

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.2

©Коллектив авторов

СЕЛЕКЦИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.С. Замай^{1,2}, И.В. Белянина², А.С. Замай², М.А. Комарова², А.В. Крат³, Е.Н. Еремина^{2,3},
Р.А. Зуков^{2,3}, А.Э. Соколов¹, Т.Н. Замай^{1,2*}

¹Институт физики СО РАН, Красноярск

²Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (КрасГМУ),
660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1;

тел.: +7 (391)2201395; факс: +7 (391)228-08-60; эл. почта: tzamay@yandex.ru

³Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского (КККОД), Красноярск

Описан метод селекции ДНК-аптамеров к опухолевой ткани молочной железы с использованием послеоперационного материала. В качестве позитивных мишеней были использованы ткани рака молочной железы, в качестве негативных мишеней - ткани доброкачественной опухоли; условно здоровые ткани молочной железы, прилегающие к опухолевой; ткани молочной железы от больных мастопатией; ткани злокачественных опухолей других типов. В результате селекции был получен пул ДНК-аптамеров, селективно связывающийся с клетками и тканями рака молочной железы и незначительно связывающийся с доброкачественными опухолями молочной железы. Полученные ДНК-аптамеры могут быть использованы для идентификации белков-биомаркеров, диагностики рака молочной железы, адресной доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: SELEX, ДНК-аптамеры, олигонуклеотиды, рак молочной железы

DOI 10.18097/PBMC20166204411

ВВЕДЕНИЕ

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями рак молочной железы занимает лидирующее положение. Смертность от этого заболевания достигает 40% [1, 2], что, очевидно, связано с отсутствием доступных методов ранней диагностики, поскольку основной вклад в смертность вносит метастазирование, возникающее на поздних стадиях заболевания [3]. Для выявления рака молочной железы используют в основном инвазивные процедуры, поскольку стандарт диагностики остаются гистологические исследования. Для массового скрининга необходимы простые и малоинвазивные способы диагностики, например, основанные на детекции онкомаркеров, присутствующих в биологических жидкостях. В качестве маркеров рака молочной железы используют различные белки: раково-эмбриональный антиген СЕА, маркер клеточного цикла Ki-67, рецептор эпидермального фактора роста HER-2 [4, 5], маммаглобин МГВА, факторы эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования (Snail, Twist, Zeb1) [6]. Однако эти маркеры не обладают достаточным уровнем чувствительности и специфичности [4-6].

Поиск онкомаркеров – сложный многоэтапный процесс, основанный на сравнении протеомов нормальных и злокачественных тканей, который далеко не всегда приводит к положительным результатам [7]. По этой причине в клинической практике практически нет надежных молекулярных маркеров, используемых для диагностики рака молочной железы [4-6]. Другой подход в поиске

онкомаркеров основан на технологии, позволяющей использовать аптамеры для идентификации опухолеассоциированных белков [8]. Аптамеры – короткие синтетические одноцепочечные РНК или ДНК, которые, благодаря уникальной трёхмерной конформации, способны с высокой степенью аффинности и селективности связываться с функциональными группами своих биологических мишеней и представляют собой функциональные аналоги белковых антител, обладающие рядом преимуществ [9]. Выбор аптамеров основан на скрининге большого числа последовательностей из библиотек олигонуклеотидов *in vitro* или *in vivo*, благодаря чему удается подобрать аптамеры с высокой специфичностью практически к любой мишени – от маленьких неорганических ионов до интактных тканей [10-13]. Выбранный пул аптамеров можно амплифицировать, а, зная последовательность нуклеотидов, химически синтезировать. С помощью аптамеров, которые связываются только с белками опухолевых тканей, можно эти белки выделить и идентифицировать, а в дальнейшем использовать для диагностики онкозаболеваний [14].

