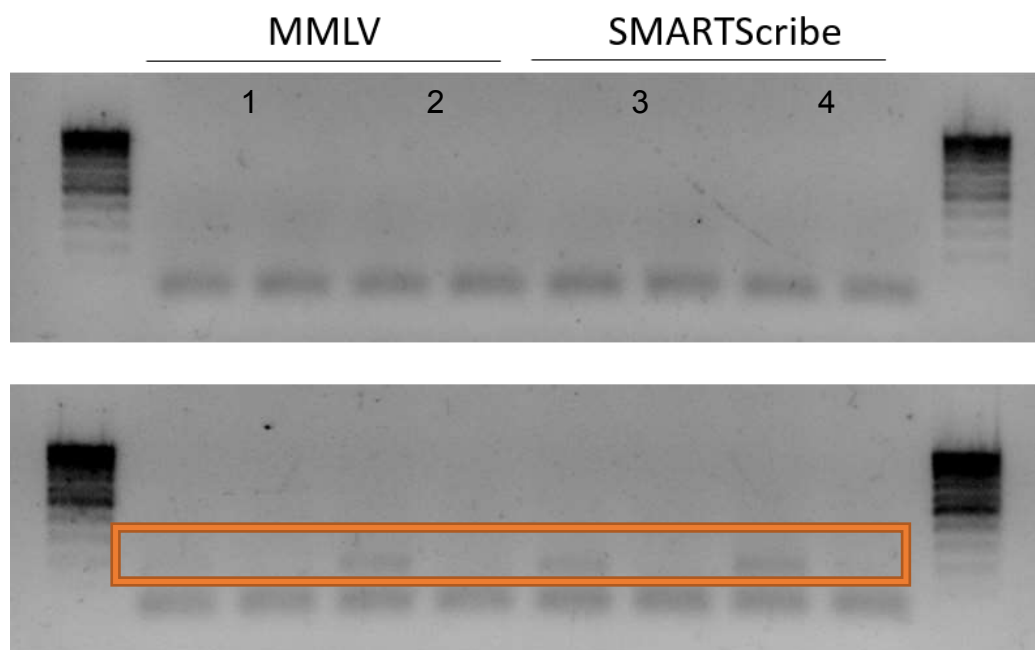


Рисунок 1 – Электрофореграммы продуктов синтеза кДНК, полученных с использованием двух видов частиц и ревертаз (MMLV и SMARTScribe): без ПЭГ спейсера (верхняя), с инкорпорированным ПЭГ спейсером (нижняя)

Эффективность полимеразы в новых условиях оценивали в сравнении с аналогичными частицами, на которых ПЭГ спейсер отсутствовал. В качестве образцов для проведения ОТ были взяты мРНК Т-клеток (рис. 1, позиции 1,3) и моноклеарных клеток периферической крови (рис. 1, позиции 2,4). Результативность синтеза кДНК с использованием MMLV и SMARTScribe ферментов оценивалась по интенсивности свечения продуктов амплификации на электрофореze. Нарботка продукта синтеза кДНК происходит при использовании обоих типов частиц, однако более интенсивные полосы на нижней электрофореграмме (Рис. 1, отмечены в рамке) соответствуют реакциям, в которых использовали частицы с ПЭГ-спейсером.

Таким образом, было доказано, что пространственный фактор, включающий высокую концентрацию олигонуклеотидов на частице и крупный размер ферментов, оказывает влияние на эффективность процесса ОТ мРНК. Применение ПЭГ-спейсера позволило устранить стерический фактор, снижающий активность полимеразы, и повысило выход продукта синтеза кДНК.

Создание баркодированной вставки в синтетическом олигонуклеотиде методом «split-and-pool»

Синтез баркодированной части ОН с использованием автоматического ДНК/РНК синтезатора (Polygen, Германия) проводился на экспериментальной последовательности:

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT**JJJ**GAGCTGGTACACGGCAGGGTC-3',

где J – вставка нуклеотида методом «split-and-pool».

Полученные последовательности ($4^3=64$) с тремя шагами рандомизации были заклонированы в вектор pGEM-T Easy (или pAL-2T), который содержит фрагмент гена резистентности к антибиотику, для дальнейшей трансформации в компетентные клетки XL1-Blue или DH5 α и посева в питательную среду с проведением бело-голубой селекции. ДНК колоний клеток, успешно трансформированных вектором, была секвенирована по методу Сэнгера.

Анализ прочитанных последовательностей показал, что баркод успешно формируется, однако эффективность встраивания нуклеозидов не одинакова. У всех 12 исследуемых колоний *E.coli* (заклонированных последовательностей) во втором положении баркода отсутствовал гуанин (таблица 1), что может быть связано как с низкой скоростью его присоединения в процессе синтеза, так и с ошибкой оператора и потерей части CPG при переносе или объединении содержимого реакторов.

