



## Aptamery RNA jako potencjalne leki przeciwwirusowe

A. Tyczewska, M. Figlerowicz, T. Twardowski

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Aptamers RNA as potential antiviral drugs

#### Summary

SELEX is a method of the identification of high affinity aptamers for a surprising variety of molecular targets including nucleic acid binding proteins, non-nucleic acid binding proteins, as well as small organic molecules. The aptamers against enzymes involved in infectious, malignant diseases are still being discovered by the process of SELEX. This procedure might be a way of finding new drugs that specifically and effectively block viral replication, e.g. HIV.

#### Key words:

aptamer, HIV, SELEX.

### 1. Wstęp

Jednym z najciekawszych zagadnień będących w centrum zainteresowania badaczy z wielu laboratoriów na całym świecie jest praktyczne zastosowanie niskocząsteczkowych RNA w medycynie. W ostatnich latach wykazano, że oligorybonukleotydy mogą być wykorzystywane w terapii na kilka różnych sposobów. Na przykład jako oligonukleotydy antysensowe rozpoznające określone sekwencje nukleotydowe, wiążą się do nich i blokują odczyt kodonów mRNA podczas translacji lub tworzą struktury trójniciowe z genomowym DNA, przez co inhibowany jest proces transkrypcji. Oligorybonukleotydami są również rybozomy (cząsteczki RNA o właściwościach katalitycznych), które po związaniu się do odpowiedniej nici mRNA powodują jej degradację (1). Kolejnym przykładem praktycznego zastosowania RNA w medycynie są aptamery.

#### Adres do korespondencji

Marek Figlerowicz,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań;  
e-mail:  
marekf@ibch.poznan.pl

Określenie aptamer pochodzi od łacińskiego słowa „aptus” – co oznacza „pasować”. Aptamerami nazwano krótkie fragmenty kwasów nukleinowych lub białek, które wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania ze ściśle określonymi biomolekułami.

Aptamery RNA są bardzo obiecującym narzędziem w walce z chorobami tak powszechnymi jak wirusowe, nowotworowe, autoimmunizacyjne czy układu krążenia. Mogą one pełnić rolę inhibitorów białek, których funkcją jest rozpoznawanie i oddziaływanie z kwasami nukleinowymi (np. polimeraz wirusowych) jak i białek, które w warunkach fizjologicznych z RNA nie oddziałują. Aptamery mogą również pełnić rolę ligandów RNA wiążących inne molekuly, takie jak aminokwasy, nukleotydy, antybiotyki, czy witaminy.

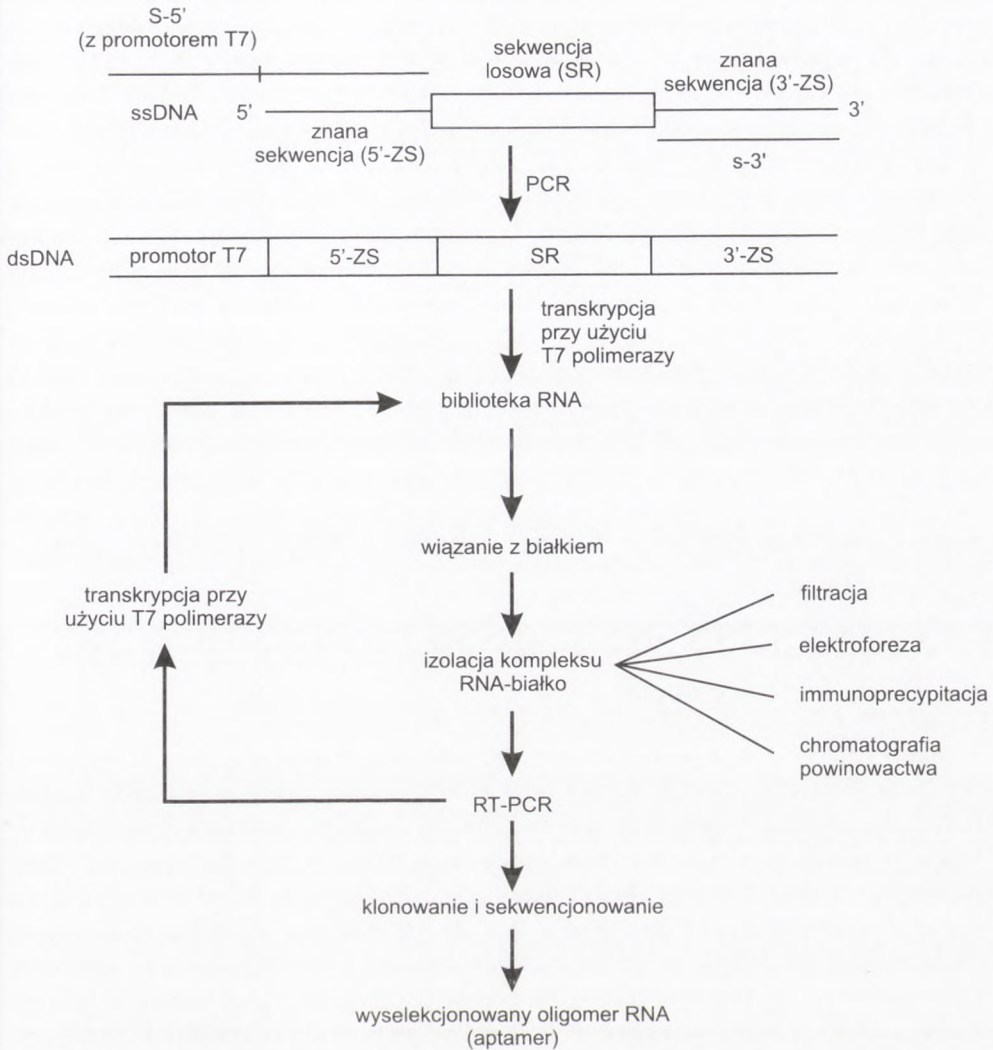
Specyficzność i selektywność interakcji pomiędzy aptamerami a wiązany przez nie cząsteczkami, pozwala sądzić, że będą one powodowały mniej efektów ubocznych niż obecnie stosowane leki, przykładowo wykorzystywane w terapii przeciwwirusowej analogi nukleozydowe. Najpowszechniej stosowaną metodą uzyskiwania aptamerów oligorybonukleotydowych jest ich selekcja w warunkach *in vitro* (SELEX, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Charakteryzujące się specyficznymi właściwościami molekuly – krótkie cząsteczki RNA izoluje się z tzw. kombinatorycznych bibliotek RNA. Pod tym pojęciem kryje się zbiór wszystkich możliwych do zsyntetyzowania oligorybonukleotydów o określonej długości *n*.