В данной работе с использованием тканей рака молочной железы, доброкачественных опухолей и условно-здоровой ткани молочной железы, прилегающей к опухолевой, тканей молочной железы от больных мастопатией и тканей злокачественных опухолей других типов, полученных при хирургических операциях, выбран пул ДНК-аптамеров, способных селективно связываться с клетками и тканями рака молочной железы.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

Селекция ДНК-аптамеров

Селекцию ДНК-аптамеров к тканям рака молочной железы проводили с помощью технологии tissue-SELEX [14] из одноцепочечной “Гарвардской” библиотеки ДНК-аптамеров [15] с 40-нуклеотидным переменным участком и праймерными участками с 3'- и 5'-концов: CTCCTCTGACTGTAACCACG (N) (N1)(N)(N1) (N)(N1)(N) (N1)(N2)(N2) (N2)(N2)(N) (N1)(N)(N1) (N)(N1)(N) (N1)(N)(N1) (N2)(N2)(N2) (N)(N1)(N) (N1)(N)(N1) (N)(N1)(N) (N1)(N2)(N2) (N2)(N2)(N) GCATAGGTAGTCCAGAAGCC, где N – смесь нуклеотидов в соотношении A/C/G/T = 45:05:45:05, N1 – A/C/G/T = 05:45:05:45, N2 – A/C/G/T = 25:25:25:25. По сравнению со стандартными рандомизированными библиотеками, такая усовершенствованная структура библиотеки увеличивает в олигонуклеотидах разнообразие вторичных конформаций по типу “шпилек”. При позитивной селекции использовали 13 образцов послеоперационной опухолевой ткани молочной железы от разных пациенток, при негативной селекции было использовано 10 образцов ткани доброкачественной опухоли, 1 образец ткани с мастопатией, 1 образец ткани рака лёгкого и 1 образец ткани глиобластомы.

Работа выполнена в строгом соответствии с документами, регламентирующими этические нормы проведения исследований с использованием биологического материала человеческого происхождения (решение этического комитета Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого №37/2012 от 31.01.2012, решение этического комитета Красноярского краевого онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского № 8/2011 от 16.03.2011).

Удаленные во время операции образцы ткани помещали в питательную среду Хенкса. Через 3 ч ткань (0,5-1 см³) трижды промывали в 5 мл 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего Ca²⁺ и Mg²⁺ (в конечной концентрации 3 мМ), измельчали, трижды промывали и разводили в 100 мкл 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4).

ДНК-аптамеры выбирали в течение 11-ти раундов позитивной и негативной селекции, как описано ранее [14]. Селекцию проводили в фосфатном буфере с добавлением двухвалентных ионов кальция и магния (в конечных концентрациях 3 мМ). В первом раунде проводили только позитивную селекцию к раковым тканям молочной железы; для этого 50 мкл суспензии измельченных тканей инкубировали с маскирующей дрожжевой РНК (конечная концентрация 1 мг/мл) в 100 мкл фосфатного буфера (pH 7,4) с Ca²⁺ и Mg²⁺ в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем к суспензии клеток добавляли FAM-меченую ДНК-библиотеку (в конечной концентрации 1 мкМ) и инкубировали на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре, защищая от воздействия света. Далее суспензию центрифугировали 5 мин при 5000 g, супернатант удаляли, а полученный осадок трижды отмывали фосфатным буфером

с Ca²⁺ и Mg²⁺ для освобождения от несвязавшихся олигонуклеотидов. Для увеличения строгости отбора аптамеров объем промывочного буфера увеличивали в каждом раунде на 50 мкл, начиная с 0,5 мл в первом и доводя до 1 мл, в последнем. Связавшиеся с клетками аптамеры, находившиеся в осадке после отмывания, отделяли от мишеней денатурацией в 75 мкл 10 мМ Трис-ЭДТА-буфера (pH 7,4) в течение 5 мин при 95°C с последующим охлаждением на льду в течение 5 мин. Затем супернатант, содержащий пул аптамеров-кандидатов, полученный после центрифугирования в течение 15 мин при 13000 g, отбирали в отдельную пробирку. Количество копий последовательностей, выбранных в раунде, увеличивали симметричной полимеразной цепной реакцией (ПЦР), а затем для получения одноцепочечных ДНК-аптамеров из двухцепочечного ПЦР-продукта симметричной реакции проводили асимметричную ПЦР.

