SELEX

Systematic **E**volution of **L**igands
by **EX**ponential enrichment

Tuerk C., Gold L.. Science (1990) v. 249, p. 505-510.
Ellington A.D., Szostak J.W. Nature (1990) v. 346, p. 818-822.

Схема метода

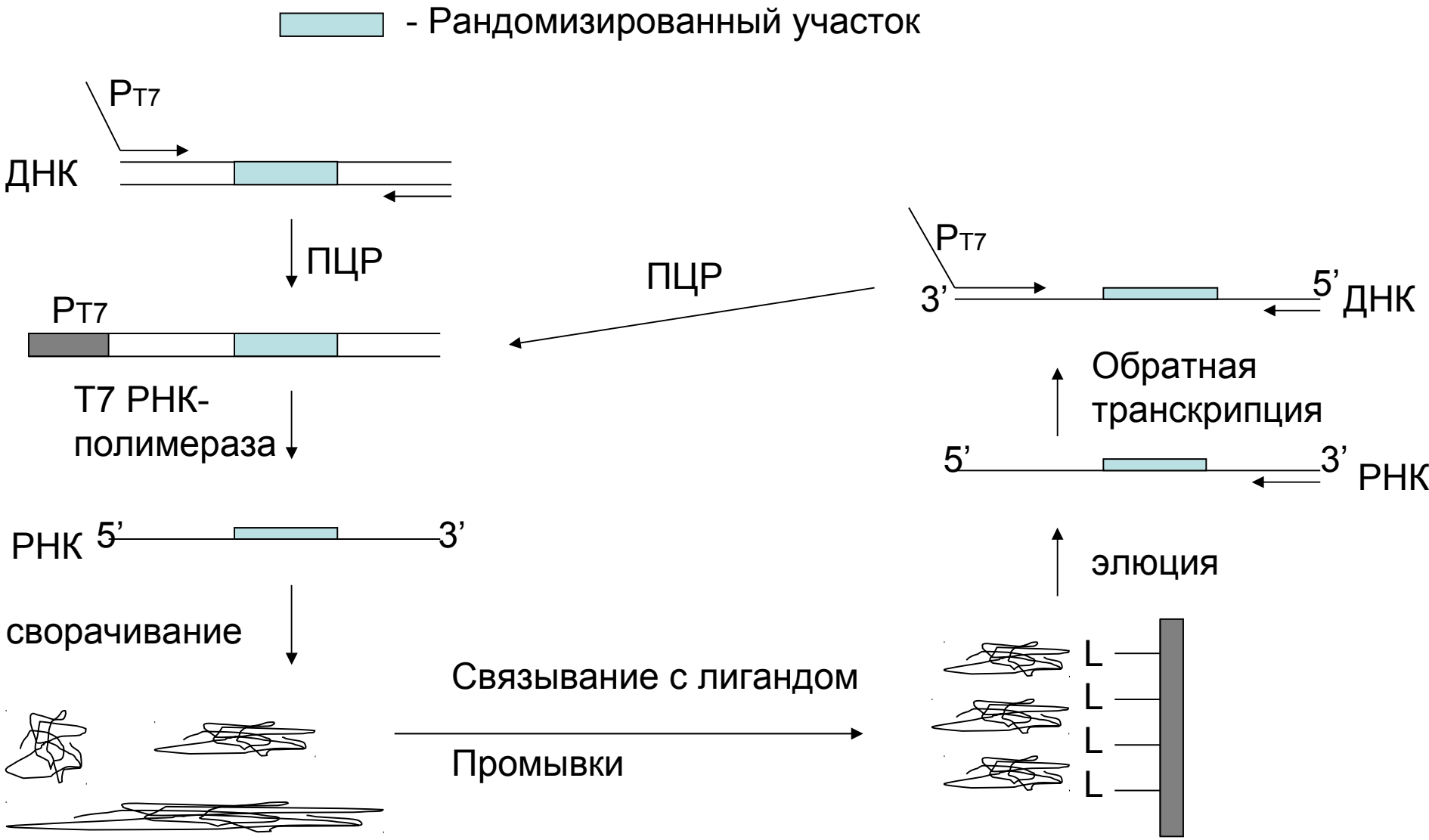


Схема эксперимента для получения РНК-аптамеров

aptus (лат) – подходящий, прилаженный

Синтез комбинаторной библиотеки ДНК:

Т7 промотор – линкер - рандомизированная последовательность - линкер

Циклы селекции:

- Т7 транскрипция (комбинаторная библиотека РНК);
- Связывание РНК с мишенью;
- Удаление несвязавшейся РНК;
- Элюция обогащенной фракции РНК;
- Синтез кДНК на обогащенной РНК;
- Получение ДНК для следующего цикла с помощью ПЦР.