## 2. SELEX jako metoda uzyskiwania specyficznych aptamerów

Strukturalna różnorodność cząsteczek tworzących biblioteki kombinatoryczne jednoniciowego RNA stwarza możliwość selekcji oligorybonukleotydów, które wiążą określone molekuly z wysokim powinowactwem i specyficznością. W tym celu stosowana jest metoda SELEX, w której wyróżnić można trzy podstawowe etapy:

- 1) utworzenie biblioteki kombinatorycznej oligorybonukleotydów,
- 2) selekcja oligorybonukleotydów specyficznie wiążących określone cząsteczki,
- 3) powielenie wyselekcjonowanych aptamerów.

Pulę oligorybonukleotydów (bibliotekę kombinatoryczną) uzyskuje się w dwóch etapach. Najpierw na drodze syntezy chemicznej otrzymywana jest biblioteka oligodeoksynukleotydów, które służą jako matryce do syntezy RNA metodą transkrypcji *in vitro* (rys.). Każdy oligonukleotyd zawiera fragment środkowy – o przypadkowej sekwencji nukleotydów (sekwencja losowa, *random sequence*) oraz flankujące odcinki o zaplanowanej sekwencji służące jako miejsce wiązania starterów. W każdej pozycji sekwencji losowej może występować jeden z czterech nukleotydów A, U, G lub C. W przypadku *n*-nukleotydowej cząsteczki daje to 4<sup>*n*</sup> możliwych kombinacji. Różnorodność puli wyjściowej oligonukleotydów uzyskuje się stosując w poszczególnych cyklach syntezy DNA równomolowe ilości każdego z czterech monomerów.



Rys. Schematyczny opis metody SELEX. W pierwszym etapie otrzymywana jest biblioteka kombinatoryczna jednoniciowych fragmentów DNA. Następnie w oparciu na uzyskanej bibliotece ssDNA otrzymywany jest dsDNA metodą PCR, stanowiący matrycę w reakcji transkrypcji z zastosowaniem starterów s-5' i s-3'. Otrzymaną pulę RNA wykorzystuje się w procesie selekcji – względem wybranej cechy, np. zdolności do wiązania z wybranym białkiem. W tym celu przeprowadza się hybrydizację RNA z białkiem, kompleks jest następnie poddawany ekstrakcji, a uzyskane w ten sposób aptamery (wiązące się fragmenty RNA) służą jako matryce do uzyskania dsDNA metodą odwrotnej transkrypcji. W ten sposób zakończony zostaje pierwszy etap selekcji. W kolejnym cyklu nowo otrzymany DNA zostaje wykorzystany jako matryca w reakcji transkrypcji do uzyskania zawężonej puli RNA. Po wykonaniu zaplanowanej liczby cykli selekcyjnych dsDNA zostaje wklonowany do plazmidów, namnażany w komórkach bakteryjnych, pojedyncze klonu poddawane są sekwencjonowaniu.

Istotą metody SELEX jest selekcja ligandów RNA, czyli wyodrębnienie z wyjściowej puli tych oligorybonukleotydów, które wykazują wysokie powinowactwo do cząsteczki, wobec której prowadzi się selekcję (cząsteczki docelowej – CD) i oddzielenie ich od pozostałych, które nie wiążą się z CD. Pula cząsteczek RNA jest mieszana z cząsteczką, dla której chce się otrzymać aptamery, a następnie niezwiązane oligonukleotydy zostają odseparowane i izolowany jest kompleks RNA – CD. Istnieje wiele metod selekcji takich kompleksów, na przykład poprzez chromatografię powinowactwa, elektroforezę, immunoprecypitację czy też filtrację na kolumnach. Zazwyczaj oligorybonukleotydy te są odseparowane od CD i wykorzystywane jako matryce do uzyskania dwuniciowego DNA (dsDNA) metodą RT-PCR. W ten sposób zakończony zostaje pierwszy cykl selekcji. W kolejnym cyklu nowo otrzymany dsDNA służy jako matryca w reakcji transkrypcji *in vitro*. W ten sposób otrzymana zostaje zawężona pula oligonukleotydów, która jest ponownie poddawana procesowi selekcji. Po przeprowadzeniu zaplanowanej liczby cykli selekcyjnych dsDNA wklonowywany jest do wektora, namnażany w komórkach bakteryjnych, po czym pojedyncze klony poddawane są sekwencjonowaniu. W ten sposób możliwe jest zidentyfikowanie oligonukleotydów najsilniej wiążących się z CD.