Таблица 1 – Варианты последовательностей, содержащие 3-буквенную вставку баркода

№	Варианты 3-буквенного баркода	№	Варианты 3-буквенного баркода
1	TTA	7	GCG
2	GTC	8	ATC
3	CCA	9	CCC
4	GCA	10	TAG
5	GCC	11	GAT
6	CCC	12	TTT

Применение Photo-Cleavable-линкера для фоторелиза олигонуклеотидной последовательности

Было доказано, что наличие вышеописанного стерического фактора, возникающего при высокой концентрации ОН на поверхности частицы снижает активность ферментов. Встраивание РС-линкера между ОН и твердофазной поверхностью в процессе синтеза позволяет под УФ-излучением высвободить баркодированный олигонуклеотид в раствор.

Выбранный универсальный фотодеградируемый линкер на основе о-нитробензильной группы подходит для использования совместно с биологическими структурами, а процесс его деструкции приводит к образованию терминальных фосфатов (рис. 2), не оказывая негативного влияния на эффективность ферментов.

Фотолитическая деструкция линкера происходит за счет воздействия светового излучения определенных длин волн и не требует использования кислотного, щелочного или металлического активирования. Среди существующих методов реализации присоединенных молекул фотодеградация имеет несколько ключевых преимуществ, таких как возможности деструкции связей в конкретном месте, отказа от использования дополнительных реагентов и осуществления временного контроля процесса. С точки зрения окружающей среды данная технология является безопасной (*environmentally friendly*) и привлекательной в контексте «зеленой» химии. Умеренные условия проведения реакции перспективны для применения, например, в экспериментах биологического скрининга, где контаминация продуктами разрушения линкера является пагубной. Несмотря на то, что деструкция фоточувствительной группы, имеющей нитробензильный фрагмент, происходит при поглощении испускаемого света определенной длины волны, это не должно оказывать влияния на биополимеры и должно быть полностью безопасным для них.