Синтез комбинаторной библиотеки ДНК

Константные участки – связывание праймеров + Т7 промотор (+ сайты рестрикции).

- праймеры должны быть **эффективны** (отсутствие внутренней вторичной структуры) и **высокоселективны** (А -Т пары на 3’-концах);

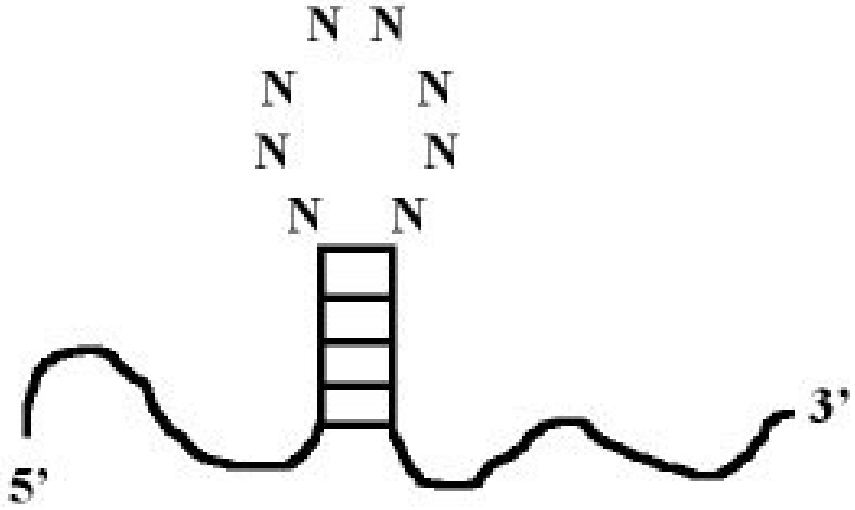
- **Рандомизированный участок (**варьирует его длина и степень рандомизации).
-

Рандомизированный участок

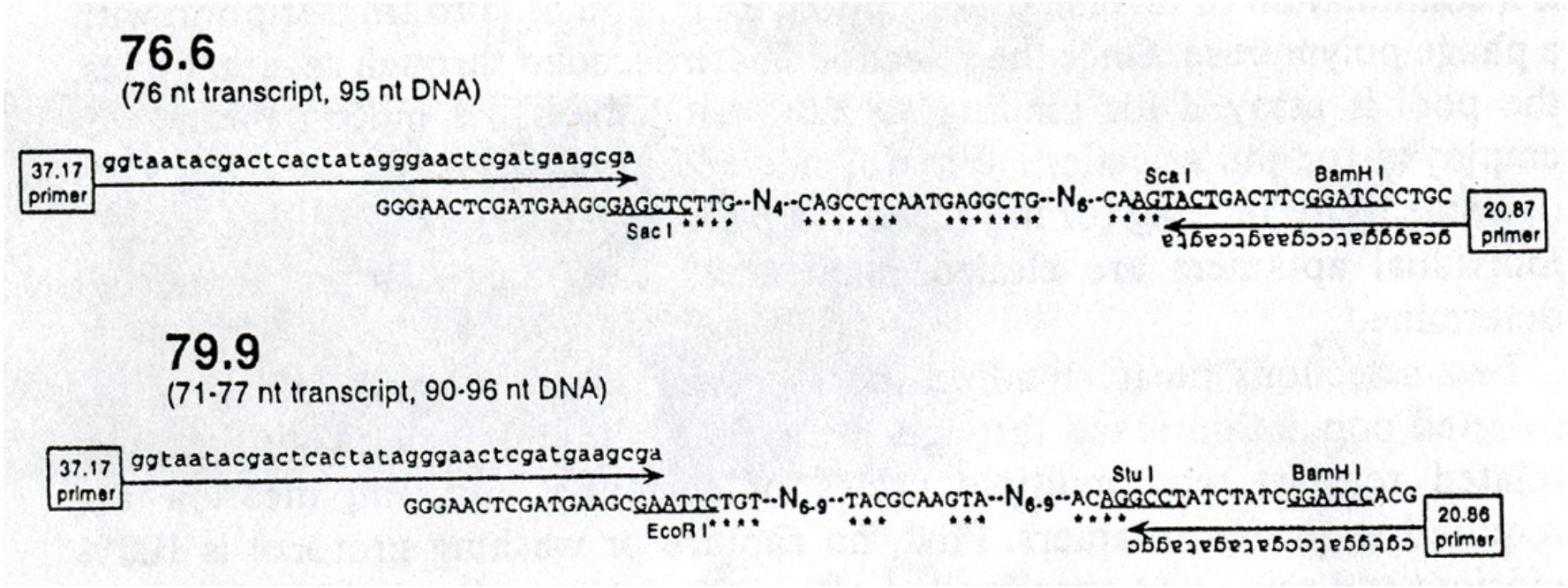
- Для достижения одинаковой вероятности встраивания каждого нуклеотида на каждой стадии конденсации вводится смесь A : C : G : T в соотношении 3:3:2:2;