### 3. Selekcja aptamerów – przykładowe inhibitory białek lub ligandów RNA wiążących metabolity

Metoda SELEX jest wykorzystywana do selekcji aptamerów wobec różnych białek. Obiektem takich badań był na przykład komponent jądrowego spliceosomu U1A, który uczestniczy w splicingu pre-mRNA. Jest to białko należące do kompleksu U1 snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein complex*), który składa się z małych jądrowych RNA i białek. Pierwsze 96-100 aminokwasów U1A odpowiedzialnych jest za wiązanie struktury spinki do włosów II RNA U1 snRNP w kompleksie biorącym udział w splicingu. Tsai i wsp. (2) oraz Cox i wsp. (3) wyselekcjonowali aptamery właśnie wobec U1A. Wyjściową pulę (bibliotekę kombinatoryczną) stanowiły krótkie cząsteczki RNA, zawierające sekwencje losowe długości 30 (3) lub 10 i 13 nukleotydów (2). Tsai i wsp. (2) na podstawie swych doświadczeń określili m.in. specyficzność rozpoznawania sekwencji nukleotydowych przez białko U1 snRNP-A (U1 A). Cox i wsp. (3) wykorzystali metodę automatycznej selekcji przy użyciu aparatu Beckman-Coulter Biomek 2000, (4). Stwierdzili oni, że pośród aptamerów wyizolowanych po 6 rundach selekcji tylko 8% ma sekwencję, która wiązała się z U1A, natomiast po 12 rundach 79% aptamerów oddziaływało z U1A, a po 18 – aż 87%, a pozostałe 13% wykazywało tylko niewielkie różnice. Aptamery te wiązały się z cząsteczką docelową ze stałą wiązania –  $K_d = 11$  nM.

RNA wyselekcjonowane wobec białek mogą służyć do modyfikowania ich specyficznych funkcji. Ekspresja takich aptamerów w komórkach i całych organizmach daje możliwość wpływania na procesy zachodzące *in vivo*. Shi i wsp. (5) wykazali, że

białko B52 muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) może być specyficznie inhibowane *in vitro* i *in vivo* przez aptamery RNA. Hamowały one splicing pre-mRNA, stymulowany właśnie przez białko B52. Ponadto autorzy ukazali, że aptamery te ulegały ekspresji w kulturach komórkowych, jak i w całych organizmach.

Czasami wyselekcjonowane aptamery nie wykazują znaczącego wpływu na cząsteczki, wobec których zostały uzyskane. Dopiero połączenie ich z innymi molekułami powoduje, że nabierają właściwości inhibujących. Tak się stało w przypadku aptamerów wyizolowanych przez Lina i wsp. (6) wobec elastazy neutrofilowej. Ludzka elastaza neutrofilowa (HNE) jest proteazą serynową, wydzielaną w odpowiedzi na działanie czynników zapalnych. W normalnych warunkach enzym ten uczestniczy w degradacji i fagocytozie bakterii chorobotwórczych, natomiast jego nadmiar związany jest z wieloma chorobami, np. mukowiscydozą. Naukowcy wyselekcjonowali aptamery DNA wobec tego właśnie enzymu. Stwierdzili, że same aptamery nie hamowały aktywności enzymatycznej HNE. Po przyłączeniu tetrapeptydu N-metoksy-sukcynylo-Ala-Ala-Pro-Val (jest on słabym inhibitorem HNE) do DNA, zaobserwowano pięciokrotne zwiększenie inhibicji elastazy. Aby znaleźć efektywny inhibitor elastazy Smith i wsp. (7,8) zastosowali zmodyfikowaną metodę selekcji aptamerów. Do wyjściowej puli oligonukleotydów, których część środkową stanowiła sekwencja losowa, dodali oni oligonukleotyd związany kowalencyjnie z waliną. Ten ostatni był komplementarny do jednej z sekwencji flankujących wspólnego dla wszystkich oligonukleotydów tworzących bibliotekę kombinatoryczną. Tak wyizolowane aptamery wykazywały wysoką selektywność, poza tym stwierdzono, że były one stereospecyficzne, ponieważ silniejszym inhibitorem elastazy był izomer zawierający L-walinę ( $K_d = 20$  nM).

W jednym z pierwszych eksperymentów, w których zastosowana była metoda SELEX Tuerk i Gold (9), poszukiwali aptamerów specyficznych wobec polimerazy DNA bakteriofaga T4. Wyselekcjonowali dwa rodzaje aptamerów z puli około 65 536 różnych krótkich fragmentów RNA. Jeden z nich miał sekwencję identyczną do występującej w dzikim typie bakteriofagowego mRNA, drugi różnił się od poprzedniego w czterech pozycjach, stałe wiązania aptamerów do polimerazy były zbliżone, wynosiły około 32 nM.

