

УДК 577.271.34

## НОВЫЙ СПОСОБ УДАЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ РНК ПРИ ОТБОРЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ МЕТОДОМ SELEX НА КЛЕТКАХ

© 2013 г. А. С. Давыдова<sup>1\*</sup>, М. А. Воробьева<sup>1</sup>, М. А. Зенкова<sup>1</sup>, В. Н. Сильников<sup>1</sup>,  
Ж.-С. François<sup>2</sup>, А. Г. Веньямина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, 630090

<sup>2</sup>Centre de Recherche Saint-Antoine INSERM–UPMC, UMR S 938 Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie,  
27 rue Chaligny, F-75571 Paris 12, France

Поступила в редакцию 24.05.2013 г.

Принята к печати 13.06.2013 г.

**Ключевые слова:** эскорт-аптамеры, SELEX, искусственные рибонуклеазы.

NEW CELL RNA ELIMINATION METHOD FOR CELL-BASED SELEX OF MODIFIED RNA  
APTAMERS, by A. S. Davydova<sup>1\*</sup>, M. A. Vorobjeva<sup>1</sup>, M. A. Zenkova<sup>1</sup>, V. N. Silnikov<sup>1</sup>, J.-C. François<sup>2</sup>,  
A. G. Venyamina<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian  
Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: anna.davydova@niboch.nsc.ru; <sup>2</sup>Centre de Re-  
cherche Saint-Antoine INSERM–UPMC, UMR S 938 Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, 27 rue  
Chaligny, F-75571 Paris 12, France).

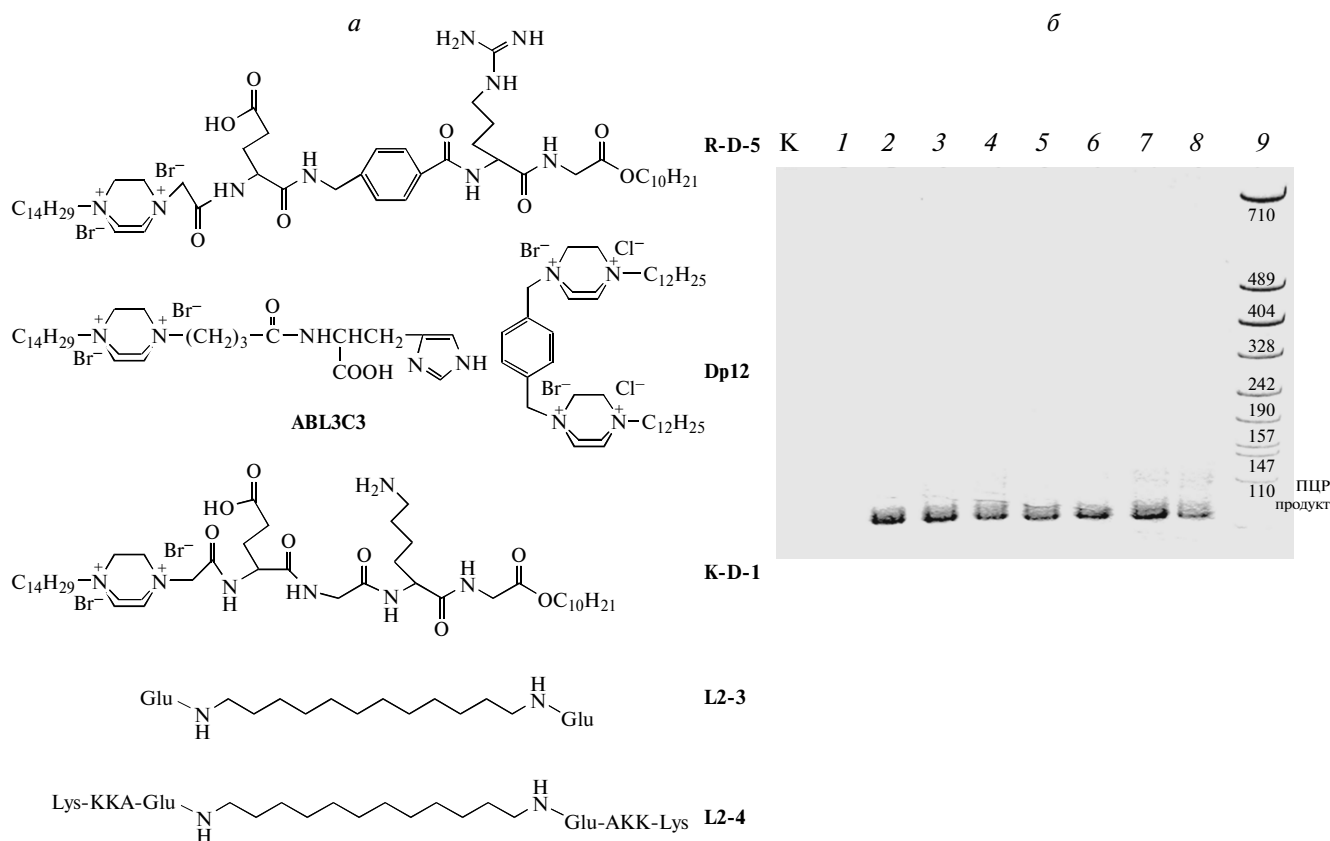
**Keywords:** escort aptamers, SELEX, artificial ribonucleases.