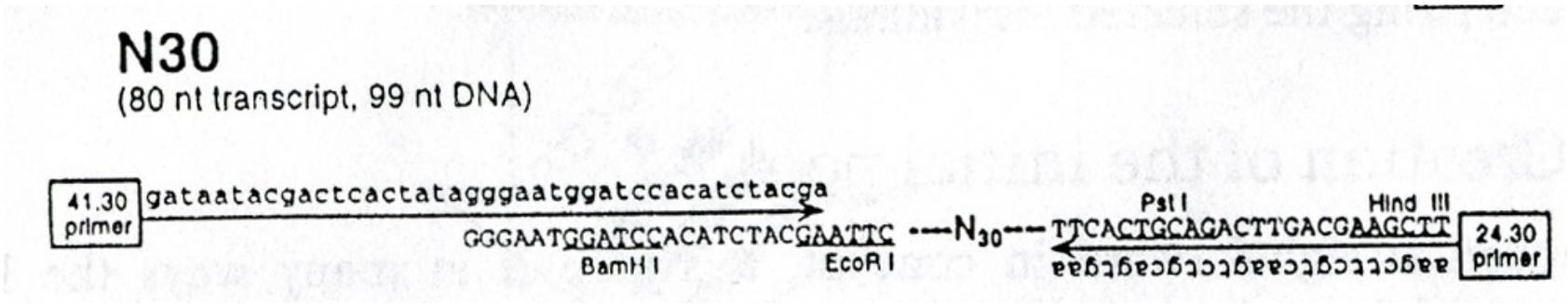
- Тонкая подгонка природной РНК к белку - вводят случайные мутации - например, природный G разбавляют 1-2% A, 1-2% C и 1-2% T – всего 3-5% мутаций на каждую позицию.

- Если есть данные, что белок взаимодействует с петлей шпильки, то рандомизируется петля (по последовательности и длине), а стебель шпильки синтезируется в виде константного участка.



Примеры библиотек





Амплификация комбинаторной библиотеки

- небольшое число циклов ПЦР (5-7)
- n<15-20 стандартная ПЦР (100 мкл)
- n>30 ПЦР в большом объеме (100 мл)
- (получают несколько мг ДНК)

- Реальная степень вырожденности библиотеки определяется не параметром n, а количеством ДНК, которая исходно берется для селекции.

Связь между степенью вырожденности библиотеки и длиной рандомизированного участка

- n<15-20 стандартная ПЦР (100 мкл)

- длина ДНК 100 нуклеотидных остатков (Mw 35 000 г)

- Если брать по одной молекуле ДНК каждого вида:

- N=20 1 000 000 000 000 вариантов (молекул) 0.04 мкг
- N=25 1 000 000 000 000 000 вариантов 35 мкг
- N=30 1 000 000 000 000 000 000 вариантов 35 мг

- n>30 ПЦР в большом объеме (100 мл)
- (получают несколько мг ДНК)

Синтез РНК или оц ДНК

- **РНК** – Т7 РНК полимераза (возможно вводить модифицированные нуклеотиды);

