Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение
высшего профессионального образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

**РЕФЕРАТ**

по Информационно-коммуникационным технологиям в естественнонаучных исследованиях

Современные направления исследований в области получения и практического применения аптамеров

Преподаватель \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ И. Е. Суковатая

 подпись, дата

Студент БФ12-02М 041204091 \_\_\_\_\_\_\_\_\_ О.А.Зубкова

 подпись, дата

Красноярск 2012

Оглавление

[1 Обзор литературы 1](#_Toc341561846)

[1.1 Характеристика аптамеров 1](#_Toc341561847)

[1.2 Технология cell-SELEX 2](#_Toc341561848)

[1.3 Аптамеры в терапии онкологических заболеваний 3](#_Toc341561849)

[1.3.1 Селекция аптамеров к глиобластоме 4](#_Toc341561850)

[Список использованных источников: 5](#_Toc341561851)

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Характеристика аптамеров

Аптамеры – одноцепочечные последовательности РНК или ДНК, связывающиеся с молекулярными мишенями с высокой аффинностью и специфичностью. Аптамеры получают с помощью селекции in vitro, известной как SELEX (от англ. «systematic evolution of ligands by exponential enrichment» - «систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении»), впервые описанной двумя независимыми лабораториями в 1990 году. Способность аптамеров избирательно связываться с мишенями основана на уникальной третичной структуре, позволяющей им формировать стабильные специфичные комплексы с различными мишенями комплементарной формы. Аффинность аптамеров к мишеням очень высока, как правило, константа диссоциации находится в диапазоне от пМ до нМ [[[1]](#endnote-1);[[2]](#endnote-2)].

Свойства аптамеров, а именно высокая аффинность и специфичность, присущи и антителам, но аптамеры обладают преимуществами по сравнению с антителами. Аптамеры получают путем химического синтеза, что позволяет исследователям быстро синтезировать последовательности ДНК или РНК. Как синтетические молекулы они сохраняют сайт-специфичную модификацию, а также могут быть с легкостью помечены флуоресцентной меткой, биотином или радионуклидом. Для реализации терапевтических задач к аптамерам можно присоединять наночастицы, лекарственные молекулы или вирусы. В отличие от антител аптамеры остаются стабильными в широком диапазоне температур и условий хранения. Даже термически-денатурированные аптамеры могут восстановить свою первоначальную конформацию без потери аффинности после одного цикла «нагрев-охлаждение», в то время как антитела чувствительны к изменению температуры, и, как правило, денатурация их необратима. Кроме того, небольшой размер обеспечивает быстрое проникновение в органы и ткани, а низкая токсичность и иммуногенность – долгосрочный терапевтический эффект и безопасность. Эти уникальные биохимические свойства позволяют аптамерам стать эффективными средствами для диагностики и лечения различных заболеваний [;].

Так, на основе аптамеров к рецептору эпидермального фактора роста создан биочип для обнаружения циркулирующих раковых клеток в периферической крови человека [[[3]](#endnote-3)].

## 1.2 Технология cell-SELEX

Традиционно аптамеры подбираются к очищенному рекомбинантному белку. Преимуществом использования очищенного белка в качестве мишени является легкость достижения специфичности во время селекции. Однако если структура очищенного белка не соответствует таковой в нативном состоянии, то полученные таким образом аптамеры не узнают белок в его естественной конформации.

Для решения этой проблемы, была разработана технология селекции аптамеров к целым живым клеткам, названная cell-SELEX. При этом для cell-SELEX не требуется никакой предварительной информации о структуре белка, нет необходимости его очистки. Все молекулы на клеточной поверхности остаются в естественном окружении, сохраняя нативную структуру, обусловленную посттрансляционными модификациями, на протяжении всего процесса селекции. Таким образом, аптамеры, подобранные к целой клетке, способны связываться с мишенью, находящейся в нативной конформации непосредственно на клеточной поверхности [].