DOI: 10.7868/S0026898413060037

Аптамеры – синтетические одноцепочечные молекулы РНК или ДНК, способные с высокой специфичностью связывать молекулы-мишени за счет образования уникальной пространственной структуры. Для получения аптамеров используют метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [1], при этом мишенями для отбора могут быть различные объекты – от ионов металлов и малых органических молекул до белков и одноклеточных организмов. Большой интерес вызывают аптамеры, способные узнавать клетки определенного типа благодаря сродству к характерным для этих клеток поверхностным белкам. При получении таких аптамеров в качестве мишеней используют, как правило, живые клетки. Область применения таких эскорт-аптамеров – “адресная” доставка в клетки лекарственных препаратов, а также специфическая детекция клеток [2–4]. При отборе эскорт-аптамеров широко используют как ДНК-, так и РНК-библиотеки. К преимуществам РНК-аптамеров относится их способность формировать более разнообразные и стабильные третичные структуры, чем у ДНК-аптамеров, однако, для увеличения их биологической стабильности необходимы дополнительные

химические модификации. Так, пиримидиновые нуклеозиды в составе эскорт-РНК-аптамеров часто заменяют 2'-модифицированными аналогами, как правило, 2'-фтор- или 2'-аминонуклеозидами [5]. Общая схема отбора 2'-модифицированных РНК-аптамеров методом SELEX на клетках состоит из следующих стадий: 1) инкубирование РНК-библиотеки с клетками-мишенями, 2) удаление не связавшихся с клетками олигонуклеотидов, 3) разрушение клеток, выделение суммарной РНК и отделение пула аптамеров от суммарной клеточной РНК, 4) ОТ-ПЦР и T7 РНК-транскрипция для получения обогащенной РНК-библиотеки [6]. Стандартный метод отделения 2'-модифицированных РНК-аптамеров от суммарной клеточной РНК заключается в обработке смеси рибонуклеазой А, что приводит к расщеплению всех РНК, кроме устойчивых к рибонуклеазе аптамеров (см., например, [7]). Обычно для удаления фермента используется фенол-хлороформная экстракция – процедура, которая не исключает возможности загрязнения образца следовыми количествами фермента и растворителей, а также зачастую приводит к потере части обогащенной РНК-библиотеки. В данной работе нами предложен альтер-

\* Эл. почта: anna.davydova@niboch.nsc.ru



**Рис. 1.** Расщепление суммарной клеточной РНК искусственными рибонуклеазами в модельной системе. *a* – Структуры искусственных рибонуклеаз. *б* – ОТ-ПЦР после расщепления суммарной клеточной РНК рибонуклеазой А (1) и смеси суммарной клеточной РНК и 2'-фторпиримидинсодержащего модельного 71-звенного аптамера А10, расщепленной рибонуклеазой А (2) или искусственными рибонуклеазами: **ABL3C3**, 0.1 мМ (3), **Dp12**, 0.01 мМ (4), **K-D-1**, 0.1 мМ (5), **R-D-5**, 0.1 мМ (6), **L2-3**, 1 мМ (7), **L2-4**, 1 мМ (8); К – контрольная ПЦР без кДНК; 9 – ДНК-маркер рBlueSK/MspI.