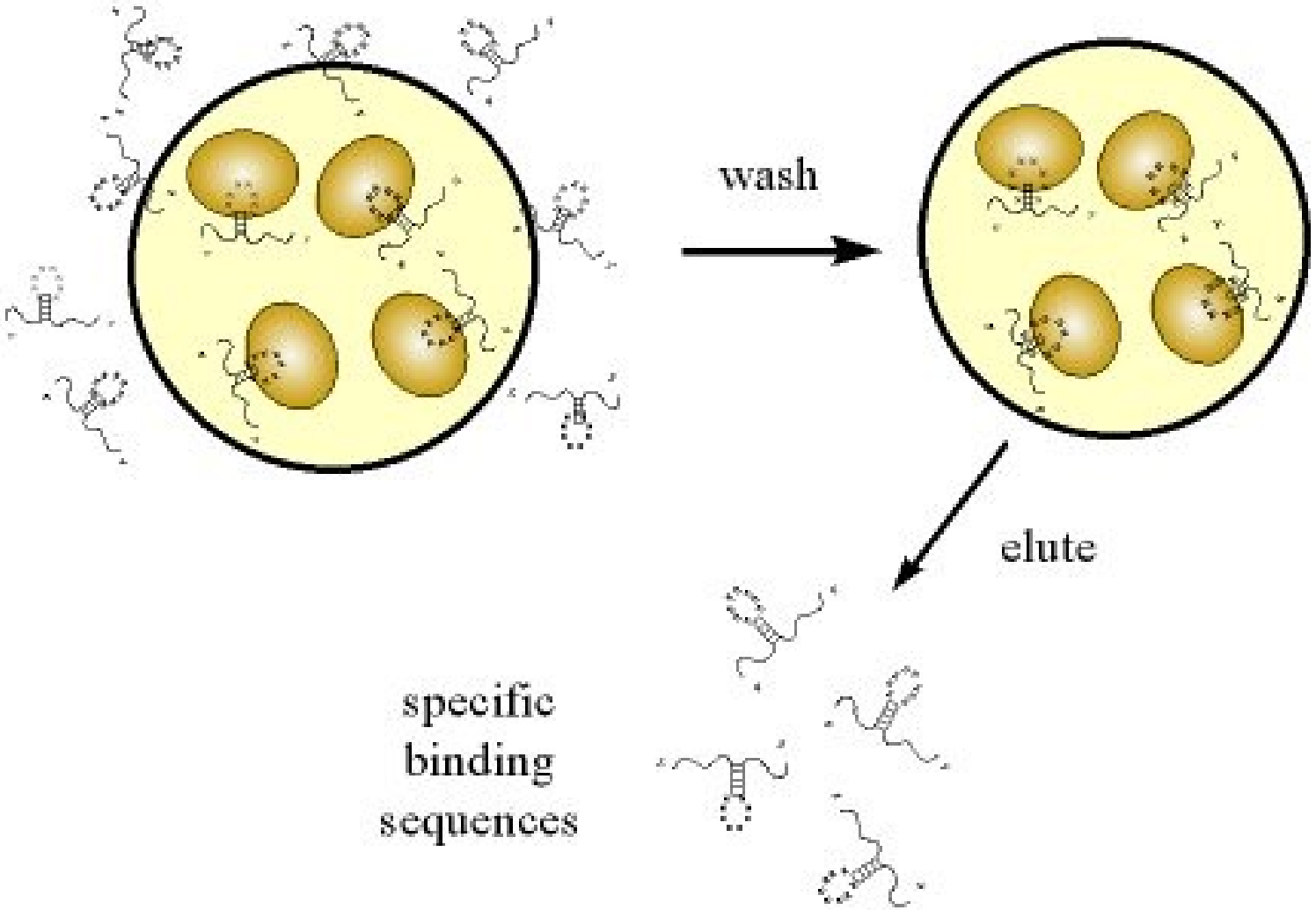
- **оцДНК** – асимметричная ПЦР;
- В один праймер на 3’-конец вводят рибонуклеотид, продукт ПЦР обрабатывают щелочью, чистят в агарозном геле;
- Один праймер коньюгируют с биотином, дц ДНК связывается с иммобилизованным на колонке авидином, не биотинилированную цепь (оцДНК) элюируют щелочью.

Методы селекции

- 1. Аффинная хроматография;
- 2. Фильтрование через нитроцеллюлозные фильтры;
- 3. Клетки – центрифугирование;
- 4. Иммунопреципитация;
- 5. Электрофоретическое отделение комплексов (“mobility shift”);
- 6. Сорбция в ячейках 96 луночного планшета.