Przeprowadzono również szereg badań nad selekcją aptamerów wobec małych molekuł takich, jak aminokwasy, nukleotydy i ich pochodne, biologiczne kofaktory czy antybiotyki. Stwierdzono, że biologicznie aktywne cząsteczki RNA mogą łączyć się z najróżniejszymi molekułami, np. interakcje z pseudowusacharydowymi antybiotykami mogą prowadzić do inhibicji procesu translacji, splicingu czy reakcji cięcia łańcucha RNA katalizowanej przez rybozomy. Większość antybiotyków hamuje funkcje RNA, ale w pewnych konkretnych warunkach może je także stymulować. Efekt taki obserwowano w przypadku wiomycyny czy neomycyny B (10). W pracach nad antybiotykami selekcjonowano aptamery po to, by zrozumieć zasady wiązania i rozpoznawania RNA przez te cząsteczki. Wallis i wsp. (11) izolowali aptamery wobec wiomycyny, Wallace i wsp. (12) wobec streptomycyny, a Burke i wsp. (13) wobec chloramfenikolu.

Kolejnym celem doświadczeń stało się znalezienie motywów, które pozwalają na przenoszenie znacznika fluorescencyjnego do transkryptów RNA. W ten sposób możliwa byłaby detekcja transkryptów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Holeman i wsp. (14) wyizolowali aptamery RNA, które rozpoznają fluorofor sulforodaminę B, a Werstuck i Green (15) wykazali, że aptamery, które wiążą się specyficznie z małymi molekułami mogą być wykorzystane do kontroli ekspresji genów. Stwierdzili również, że aptamery wyselekcjonowane wobec tobramycyny i kanamycyny *A in vitro* wiążą się z nimi również *in vivo*.

#### 4. Selekcja aptamerów wiążących białka i genomowe RNA retrowirusów

Obecnie do największych problemów medycznych zaliczyć można zapobieganie oraz leczenie chorób wywoływanych przez wirusy, których genom zbudowany jest z RNA (wirusy RNA i retrowirusy). Niezwykła zmienność genetyczna tych wirusów sprawia, że jak dotąd nie udało się otrzymać leków umożliwiających skuteczną walkę z wywoływanymi przez nie infekcjami. Pewną konkurencją dla stosowanej powszechnie metody projektowania leków przeciwwirusowych może stać się w najbliższym czasie, jak się wydaje, ich selekcja *in vitro*. Nie wymaga ona znajomości struktury cząsteczki docelowej, czy długotrwałego testowania kolejnych wariantów cząsteczek inhibitorowych. Ponadto zastosowana w ostatnich latach robotyzacja wydatnie skraca czas selekcji, nawet do kilkunastu dni. Szczególnie duże zainteresowanie wzbudzają badania zmierzające do znalezienia aptamerów hamujących replikację wirusa HIV.

Odwrotna transkryptaza wirusa HIV jest enzymem, który ma zasadnicze znaczenie w replikacji genomu wirusowego. Katalizuje ona przemianę ssRNA w prowirusowy dsDNA, który ulega integracji z genomem gospodarza. Enzym zbudowany jest z dwóch podjednostek: p66 i p51 oraz posiada dwie aktywności: polimerazową i RNazy H. Obie podjednostki są uzyskiwane z poliproteiny Gag-Pol. Najpierw cięcie poliproteiny uwalnia p66, z których tworzy się homodimer (p66/p66), następnie jedna z podjednostek homodimeru jest cięta przy C-końcu, w wyniku czego powstaje funkcjonalny heterodimer (p66/p51). Zarówno heterodimer, jak i homodimer wykazują aktywności polimerazy i RNazy H, podczas gdy sama podjednostka p51 nie jest aktywna, mimo że posiada całą sekwencję odwrotnej transkryptazy (16).

Jedne z pierwszych eksperymentów nad selekcją oligonukleotydów wobec odwrotnej transkryptazy wirusa HIV przeprowadzili Tuerk, McDougall i Gold (17). Z populacji cząsteczek RNA o przypadkowej sekwencji o długości 32 nukleotydów wyizolowali aptamery RNA o wysokiej specyficzności wobec odwrotnej transkryptazy (p66/p51) wirusa HIV-1. Autorzy doświadczenia przeprowadzili 9 rund selekcji, po analizach stwierdzili, że w wyizolowanych cząsteczkach występowały dwa charakterystyczne motywy pseudowęzła z konserwatywną i niekonserwatywną sekwencją. Badacze ci stwierdzili, że wiązały się one bardzo silnie do cząsteczki docelowej

( $K_d = 5$  nM). Drugim charakterystycznym motywem znalezionym w cząsteczkach wyselekcjonowanych była struktura spinki do włosów (*hairpin*). Jednakże okazało się, że wykazywała ona wysoką specyficzność wobec filtra nitrocelulozowego wykorzystywanego podczas procedury selekcji, a nie była specyficzna wobec odwrotnej transkryptazy. Autorzy porównali również zdolność inhibowania odwrotnej transkryptazy przez wyjściową pulę RNA i wyselekcjonowanych z niej aptamerów, okazało się, że te drugie znacznie obniżały aktywność polimerazową HIV-1 RT, natomiast nie wykazywały hamującego efektu na odwrotne transkryptazy innych wirusów.