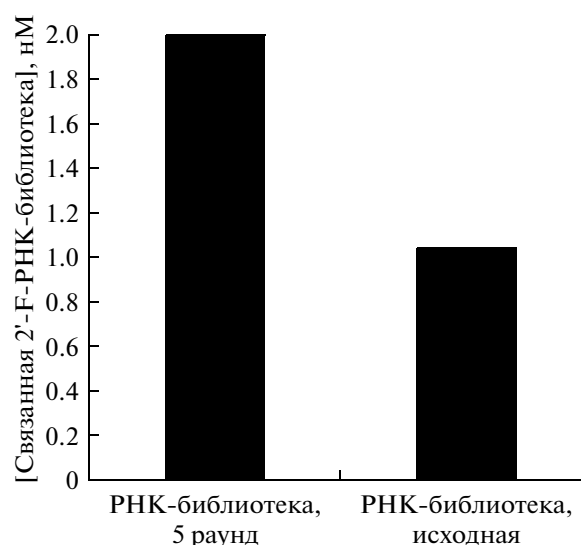
нативный метод выделения 2'-модифицированных РНК-аптамеров из смеси с суммарной клеточной РНК с использованием искусственных низкомолекулярных рибонуклеаз, имитирующих рибонуклеазу А [8, 9].

Нами сконструирована модельная система, состоящая из 71-звенного анти-ПСМА-аптамера А10 (ПСМА – простатспецифичный мембранный антиген), в котором все пиримидиновые нуклеотиды заменены на соответствующие 2'-F-аналоги [10], и суммарной клеточной РНК, выделенной из мышечных эмбриональных фибробластов, которые экспрессируют рецептор инсулиноподобного фактора роста человека I типа (IGF-IR) [11]. Для расщепления клеточной РНК использованы искусственные рибонуклеазы – аналоги рибонуклеазы А, представляющие собой небольшие органические молекулы, для которых ранее выявлена способность эффективно расщеплять РНК различной длины: производные диазабицикло[2.2.2]октана с различными заместителями (остаток имидазола, дипептиды) (**R-D-5**, **ABL3C3**, **Dp12**, **K-D-1**) [12, 13] и пептидоподобные соединения

(**L-2-3** и **L-2-4**) [14] (рис. 1а). Смесь суммарной клеточной РНК (0.1 мкг/мкл) и 2'-F-модифицированного аптамера А10 (3 мкМ) инкубировали в присутствии одной из искусственных рибонуклеаз в 50 мМ буфере Трис-НСl (рН 8.4 при 25°C), содержащем 0.2 мМ EDTA, при 60°C в течение 16 ч. Полученные реакционные смеси использовали для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Для получения кДНК реакционные смеси, содержащие РНК после обработки искусственными рибонуклеазами, ДНК-праймер (100 пмоль), 0.5 мМ dNTPs, 50 мМ Трис-НСl (рН 8.5 при 25°C), 8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 30 мМ KCl, 1 мМ DTT и 25 ед. обратной транскриптазы AMV ("Thermo scientific molecular biology", США), инкубировали 45 мин при 45°C, затем добавляли еще 25 ед. обратной транскриптазы AMV и инкубировали 45 мин при 45°C. Полученные кДНК использовали непосредственно для ПЦР без дополнительной очистки. ПЦР проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Трис-НСl (рН 8.3 при 25°C), 50 мМ KCl, 7.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ dNTPs, 2 мкМ праймеров,

кДНК и 2.5 ед. ДНК-полимеразы Taq (“Биосан”, Россия). ПЦР-продукты осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Показано, что обработка суммарной клеточной РНК искусственными рибонуклеазами приводит к ее расщеплению на короткие фрагменты, в то время как 2'-F-модифицированный аптамер в этих условиях остается устойчивым и может быть амплифицирован при помощи специфической ОТ-ПЦР. При обработке смеси суммарной клеточной РНК и модельного РНК-аптамера искусственной рибонуклеазой с последующей ОТ-ПЦР на электрофореграмме продуктов реакции (рис. 1б) во всех случаях присутствовала единственная полоса, соответствующая аптамеру А10. После обработки такой же смеси РНК рибонуклеазой А получен аналогичный продукт ОТ-ПЦР, что подтверждает возможность использования искусственных рибонуклеаз для отделения модифицированных аптамеров от клеточных РНК. Отметим, что оптимальная концентрация, необходимая для эффективного расщепления клеточной РНК, зависела от типа искусственной рибонуклеазы. Так, для пептидоподобных соединений **L-2-3** и **L-2-4** приходится использовать максимальную концентрацию (1 мМ), в то время как диазабициклооктановые производные расщепляли РНК в значительно более низких концентрациях, а для рибонуклеазы **Dp12**, содержащей два остатка 1.4-диазабицикло[2.2.2]октана, оптимальная концентрация составляла всего 10 мкМ. Учитывая коммерческую доступность и невысокую стоимость рибонуклеазы **Dp12** (“Нанотех-С”, Россия), в последующих экспериментах мы использовали именно это соединение.