Для проведения симметричной ПЦР использовали 5 мкл пула аптамеров в ТЕ буфере и 45 мкл реакционной смеси. В первых трёх раундах для амплификации использовали смесь, содержащую: ПЦР-буфер А (“КАРА Biosystems”, США), 2,5 мМ MgCl₂, 0,025 Ед/мкл КАРА2G HotStart Robust polymerase “КАРА Biosystems”, 220 мкМ dNTPs, 300 нМ прямой праймер (5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3') и 300 нМ обратный праймер (5'-GGCTTCTGGACTACCTATGC-3'). Начиная с 4-го раунда, смесь модифицировали для повышения эффективности реакции, заменяя стандартный ПЦР-буфер А на ПЦР-буфер В (“КАРА Biosystems”) для амплификации ДНК из сложных многокомпонентных сред, с добавлением раствора Enhancer 1 А (“КАРА Biosystems”) в соотношении буфер В : Enhancer 1 = 1:1.

В асимметричной реакции для получения одноцепочечной ДНК в ПЦР-реакции концентрация прямого праймера была в 20 раз выше, чем обратного. Для реакции брали 5 мкл симметричного ПЦР-продукта с 45 мкл асимметричной ПЦР-смеси: ПЦР-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 0,025 Ед/мкл КАРА2G HotStart Robust polymerase, 220 мкМ dNTPs, 1 мкМ прямой праймер с флуоресцентной меткой FAM (5'-FAM/CTCCTCTGACTGTAACCACG-3') и 50 нМ обратный праймер (5'-GGCTTCTGGACTACCTATGC-3'). Симметричную и асимметричную ПЦР-реакции проводили по следующей программе: предварительный нагрев 2 мин при 95°C, далее 15 циклов – 30 с при 95°C, 15 с при 56,3°C и 15 с при 72°C. Наличие ПЦР-продукта контролировали с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Для детекции одноцепочечных ДНК, меченных флуоресцентной меткой FAM, использовали гель-документирующую систему GBOX/EF2-E.

Одноцепочечные ДНК-аптамеры, полученные в асимметричной реакции, отделяли от компонентов ПЦР-смеси с помощью 30 кДа фильтров Pall Centrifugal devices (“Pall”, США). Концентрацию одноцепочечных ДНК-аптамеров в выбранных пулах определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000 (“Thermo Scientific”, США). Выделенные аптамеры

использовали в дальнейших раундах селекции и хранили при -20°C .

Второй и все последующие раунды селекции из пула аптамеров, полученного в предыдущем раунде, начинали с негативного отбора, используя ткани рака лёгкого, глиобластомы, мастопатии и условно-здоровой, прилегающей к опухолевой ткани молочной железы или доброкачественной опухоли молочной железы. Перед началом раунда пул аптамеров денатурировали при 95°C в течение 5 мин и ренатурировали в течение 10 мин на льду для формирования аптамерами нужной конформации. Суспензию клеток-мишеней инкубировали 30 мин с маскирующей дрожжевой РНК (конечная концентрация 1 мг/мл), затем с пулом аптамеров предыдущего раунда (в конечной концентрации 200 нМ). После инкубации смесь центрифугировали 10 мин при 5000 g и отбирали надосадок с несвязавшимися аптамерами. С полученным надосадком проводили позитивную селекцию с тканью рака молочной железы так же, как для первого раунда, за исключением того, что вместо одноцепочечной ДНК-библиотеки использовали аптамеры, полученные после негативной селекции.