Obok aptamerów RNA czasami izolowane są również aptamery DNA, na przykład w roku 1995 Schneider i wsp. (18), a Andreola i wsp. (19) w 2001 r., opisali metodę uzyskania aptamerów DNA specyficznych wobec HIV-1 RT. W obu pracach zastosowano metodę SELEX. Wcześniej opisano już selekcję aptamerów RNA, jednak fakt, że odwrotna transkryptaza może rozpoznawać także dupлекsy DNA zasugerował możliwość selekcji aptamerów DNA wobec tego enzymu. Przeprowadzono także analizy oddziaływania aptamerów z odwrotną transkryptazą (20). Autorzy doświadczenia stwierdzili, że aptamery RNA wykazują bardziej rozległe interakcje z odwrotną transkryptazą niż naturalne substraty czyli wirusowe RNA. Ponadto stwierdzili, że dupлекс DNA wchodzi w interakcje głównie z podjednostką p66 (z jej domenami określanymi terminami palców i kciuka), czyli w pobliżu miejsca aktywnego (polimerazowego) enzymu. Inhibujące RNA oddziałują także z podjednostką p51, wchodząc w bruzdę wiążącą kwas nukleinowy, podczas gdy kompleksy DNA/DNA znajdują się tylko na jej powierzchni. Autorzy potwierdzili wcześniejsze dane, że aptamery wyizolowane wobec HIV-1 RT tylko w nikłym stopniu inhibują inne odwrotne transkryptazy, nawet HIV-2 RT (wykazuje ona 60% identyczności z HIV-1 RT). Schneider i wsp. (18) uzyskali aptamery, które hamowały aktywność polimerazową HIV-1 RT przy bardzo niskich stężeniach, nie wpływały jednak na aktywność polimeraz innych retrowirusów. Autorzy artykułu opisali cały szereg różnych motywów ssDNA, które były zdolne do wiązania odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Białkiem, wobec którego Andreola i wsp. (19) selekcjonowali aptamery była część RNazowa odwrotnej transkryptazy. *In vitro* kilka cząsteczek hamuje RNazę H, są to m.in. sulfonowane polianiony i suramina. Do tej pory w literaturze opisano zaledwie kilka aptamerów uzyskanych wobec tej aktywności odwrotnej transkryptazy. Autorzy doświadczenia uzyskali i oczyścili dwie formy rekombinowanej HIV-1 RT, cząsteczkę p51-p51, która zawiera jedynie domenę polimerazową i kompletną cząsteczką heterodimerską p66-p51. Wykorzystanie tych molekuł doprowadziło do selekcji oligonukleotydów, które oddziaływały specyficznie z domeną RNazy H odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Uzyskane aptamery wiązały się silnie do heterodimeru (p66/p51), nie wykazywały natomiast powinowactwa wobec homodimeru (p51/p51). Autorzy stwierdzili, że wyizolowane aptamery bardzo silnie hamowały aktywność RNazy H wirusa HIV-1, nie miały natomiast wpływu na RNazę H pochodzącą z *E. coli*.

Większość badań nad selekcją aptamerów wobec białek wirusa HIV-1 przeprowadzana jest *in vitro*. Tylko nieliczne oligonukleotydy weszły już w fazę badań kli-

nicznych. W 2002 r. Chaloin i wsp. (21) oraz Joshi i wsp. (22) opublikowali artykuły, w których opisali działanie aptamerów *in vivo*. Autorzy wykazali antywirusowe działanie aptamerów RNA w liniach komórkowych limfocytów T. Chaloin i wsp. (21) określili stopień inhibicji namnażania wirusa przez aptamer RNA wyizolowany wobec odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, wynosił on w liniach komórkowych nawet do 95%. Natomiast Joshi i wsp. (22) wykorzystali wcześniej opisane w literaturze, przez Tuerka i Golda oraz Burke'a i wsp., aptamery RNA. Przetestowali oni zdolność ekspresji wewnątrzkomórkowej tych aptamerów (dostarczonych do kultury komórkowej z zastosowaniem technik transferu genów) oraz zdolność do hamowania replikacji wirusa HIV. Selektywność aptamerów RNA jest ściśle związana z ich strukturą trzyczłonową, w związku z tym sekwencje flankujące mogą zaburzać odpowiednie fałdowanie aptameru. Autorzy skonstruowali rybozomy działające w układzie *cis*, „uwalniające” właściwą sekwencję RNA i wykazali, że aptamery były bardzo efektywnym inhibitorem, działając na wczesnym etapie cyklu życiowego wirusa HIV. Udowodnili oni ich działanie na wirusy odporne na stosowane w terapii leki przeciwwirusowe, jak również na kilka subtypów wirusa HIV-1. Aplikacja aptamerów z zastosowaniem technik transferu genów jest zatem bardzo obiecującym i innowacyjnym podejściem w leczeniu infekcji powodowanych przez wirusa HIV-1. W związku z wysokim powinowactwem i wysoką specyficznością działania aptamerów, takie wewnątrzkomórkowe molekuly (nazwane „intramerami”, (23)) mogą stać się doskonałym narzędziem do inhibowania ścieżki transdukcji sygnałów, wzrostu komórek, transkrypcji, translacji, innych procesów wewnątrzkomórkowych bądź do badania oddziaływań RNA-białko *in vivo* (24).