- **Буфер**: близкий к рабочему буферу аптамера (PBS),
- (необходима ренатурация РНК в выбранном буфере);
- **Температура** (компромисс: денатурация белка – сильная структура аптамера);

Фильтрование через нитроцеллюлозные фильтры



Жесткость селекции (stringency)

- Первые 3 цикла – мягкие условия, затем постепенное усиление жесткости.

Циклы	**конц. мишени**	**отн. РНК / мишень**
1-3.	мкМ	низкое
4-8.	100 нМ	высокое
9-10.	10 нМ	высокое

- **Компетиторы:**
- Неспецифические – гепарин, тРНК;
- Специфические - известный лиганд, субстрат.
- (Пример: мишень – белок Rev HIV-1, компетиторы – RRE РНК и тРНК).

- **Время –** на первых циклах длительное, затем более короткое.

Амплификация

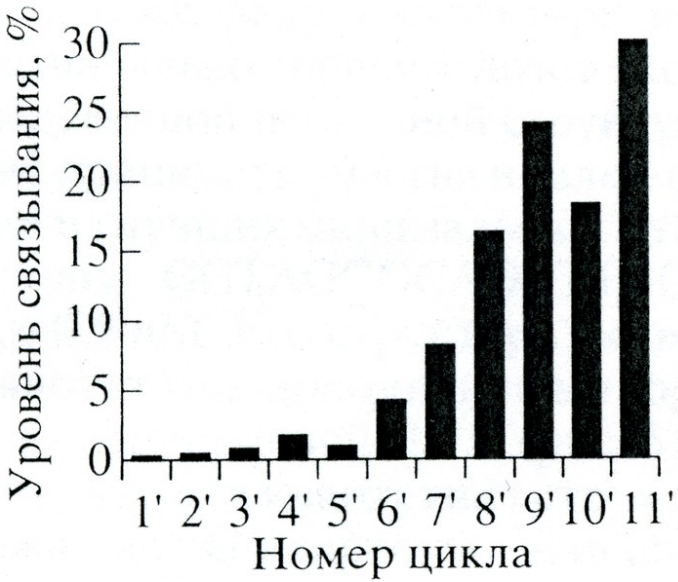
- ДНК – PCR
- РНК – RT PCR

- **Контроли** на “cross-contamination”: без матрицы, без обратной транскриптазы.

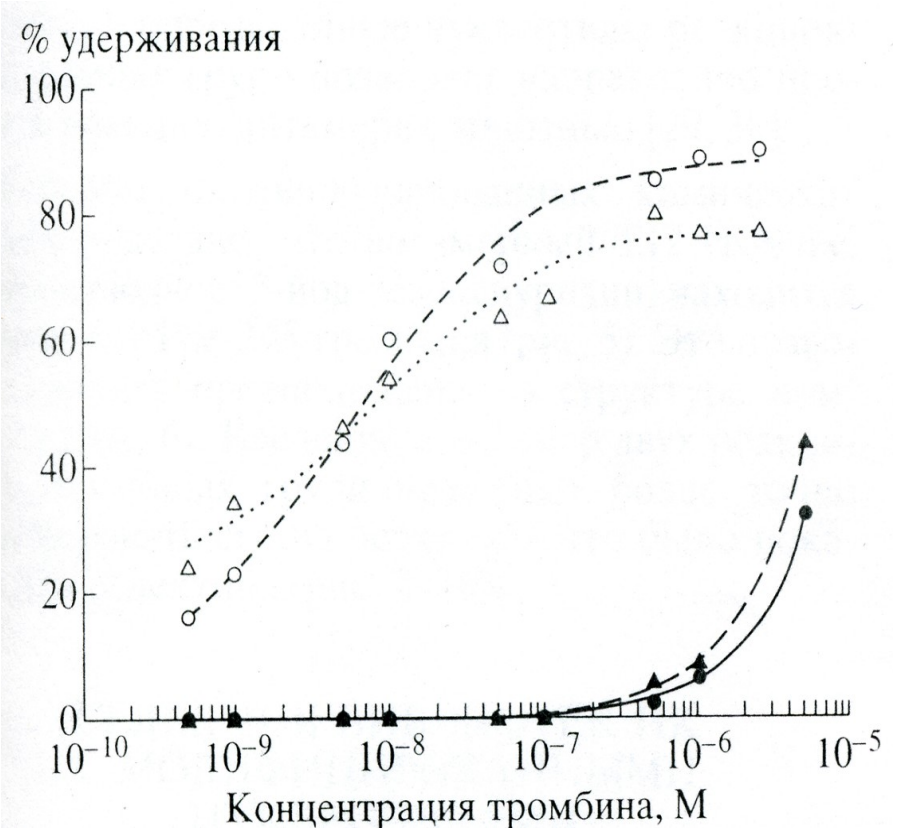
- Оценка оптимального числа циклов на аликвоте (иначе накопление артефактов ПЦР).