Методом cell-SELEX были созданы аптамеры к бактериям *Trypanosoma cruzi* [[[4]](#endnote-4)], *Salmonella enteritidis* [[[5]](#endnote-5)].

*T. cruzi* – опасный паразит человека, возбудитель болезни Шагаса. Бактерию можно обнаружить в крови, однако в хронической фазе заболевания количество паразитов снижается, и их обнаружение становится весьма проблематично. Аптамеры, подобранные к *T. cruzi*, характеризуются высоким сродством к мишени (Кд 8–25 нM) и эффективны при низкой концентрации бактерий (5 паразитов на 15 мл цельной крови) [].

Результатом другого исследования стало создание аптасенсора, чувствительного к бактериям *S. enteritidis*. Аптасенсор может обнаружить бактерии, даже если их концентрация в пробе составляет 600 КОЕ/мл-1 или 18 КОЕ в 30 мкл пробы. Помимо этого он в состоянии отличить *S. enteritidis* от других бактерий рода Salmonella, а также от *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Citrobacter f reundii*, поскольку все эти бактерии были выбраны в качестве мишеней для негативной селекции на этапе отбора аптамеров [].

## 1.3 Аптамеры в терапии онкологических заболеваний

Аптамеры, полученные методом cell-SELEX, способны специфично связываться с белками на клеточной поверхности, являющимися маркерами различных заболеваний. Они могут выступать как терапевтические агенты благодаря ингибирующему действию на белки – мишени, функции которых нарушены при онкологических заболеваниях. В качестве примера можно привести рецептор тирозинкиназы RET, мутации которого вызывают множественную эндокринную неоплазию (МЭН) II А и II В типов. С помощью технологии cell-SELEX были выбраны аптамеры к мутировавшей форме RET. Для позитивной селекции были выбраны клетки линии РС12 – производные феохромоцитомы, в избытке экспрессирующие мутантный внеклеточный домен рецептора RET, для негативной селекции – клетки PC12 и клетки РС12 с гиперэкспрессией того же домена, но дикого типа. После 15 раундов селекции были получены аптамеры не просто специфичные к мутантной форме RET, но и ингибирующие активность RET-опосредованного сигнального пути, что позволяет говорить о значительном потенциале данных аптамеров для терапии МЭН. Последними достижениями в этой области является создание противоопухолевых аптамеров к рецепторам тенасцин-С и TGF-β III типа.

Еще один пример успешного использования аптамеров в борьбе с раком – работа, в ходе которой были объединены два аптамера, связывающиеся с опухолевой клеткой и NK-клеткой (nature killer cell). Один из аптамеров подобран к CD16α, экспрессирующемуся NK-клетками, которрые играют ключевую роль в явлении антитело-зависимой цитотоксичности. Другой аптамер специфичен к рецептору фактора роста гепатоцитов (с-Met), в избытке экспрессирующемуся клетками многих типов рака. Аптамеры связываются олигонуклеотидным линкером в систему, которая может осуществлять цитотоксичную функцию и уничтожать опухолевые клетки [].

### 1.3.1 Селекция аптамеров к клеткам глиобластомы

Глиобластома – злокачественная опухоль головного мозга. Хотя частота заболеваемости этим типом рака невысока (1,35% от всех первичных раковых заболеваний в США), средняя продолжительность жизни после диагностирования составляет 12 месяцев, что делает глиобластому одним из самых агрессивных типов рака.

Селекция аптамеров проводилась с помощью технологии cell-SELEX, при этом отсутствовал этап негативной селекции. Несмотря на это специфичность выбранных аптамеров оказалась достаточно высока. Они оказались способны связываться не только с клетками глиобластомы линии A-172, к которым и проводилась селекция, но также к другим клеточным линиям этого типа опухоли. При этом степень связываемости с клетками других опухолей (легкого, эпителия, яичников и др) была низкой или связывания не наблюдалось вовсе.

При воздействии на клетки протеинкиназой К, связываемость аптамеров значительно снижалась, это позволяет утверждать с большой долей вероятности, что мишенями аптамеров являются белки на поверхности клетки или молекулы, ассоциированные с белками [[[6]](#endnote-6)].