Niektórzy badacze porównują mechanizm działania aptamerów do reakcji zachodzącej podczas procesu odpowiedzi immunologicznej. Stopień rozpoznania molekularnego uzyskiwany w kompleksach mała cząsteczka – aptamer może być wyższy niż podczas rozpoznania przeciwciała – antygen (24). Aptamer wyselekcjonowany wobec teofiliny odróżnia ją od kofeiny, pomimo faktu, że różnią się one obecnością tylko jednej grupy metylowej, poza tym rozpoznanie to zachodzi z 10-krotnie większą siłą niż w przypadku przeciwciała (25). W obu procesach (selekcja *in vitro* i odpowiedź immunologiczna) rozpoznanie zachodzi z wysoką specyficznością i powinowactwem. Xu i Ellington (26) przeanalizowali sekwencje i struktury, jakie tworzą aptamery uzyskane wobec krótkiego peptydu odpowiadającemu aminokwasom 34-50 białka Rev wirusa HIV-1. Na podstawie wyników doświadczeń zasugerowano, że aptamery, podobnie jak przeciwciała, mogą rozpoznawać specyficzne sekwencje epitopów. Przeciwciała często oddziałują z peptydowymi albo białkowymi ligandami poprzez mechanizmy dopasowania, stwierdzono jednak, że naturalne RNA również mogą wiązać się z cząsteczkami docelowymi poprzez wspomniane mechanizmy.

Obiektem badań Jensena i wsp. (27) stało się również białko Rev wirusa HIV. Do selekcji *in vitro* wykorzystali oni jednak fotoreaktywny chromofor 5-jodouracyd (5-IU) oraz bibliotekę RNA o losowej sekwencji nukleotydów. Po zadziałaniu światła



UV aptamery takie silnie wiążą się z docelowym białkiem. Autorzy sugerują, że taka modyfikacja metody SELEX stanowić może obiecujące narzędzie w dotychczasowo stosowanych technikach ewolucyjnych. Ta metodyka może również doprowadzić do wykorzystania małych molekuł (np. fragmentów kwasów nukleinowych) jako wysoce specyficznych inhibitorów hamujących rozwój różnych chorób *in vivo*.

Wielu badaczy wykorzystało metodę SELEX, by uzyskać aptamery wobec elementu TAR (*trans-activation responsive*) RNA wirusa HIV-1. Jest to sekwencja długości 59 nukleotydów (trzon z pętlą, znajdujący się na końcu 5' genomowego RNA) będąca czynnikiem krytycznym podczas transkrypcji ze zintegrowanego do genomu gospodarza wirusowego DNA. Po dziesięciu rundach selekcji, autorzy doświadczenia (28) uzyskali 61 aptamerów RNA, które następnie zsekwencjonowali. W 46 z nich znaleźli wspólny motyw – oktamer 5'-GUCCCAGA-3' stanowiący pętlę spinki do włosów. Sześć centralnych zasad jest komplementarna do pętli TAR, a trzon prawdopodobnie tylko stabilizuje strukturę aptameru, gwarantując prawidłowe rozpoznanie elementu TAR. Wyizolowane aptamery wiązały się bardzo silnie do cząsteczek, wobec których przeprowadzali selekcje,  $K_d = 20\text{-}50$  nM. Aptamery DNA z sekwencją komplementarną do TAR uzyskali również Boiziau i wsp. (29) (z puli oligonukleotydów o losowej sekwencji 30-nukleotydowej). Po 15 rundach selekcji uzyskali oni aptamery zawierające stały motyw 5'ACTCCCAT3'. Sześć środkowych nukleotydów jest komplementarna do pętli TAR, przez co możliwe jest tworzenie kompleksów aptamery DNA-TAR. Te obserwacje są zgodne z tymi, uzyskanymi przez Duconge i Toulme (28). Wartości  $K_d$  wahały się między 20 a 120 nM.

Integraza jest kolejnym białkiem wirusa HIV-1, wobec którego selekcjonowano aptamery metodą SELEX. Jest to białko, które katalizuje reakcję integracji wirusowego dsDNA do genomu gospodarza. Mazumder i wsp. (30) uzyskali aptamer, który może selektywnie hamować aktywność integrazy,  $K_d = 55$  nM. Autorzy stwierdzili, że za efekt hamujący odpowiedzialne są dwie tetrady G oraz nukleotydy znajdujące się w pętli. Ponadto obserwowali, że stopień inhibicji wzrastał, gdy w środowisku reakcji znajdowały się jony metali dwuwartościowych, tj.  $Mg^{2+}$  czy  $Mn^{2+}$ . Aptamer ten hamował zarówno cięcie oligonukleotydu, jak i przeniesienie nici, prawdopodobnie przez wiązanie się z domeną N-końcową enzymu (motywem palca cynkowego).