- Иногда лаборатория насыщена конкретным репликоном (появляется везде) – надо сменить библиотеку и праймеры.

Количество циклов селекции– когда следует остановиться?



Анализ связывания РНК с мишенью.



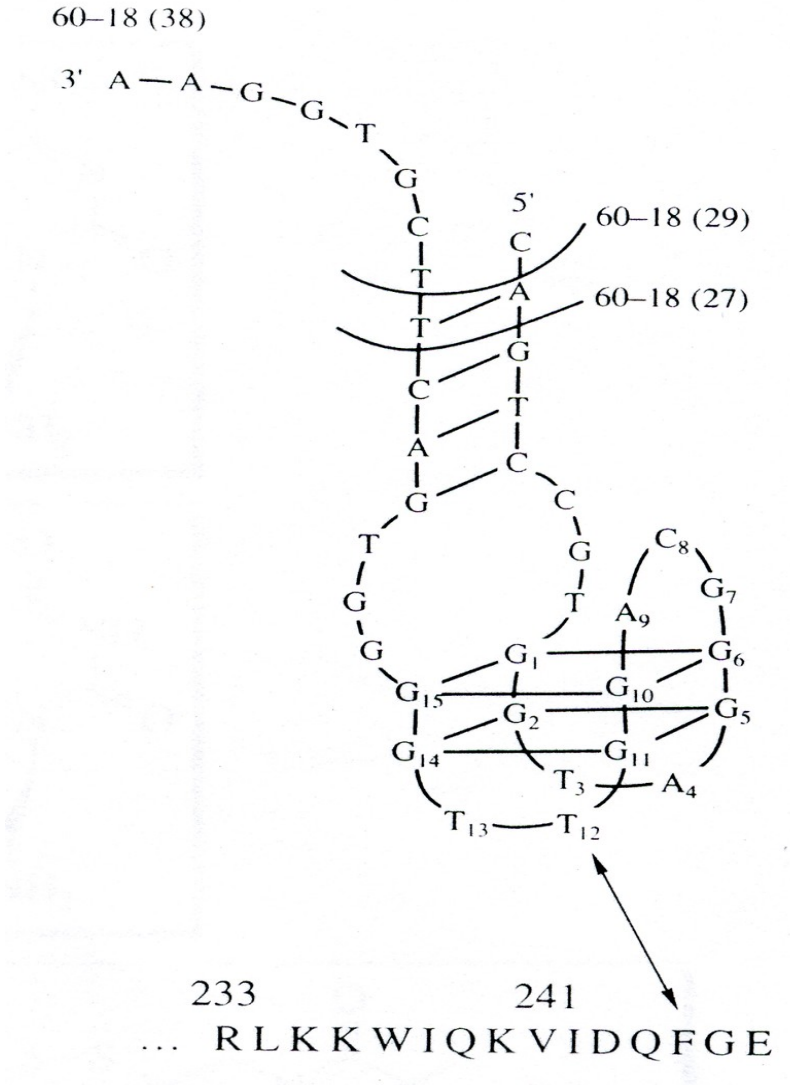
Кривые связывания с тромбином начальной библиотеки ДНК (30 и 60 вырожденных нуклеотидов) и аптамеров после 11 циклов селекции.

Клонирование, секвенирование, анализ структуры аптамеров..

- На сиквенс – 50 и более клонов;
- Кривые связывания с мишенью;
- Поиск мотивов, разделение на семейства;
- Поиск минимального аптамера (делеционный анализ);
- Вторичная и третичная структура;
- Модификация - отбраковка (modification interference analysis), химические сшивки (cross-linking), футпринтинг (защита от протеолиза и химических модификаций).