Возможности разработанного метода продемонстрированы для селекции РНК-аптамеров на клетки с использованием 71-звенной 2'-F-модифицированной РНК-библиотеки с рандомизированным 40-звенным участком. В качестве мишеней использованы эмбриональные мышечные фибробласты, экспрессирующие человеческий белок IGF-IR. Для получения 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров исходную библиотеку инкубировали с клетками в течение 30 мин при 37°C, удаляли не связавшуюся с клетками РНК, после чего клетки лизировали и выделяли суммарную клеточную РНК вместе со связавшимися 2'-F-модифицированными РНК-аптамерами. Полученную смесь обрабатывали искусственной рибонуклеазой **Dp12**, как описано выше, РНК осаждали этанолом, растворяли в воде и использовали в реакциях ОТ-ПЦР с последующей транскрипцией *in vitro*. В результате 5 раундов SELEX на клетках получена обогащенная библиотека 2'-F-модифицированных РНК, обладающих более высоким сродством к клеткам-мишеням по сравнению с исходной библиотекой (рис. 2).



**Рис. 2.** Связывание 2'-F-содержащих РНК-библиотек, исходной и обогащенной, с эмбриональными мышечными фибробластами, экспрессирующими IGF-IR.

Таким образом, нами разработан новый эффективный метод выделения 2'-модифицированных РНК-аптамеров из смеси с суммарной клеточной РНК в ходе SELEX на клетках с использованием искусственных рибонуклеаз. Возможности метода продемонстрированы для 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров, способных связывать рецептор IGF-I человека на клеточной поверхности.

Работа поддержана грантом РФФИ №11-04-01014-а. Авторы благодарят к.х.н. М. И. Мещанинову (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) за предоставленные олигонуклеотиды и доктора Р. Басепра (Jefferson Cancer Institute, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA) за предоставленную клеточную линию эмбриональных мышечных фибробластов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. 2007. SELEX – a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **24**, 381–403.
2. Давыдова А.С., Воробьева М.А., Венямина А.Г. 2011. Эскорт-аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки. *Acta Naturae.* **3**, 13–31.
3. Wang J., Li G. 2011. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr. Med. Chem.* **18**, 4107–4116.
4. Zhou J., Rossi J.J. 2009. The therapeutic potential of cell-internalizing aptamers. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 1144–1157.
5. Mayer G. 2009. The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 2672–2689.

6. Cerchia L., Giangrande P.H., McNamara J.O., de Francis V. 2009. Cell-specific aptamers for targeted therapies. *Methods Mol. Biol.* **535**, 59–78.
7. Cerchia L., Esposito C.L., Jacobs A.H., Tavitian B., de Francis V. 2009. Differential SELEX in human glioma cell lines. *PLoS One.* **11**, e7971.
8. Niittymäki, T., and H. Lönnberg. 2006. Artificial ribonucleases. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 15–25.
9. Zenkova M.A. (Ed). 2004. *Artificial nucleases*. Berlin: Springer-Verlag.
10. Lupold S.E., Hicke B.J., Lin Y., Coffey D.S. 2002. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* **62**, 4029–4033.
11. Sell C., Dumenil G., Deveaud C., Miura M., Coppola D., DeAngelis T., Rubin R., Efstratiadis A., Baserga R. 1994. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3604–3612.
12. Тамкович Н.В., Зенков А.Н., Власов В.В., Зенкова М.А. 2010. Последовательность РНК определяет скорость ее расщепления искусственными рибонуклеазами. *Биоорг. химия.* **36**, 223–235.
13. Kovalev N., Burakova E., Silnikov V., Zenkova M., Vlassov V. 2006. Artificial ribonucleases: from combinatorial libraries to efficient catalysts of RNA cleavage. *Bioorg. Chem.* **34**, 274–286.
14. Koroleva L.S., Serpokylova I.Y., Vlassov V.V., Silnikov V.N. 2007. Design and synthesis of metal-free artificial ribonucleases. *Protein Pept. Lett.* **14**, 151–163.