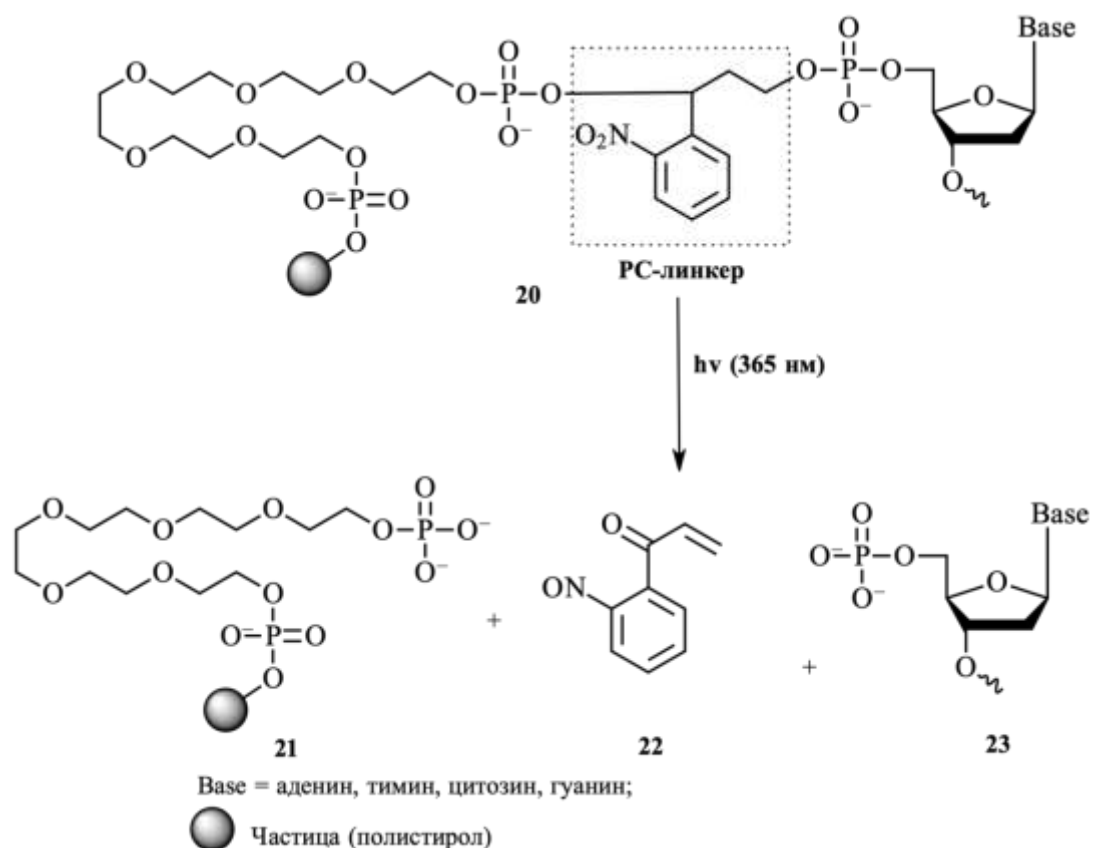


Рисунок 2 – Структура синтетического олигонуклеотида на твердофазном носителе. Фотолиз РС-линкера с образованием терминальных монофосфатов при УФ (365 нм)

Оценку скорости деградации РС-линкера проводили с помощью фиксации изменения оптической плотности раствора, которое происходило за счет увеличения концентрации высвобожденного ОН.

Было установлено, что РС-линкер полностью деградирует через 5 минут воздействия УФ излучения (365 нм), а концентрация высвобожденного ОН достигает максимума (рис. 3).

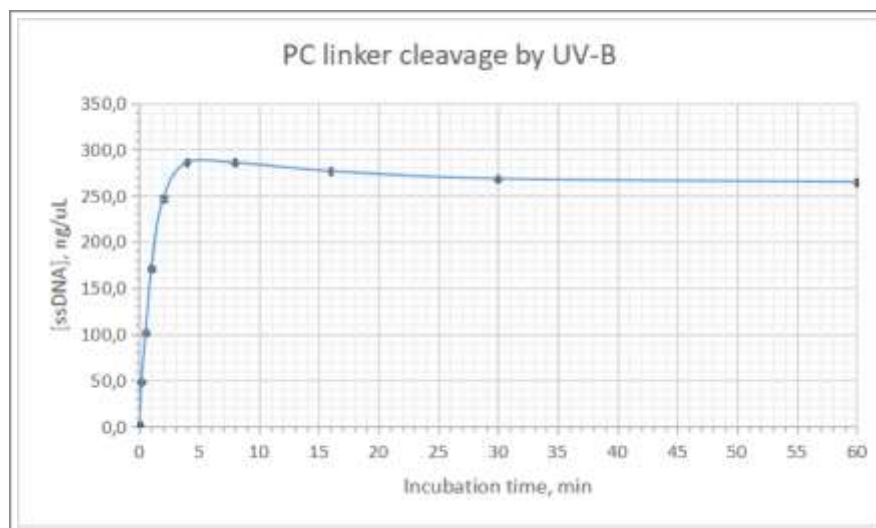


Рисунок 3 – Фотолиз РС-линкера. Зависимость концентрации высвободившегося олигонуклеотида от времени излучения УФ

Эффективность ОТ-ПЦР оценивали в серии параллельных реакций с сохранением связи синтезированного ОН с поверхностью частицы и с разрушением связи по месту встраивания фоточувствительной группы. При условии, что на каждом цикле ПЦР происходит 2-кратное увеличение количества мишени, по результатам эксперимента можно судить о более чем 100-кратном превышении исходного количества специфической мишени в реакции с РС-линкером (рис. 4).



Рисунок 4 – Электрофорез. Нарботка продукта синтеза кДНК единичной клетки с использованием 2 типов частиц: частицы с иммобилизованными баркодированными олигонуклеотидами (слева), частицы с баркодированными олигонуклеотидами со вставкой РС-линкера (справа).

Увеличение выхода продукта синтеза кДНК за счет повышения эффективности ОТ-ПЦР в каплях эмульсии является актуальным в контексте разработки отечественной технологии мечения мРНК единичных клеток на базе твердофазного олигонуклеотидного синтеза. Существующие коммерческие решения для анализа, например, репертуаров ТКР единичных Т-клеток или для анализа экспрессионного профиля единичных клеток имеют высокую стоимость. При этом, несмотря на свою цену, предлагаемые технологии не могут быть использованы для комплексного исследования функции Т-лимфоцитов в контексте их антигенной специфичности.

С практической точки зрения, использованные нами подходы существенно сократили себестоимость метода, а также привели к созданию технологии, которая может быть значительно дешевле зарубежных аналогов, оставаясь конкурентоспособной. Разработанная нами технология молекулярного баркодирования, совмещенная с эмульсионной ОТ-ПЦР, позволит вывести на новый уровень исследования функциональных особенностей иммунного ответа. Новые данные, полученные с применением высокоэффективного секвенирования, могут найти применение при разработке новых молекулярно-генетических подходов для диагностики иммунозависимых и онкологических заболеваний и оценки эффективности их терапии.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны дизайны и схемы реализации отечественной технологии подготовки библиотек для секвенирования мРНК единичных клеток с использованием твердофазного олигонуклеотидного синтеза и эмульсионной ПЦР. Описанная технология является высокоточной и удобной в применении и может быть рекомендована для использования как в исследовательских целях, так и в лабораторной практике.