Wiele typów ludzkich papillomawirusów (HPVs) uczestniczy w indukcji różnych rodzajów raka. Wyselekcjonowanie aptamerów wobec istotnych dla cyklu życiowego wirusa białek, które hamują ich aktywność mogłoby stanowić pierwszy krok w kierunku wynalezienia leku zapobiegającemu rozwojowi chorób nowotworowych indukowanych przez te wirusy. Butz i wsp. (31) wyselekcjonowali aptamery wobec białka E6 HPV16, a w przeprowadzanych badaniach wykazali, że prowadzą one do apoptotycznej eliminacji komórek rakowych zakażonych tym wirusem. Pan i wsp. (32) wyizolowali aptamery RNA i ich analogi (odporne na działanie rybonukleazy), które neutralizują wirus RSV (*Rous sarcoma virus*). Jest to wirus ptasi, który należy do rodziny *Retroviridae*. W związku z brakiem przepuszczalności osłonki wirusa RSV, wyizolowane aptamery najprawdopodobniej blokowały infekcję poprzez wiązanie

do powierzchni wirusa, a nie poprzez wnikanie do wnętrza kapsydu, jednakże autorzy nie uzyskali jeszcze dokładnych danych na temat tego procesu.

## 5. Problemy związane z dostarczaniem oligonukleotydów do komórek

Zahamowanie działania określonych cząsteczek w komórkach jest możliwe, o ile aptamery mogą wnikać do komórek, są odporne na działanie enzymów nukleolitycznych i mogą oddziaływać z docelowymi cząsteczkami. Oligorybonukleotydy są odporne na działanie nukleaz, tylko wtedy gdy zawierają modyfikowane zasady. Najbardziej interesująca jest, jak się wydaje, modyfikacja otoczenia atomu fosforu w pozycjach niemostrkowych, tzn. zamiana jednego z dwóch atomów tlenu internukleotydowej grupy fosforanowej na atom siarki lub grupę metylową (tiofosforanowe lub metanofosfonianowe analogi oligonukleotydowe). Największym problemem technicznym stał się transport aptamerów tiofosforanowych do wybranych komórek docelowych. Z badań przeprowadzonych przy użyciu naturalnych oligonukleotydów tiofosforanowych wynika, że wnikają one do komórek i gromadzą się w cytoplazmie, zamknięte w pęcherzykach endosomalnych (33). Oligonukleotydy, jako względnie duże, obdarzone ładunkiem ujemnym molekuly nie są w stanie przenikać przez dwuwarstwę lipidową. Istnieje kilka metod pozwalających na wprowadzanie oligonukleotydów do wnętrza komórek, jedną z nich jest mikroiniekcja. Po mikroiniekcji obserwowano szybką migrację oligonukleotydów z cytoplazmy i skupienie wokół jądra. Inną metodą jest modyfikowanie ładunku oligonukleotydu, efekt taki można uzyskać poprzez sprzężenie ich z dodatnio naładowanymi makromolekułami, np. z polikationowym polipeptydem poli L-lizyną czy awidyną. Oligonukleotydy modyfikowano również w kierunku zwiększenia stopnia ich hydrofobowości w celu podwyższenia interakcji z błoną plazmatyczną (34). Stosowano w tym celu cholesterol lub alkohole z długimi łańcuchami alifatycznymi. Aby zwiększyć efektywność wnikania oligonukleotydów do komórek stosowano również liposomy. Leonetti i wsp. (35) oraz Thierry i wsp. (36) wykazali, że ta metoda znacznie zwiększa stopień wnikania oligonukleotydów do komórek, jak również chroni je przed niekorzystnym działaniem nukleaz. Zaobserwowano również zwiększenie efektywności transportu oligonukleotydów po przyłączeniu ich do lipofektyny (37). Jest to mieszanina dwóch kationowych lipidów: dwuoleinofosfatydyloetanolaminy (DOPE) i dwuoleiloxypropylotrójmetyloamonowego (DOTMA), jednak powyżej pewnego stężenia zarówno lipofektyna, jak i inne kationowe lipidy mogą wykazywać efekt cytotoksyczny (33).

## 6. Podsumowanie

Oddziaływania pomiędzy białkami a DNA i RNA są zasadniczym elementem w regulacji ekspresji genów. Okazuje się, że białka, których funkcją nie jest wiązanie

kwasów nukleinowych mogą je wiązać *in vivo* w sposób ważny biologicznie. Niektóre z nich biorą udział w procesie regulacji ekspresji genów, funkcja innych nie została jeszcze poznana. Dla większości białek można wyizolować ligandy RNA, które wiążą się do nich z nanomolowym powinowactwem, co jest istotne dla wywoływania odpowiedzi w warunkach fizjologicznych.

Oligonukleotydy uzyskiwane metodą SELEX są zazwyczaj krótkie, a wiążą się z cząsteczką (wobec której są izolowane) przez 10-15 nukleotydów, które najczęściej zlokalizowane są w strukturach wewnętrznych, takich jak pętle spinek do włosów, wybrzuszeniach, pętlach G, pseudowęzłach. Przeciętna wielkość domeny, z którą kontaktują się aptamery to 300-400 Å<sup>2</sup>. Jest to mniej więcej wielkość powierzchni rozpoznawania fragmentu Fab przeciwciał (38).