Модель структуры ДНК-аптамера к тромбину

- Минимальный аптамер – GGTAGGGCAGGTTGG
- Kd= 0.5 нМ
- G – квартеты (во многих ДНК-аптамерах).



Клетки – мишени (tissue SELEX)

- Если белковая мишень не известна, **мишенью** может быть определенный **тип клеток** (например, раковые).
- **Селекция и контрселекция** (удаление аптамеров, которые связывают нормальные клетки).
- Используют чередование очищенного белка-мишени и клеток.

- ***In vivo* imaging:**
- Аптамеры лучше проникают в опухоли (малый размер (8-15 кД) по сравнению с антителами (150 кД);
- Дольше циркулируют в крови (если их модифицировать и коньюгировать с ПЭГ или включить в липосомы);
- Не иммуногенны;

- Пример: **NX21909** (ДНК-аптамер к neutrophil elastase) используется для диагностики (*in vivo* imaging) воспаления.

Неклассические подходы

- **Blended SELEX** – комбинаторную библиотеку РНК ковалентно присоединяют к слабому ингибитору фермента и селектируют создание второго, стабилизирующего контакта.

- Создание аптамера к двум родственным мишеням **(toggling**) – их поочередно используют для селекции. Пример – аптамер к человеческому и свиному тромбину.

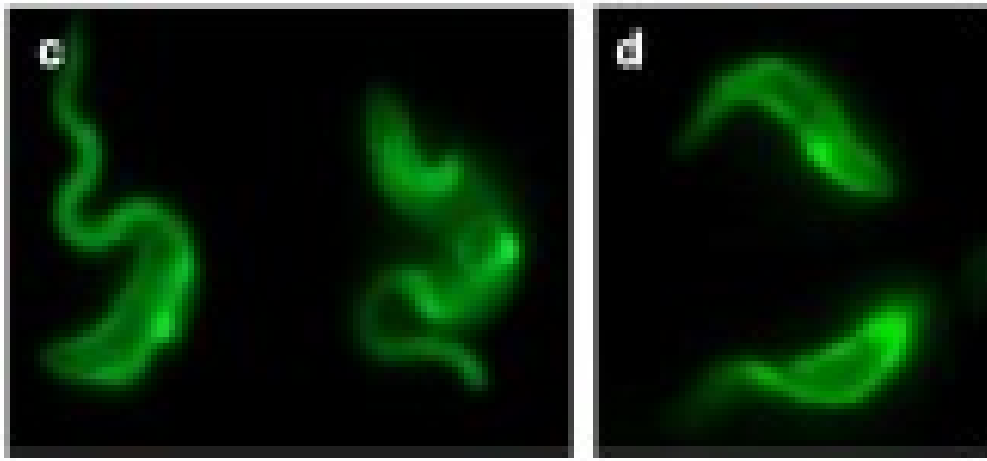
Анти-идиотипический подход – антитело к NES белка Rev HIV-1 было использовано для селекции **«экспортных аптамеров»,** которые структурно имитировали NES.

Они связывались с рецептором NES *in vitro и* ингибировали Rev-зависимый экспорт *in vivo.*

Аптамеры в паразитологии

- **Multi-target селекция:**
- Циклы 1-3 - очищенный VSG117 в качестве мишени (variable surface protein);
- Живые трипаносомы (де-селекция аптамеров, не способных узнавать VSG на поверхности клетки);
- VSG221 (другой вариант);

- Получены высоко-аффинные РНК-аптамеры к VSG. Они связывались с поверхностью трипаносом.
- Цель – вызвать иммунный ответ к поверхности клеток трипаносомы.



Иммунофлуоресцентная микроскопия двух вариантов трипаносом с использованием биотинилированных РНК-аптамеров и Cy3-коньюгированных антител к биотину.