2. Предложенная технология была успешно использована для анализа репертуара Т-клеточного рецептора, а также может применяться при изучении различных типов клеток.

3. В синтезе олигонуклеотидной последовательности на поверхности полистирольной частицы были применены «обратные» 5'-фосфорамидиты, позволяющие сформировать олигонуклеотид, закрепленный на поверхности частицы с 5'-конца, и имеющий свободную 3'-гидроксильную группу. Было показано, что ориентация последовательности в пространстве таким способом обеспечивает подход ревертазы к РНК в процессе синтеза кДНК.

4. Показано, что метод рандомизации подаваемых растворов фосфорамидитов в реакторы позволил осуществить формирование уникальной метки частицы, образуя баркод, и повысил численное разнообразие олигонуклеотидов, синтезируемых параллельно в одном реакторе.

5. Разработан подход для исключения пространственных факторов, которые оказывали негативный эффект на процесс синтеза кДНК, за счет инкорпорирования дополнительных линкерных молекул в структуру олигонуклеотида.

6. Разработан способ мечения мРНК клеток методом обратной транскрипции в эмульсии с использованием баркодированных олигонуклеотидов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи:

1. Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Якимова Е.Г., Белоусова М.В., Маерле А.В., Сергеев И.В., **Козлов И.Б.**, Донников А.Е., Кофиади И.А., Трофимов Д.Ю. Частота мутаций, ассоциированных с развитием наследственного гемохроматоза I типа, болезни Вильсона–Коновалова и семейной средиземноморской лихорадки, и особенности их распределения в русской популяции. Генетика. 2021, 57 (1): 95-102. DOI: 10.31857/S0016675821010021.
2. Khaitov M., Nikonova A., Shilovskiy I., Kozhikhova K., Kofiadi I., Vishnyakova L., Nikolskii A., Gattinger P., Kovchina V., Barvinskaia E., Yumashev K., Smirnov V., Maerle A., **Kozlov I.**, Shatilov A., Timofeeva A., Andreev S., Koloskova O., Kuznetsova N., Vasina D., Nikiforova M., Rybalkin S., Sergeev I., Trofimov D., Martynov A., Berzin I., Gushchin V., Kovalchuk A., Borisevich S., Valenta R., Khaitov R., Skvortsova V. Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation. Allergy. 2021; 76(9): 2840-2854. DOI: 10.1111/all.14850.
3. **Козлов И.Б.**, Лебедин М.Ю., Гудима Г.О., Сергеев И.В., Кофиади И.А. Фоторегулируемое отщепление олигонуклеотида как способ повышения эффективности полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией при анализе единичных клеток. Иммунология. 2021; 42 (6): 662-669. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-662-669>.
4. Булушева И.А., **Козлов И.Б.**, Митин А.Н., Коростин Д.О., Кофиади И.А. Алгоритм анализа данных NGS при оценке репертуаров Т-клеточных рецепторов, вовлеченных в противоопухолевый иммунный ответ. Иммунология. 2020; 41 (5): 400-410. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-400-410>.
5. **Козлов И.Б.**, Ватазин А.В., Кильдюшевский А.В., Зулькарнаев А.Б., Федулкина В.А., Фаенко А.П., Яздовский В.В., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Анализ экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного иммунного ответа, у реципиентов почечного трансплантата после ЭКФ. Иммунология. 2020; 41 (1): 20-30. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-20-30.

6. Мдинарадзе Д.С., **Козлов И.Б.**, Павлова К.С., Кофиади И.А., Курбачева О.М. Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *ADRB2* с ответом на β 2-агонисты у пациентов с редким тератипом бронхиальной астмы. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2020, (6). С. 32-38. DOI: 10.24075/VRGMU.2020.083.

Патенты:

1. Хаитов М.Р., Шиловский И.П., Кофиади И.А., Сергеев И.В., **Козлов И.Б.**, Смирнов В.В., Кожихова К.В., Колоскова О.О., Андреев С.М., Жернов Ю.В., Никонова А.А. Средство для ингибирования репликации вируса Sars-CoV-2, опосредованного РНК-интерференцией. Патент на изобретение RU 2733361 С1, 01.10.2020. Заявка № 2020123316 от 14.07.2020.