В другой работе [[[7]](#endnote-7)] описывается методика доставки лекарственных препаратов к месту локализации глиомы. Наночастицы из полиэтиленгликоль-поли-ε-капролактона были покрыты аптамером GMT8 (специфичен к клеткам глиобластомы человека линии U87) с флуоресцентной меткой. В качестве модели лекарственного препарата для целевой доставки использовали доцетаксел - цитостатический препарат растительного происхождения из группы таксанов. Данная система (ApNP) продемонстрировала положительные результаты в экспериментах in vitro и in vivo (на мышиной модели): была показана способность частиц проникать внутрь опухолевого сфероида и индуцировать апоптоз клеток, а также достигать непосредственно участков головного, пораженных опухолью и ингибировать ее рост.

Таким образом, судя по последним литературным данным, аптамеры привлекают все большее внимание исследователей во всем мире. Перспективы их использования связаны с диагностикой и терапией различных заболеваний, в том числе и онкологических. В последнее время активно ведутся разработки по созданию аптасенсоров, которые позволили бы детектировать те или иные мишени (бактерии, вирусы, раковые клетки и т.д.) в крови или других физиологических жидкостях. Также аптамеры могут стать средством для целевой доставки лекарственных веществ, что особенно актуально в терапии заболеваний головного мозга, так как часто молекулы лекарств не могут самостоятельно преодолеть гематоэнцефалический барьер и проникнуть в мозг. Дальнейшие разработки в области получения и применения аптамеров позволят раскрыть все их потенциальные возможности в биологии, медицине и фармакологии.

# Список использованных источников:

1. Mao Ye. Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in

Molecular Medicine / Mao Ye, Jun Hu, Minyuan Peng, Jing Liu, Jun Liu, Huixia Liu, Xielan Zhao, Weihong Tan // International Journal of Molecular Sciences. 2012. № 13. С. 3341-3353. [↑](#endnote-ref-1)
2. Que-Gewirth N. S., Sullenger B. A. Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers // Gene Therapy. 2007. № 14. С. 283–291. [↑](#endnote-ref-2)
3. Lixue Wang. Detection of single tumor cell resistance with aptamer biochip / Lixue Wang, Qin Zheng, Quan'an Zhang, Hanfeng Xu, Jinlong Tong // Oncology Letters. 2012. № 4. С 935-940. [↑](#endnote-ref-3)
4. Nagarkatti R. Development of an Aptamer-Based Concentration Method for the Detection of Trypanosoma cruzi in Blood / Nagarkatti R., Bist V., Sun S., Debrabant A. // PLOS ONE. 2012. Т 7, № 8. 12 С. [↑](#endnote-ref-4)
5. Labib M. Aptamer-Based Impedimetric Sensor for Bacterial Typing / Labib M.,

Zamay A. S., Kolovskaya O. S., Reshetneva I. T., Zamay G. S. // Analytical chemistry. 2012. № 84. С. 8114−8117. [↑](#endnote-ref-5)
6. Abdullah Tahir Bayrac. In Vitro Selection of DNA Aptamers to Glioblastoma

Multiforme / Abdullah Tahir Bayrac, Kwame Sefah, Parag Parekh, Ceren Bayrac,

Basri Gulbakan, Huseyin Avni Oktem, Weihong Tan // Chemical Neuroscience. 2011. № 2. С. 175–181. [↑](#endnote-ref-6)
7. Gao H. Whole-cell SELEX aptamer-functionalised poly(ethyleneglycol)-

poly(ε-caprolactone) nanoparticles for enhanced targeted glioblastoma therapy / Huile Gao, Jun Qian, Zhi Yang, Zhiqing Pang, Zhangjie Xi, Shijie Cao, Yuchen Wang, Shuaiqi Pan, Shuang Zhang, Wei Wang, Xinguo Jiang, Qizhi Zhang // Biomaterials. 2012. № 33. С. 6264-6272. [↑](#endnote-ref-7)