Терапевтическое применение аптамеров

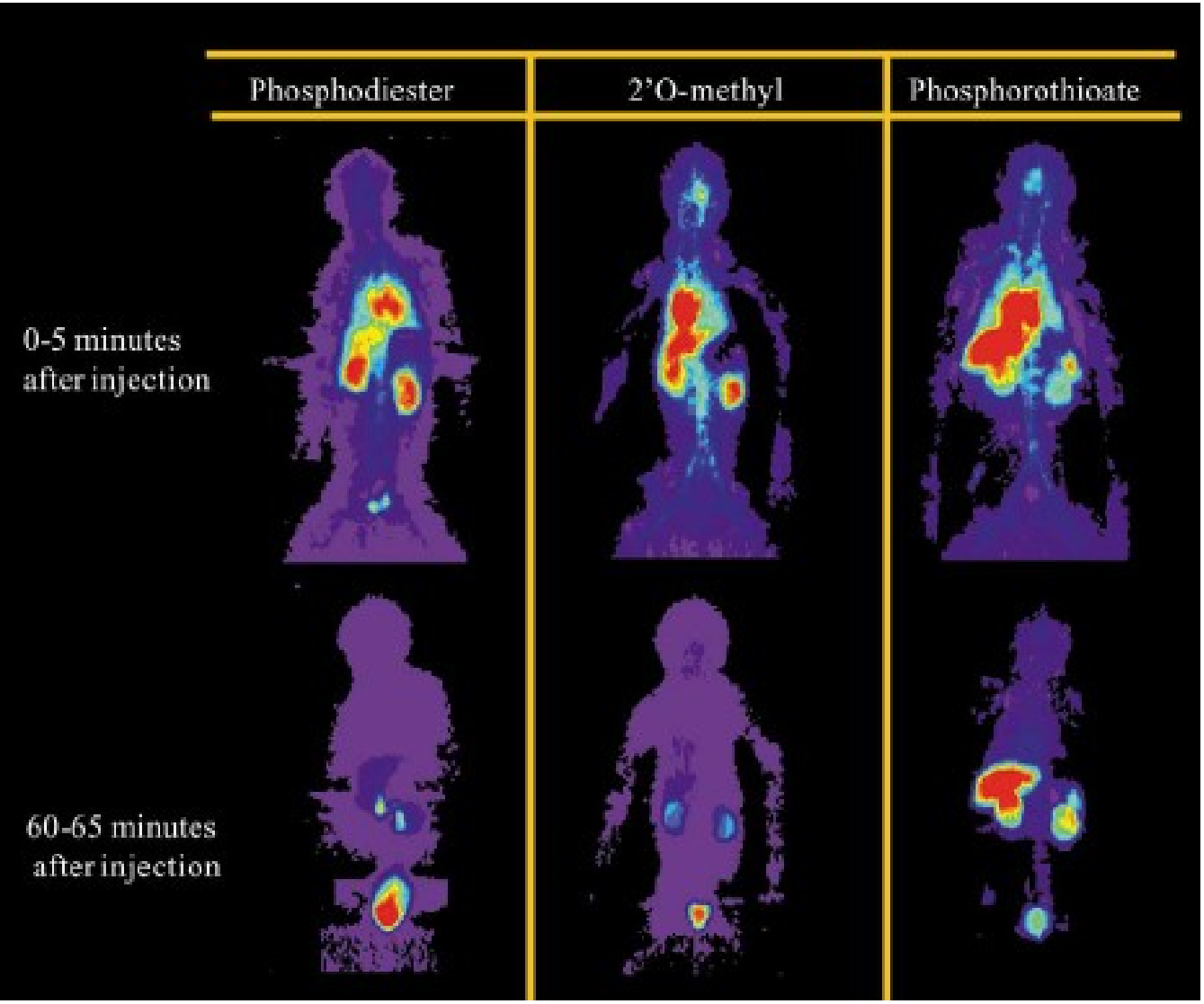
- Должен блокировать функционирование мишени.

- Устойчивый к нуклеазам РНК-аптамер к **VEGF** (vascular endothelial growth factor) **NX1838** ингибировал связывание VEGF с человеческими рецепторами *in vitro* и снижал индуцируемую VEGF проницаемость сосудов *in vivo;*
- *п*ервый аптамер, для которого разрешено клиническое применение для человека (дистрофия сетчатки глаза).

- Аптамер **PDGF-B** (platelet-derived growth factor) в виде коньюгата с ПЭГ ингибировал связывание PDGF с его рецепторами *in vitro и* проявлял противоопухолевую активность на экспериментальных крысах.

Стабильность

селекция в присутствии 2’-модифицированных нуклеотидов



Олигонуклеотиды с тремя типами сахарофосфатного остова, меченые радиоактивным фтором, были внутривенно введены бабуинам. Позитронная томография использовалась для визуализации тканевого распределения радиоактивности.