Selekcja metodą SELEX krótkich kwasów nukleinowych jest techniką, która pozwala na uzyskiwanie aptamerów wobec całego szeregu różnych cząsteczek biologicznie aktywnych, które są specyficznie rozpoznawane i bardzo silnie związane. Aptamery mogą modulować procesy komórkowe, jak również mogą służyć do wykrywania i lokalizacji białek. Ponadto, ponieważ metoda selekcji *in vitro* zapewnia uzyskanie w krótkim czasie cząsteczek, które mają unikatowe właściwości i mogą być stosowane w konkretnych schorzeniach technika ta zapewne będzie miała zastosowanie w wyszukiwaniu leków oraz jako narzędzie w medycynie molekularnej, biotechnologii i diagnostyce (24,39).

## Literatura

1. Krakowiak A., Koziolkiewicz M., (1998), *Postępy Biochemii*, 44(4), 306-317.
2. Tsai D. E., Harper D. S., Keene J. D., (1991), *NAR*, 19, 4931-4936.
3. Cox J. C., Hayhurst A., Hesselberth J., Bayer T. S., Georgiou G., Ellington A. D., (2002), *NAR*, 30, 20, 108-122.
4. Cox J. C., Rudolph P., Ellington A. D., (1998), *Biotechnolog. Prog.*, 14, 845-850.
5. Shi H., Hoffman B. E., Lis J. T., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10033-10038.
6. Lin Y., Padmapriya A., Morden K. M., Jayasena S. D., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11044-11048.
7. Smith D., Kirschenheuter G. P., Charlton J., Guidot D., Repine J., (1995), *Chem. Biol.*, 2, 741-750.
8. Charlton J., Kirschenheuter G. P., Smith D., (1997), *Biochemistry*, 36, 3018-3026.
9. Tuerk C., Gold L., (1990), *Science*, 240, 505-510.
10. Famulok M., (1999), *Curr. Opin. Mol. Biol.*, 9, 324-329.
11. Wallis M. G., Streicher B., Wank H., von Ahsen U., Clodi E., Wallace S. T., Famulok M., Schroeder R., (1997), *Chem. Biol.*, 4, 357-366.
12. Wallace S. T., Schroeder R., (1998), *RNA*, 4, 112-123.
13. Burke D. H., Hoffman D. C., Brown A., Hansen M., Pardi A., Gold L., (1997), *Chem. Biol.*, 4, 833-843.
14. Holeman L. A., Robinson S. L., Szostak J. W., Wilson C., (1998), *Fold. Des.*, 3, 423-431.
15. Werstuck G., Green M. R., (1998), *Science*, 282, 296-298.
16. Murphy B. R., Chanock R. M., (1996), *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., Ed. Luciw P. A., 60, 1881-1933, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
17. Tuerk C., MacDougal S., Gold L., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6988-6992.
18. Schneider D. J., Feigon J., Hostomsky Z., Gold L., (1995), *Biochemistry*, 34, 9599-9610.
19. Andreola M. L., Pileur F., Calmels C., Ventura M., Tarragao-Litvak L., Toulme J. J., Litvak S., (2001), *Biochemistry*, 40, 10087-10094.

20. Kensch O., Connolly B. A., Steinhoff H. J., McGregor A., Goody R., Restle T., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 24, 18271-18278.
21. Chaloin L., Lehmann M. J., Szczakiel G., Restle T., (2002), *NAR*, 30, 18, 4001-4008.
22. Joshi P., Prasad V., (2002), *Journal of Virology*, 76, 13, 6545-6557.
23. Blind M., Kolanus W., Famulok M., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3606-3610.
24. Famulok M., Gunter M., Blind M., (2000), *Acc. Chem. Res.*, 33, 591-599.
25. Jenison R. D., Gill S. C., Pardi A., Polisky B., (1994), *Science*, 263, 1425-1429.
26. Xu W., Ellington A. D., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7475-7480.
27. Jensen K. B., Atkinson B. L., Willis M. C., Koch T. H., Gold L., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V92, 12220-12224.
28. Duconge F., Toulme J. J., (1999), *RNA*, 5, 1605-1614.
29. Boiziau C., Dausse E., Yurchenko L., Toulme J. J., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 18, 12730-12737.
30. Mazumder A., Neamati N., Ojwang J. O., Sunder S., Rando R. F., Pommier Y., (1996), *Biochemistry*, 35, 13762-13771.
31. Butz K., Denk C., Ullmann A., Scheffner M., Hoppe-Seyler F., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12, 6693-6697.
32. Pan W., Craven R. C., Qiu Q., Wilson C. B., Willis J. W., Golovine S., Wang J. F., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11509-11513.
33. Koziolkiewicz M., (1998), *Postępy Biochemii*, 44(2), 125-133.
34. Łaski J., (1994), *Biotechnologia*, 4(27), 40-49.
35. Leonetti J. P., Machy P., Degols G., Lebleu B., Leserman L., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2448-2451.
36. Thierry A. R., Dritschilo A., (1992), *Nucl. Acids Res.*, 20, 5691-5698.
37. Coilge A., Sokolov B. P., Nugent P., Baserga R., Prockop D. J., (1993), *Biochemistry*, 32, 7-11.
38. Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M., (1995), *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 763-797.
39. Bacher J. M., Ellington A. D., (1998), *DDT*, 3, 6.