Остальные раунды селекции проводили по той же схеме, что и 2-ой раунд, чередуя негативный и позитивный отборы. Всего было проведено 11 раундов селекции к клеткам рака молочной железы. С пулом аптамеров 6-го раунда селекции провели два дополнительных раунда негативной селекции с доброкачественными опухолями молочной железы по тому же протоколу, что и другие негативные процедуры отбора, однако без промежуточной ПЦР-амплификации. В результате селекции ДНК-аптамеров с использованием послеоперационного материала было получено 12 пулов ДНК-аптамеров.

Выбор наиболее специфичного и аффинного пула ДНК-аптамеров

Для выбора наиболее аффинного и специфичного пула ДНК-аптамеров, их проверяли на способность связываться с опухолевыми клетками рака молочной железы и доброкачественной опухоли. Ткань готовили таким же образом, как для селекции. После отмывки клетки разводили в 2 мл фосфатного буфера и пропускали через фильтр (70 мкм). Подсчёт клеток осуществляли с помощью камеры Горяева. Клеточную суспензию, содержащую 300 тыс. клеток, инкубировали в 100 мкл фосфатного буфера в течение 30 мин с дрожжевой РНК (1 мг/мл), добавляли пул аптамеров или ДНК-библиотеку, в качестве контроля (конечная концентрация 50 нМ) и выдерживали при комнатной температуре на шейкере в течение 30 мин. В качестве негативного контроля для индикации фоновой флуоресценции клеток использовали интактную клеточную суспензию без добавления олигонуклеотидов.

Флуоресценцию пулов аптамеров, связавшихся с клетками, определяли на цитометре Cytomics FC 500 ("Beckman Coulter", США) и флуоресцентном микроскопе Axioscop 40 ("Carl Zeiss", Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обычно аптамеры получают к заранее известным биомаркерам (рекомбинантным белкам) или клеточным линиям. В литературе описано несколько аптамеров к тканям рака молочной железы, однако их действие показано только на модельных экспериментах и до сих пор нет данных о возможности их применения на реальных клинических образцах [16, 17]. Исключение составил аптамер LXL-1-A, селективность которого к клиническим образцам была недостаточно высока, он окрашивал только 76% образцов тканей метастазирующего рака молочной железы и 39% тканей неметастазирующего рака молочной железы и связывался с 8% образцов здоровой ткани молочной железы [17]. Тем не менее, поскольку при выборе тактики селекции аптамеров принято руководствоваться устоявшимися критериями выбора рецептора-мишени и ввиду большей доступности для исследователей рекомбинантных белков и клеточных линий, в список возможных кандидатов в биомаркеры заранее не попадают потенциальные уникальные белки-онкомаркеры. В литературе описаны аптамеры к нескольким белкам-биомаркерам рака молочной железы – муцину 1 (MUC1) [18], эпидермальному фактору роста 2 (HER2) [19], периостину [20] и клеточной культуре метастазирующего рака молочной железы MDA-MB-231 [17]. Аптамеры, полученные к клеточным линиям и рекомбинантным белкам и хорошо зарекомендовавшие себя в модельных экспериментах, не всегда эффективны для работы с клиническими образцами [16, 17]. Для получения аптамеров, способных к селективному распознаванию тканей, циркулирующих опухолевых клеток, онкомаркеров плазмы крови, нами были использованы ткани молочной железы, полученные при операции. Для селекции мы применили метод, хорошо зарекомендовавший себя при селекции аптамеров к тканям рака лёгкого человека [14], поскольку он позволил получить ДНК-аптамеры, способные выявить новые биомаркеры рака лёгкого, отличить циркулирующие опухолевые клетки рака лёгкого от циркулирующих клеток других видов онкозаболеваний [14], окрашивать гистологические срезы тканей [13]. Однако селекция аптамеров к сложным многокомпонентным мишеням всегда проблематична, поэтому для достижения высокой селективности аптамеров при негативной селекции необходимо использовать те ткани, клетки, молекулы, бактерии, вирусы и даже пластик, связывания с которыми необходимо избегать. Аптамеры к тканям рака молочной железы не должны связываться со здоровой тканью, доброкачественной опухолью молочной железы и тканями с мастопатией, здоровой тканью молочной железы, прилегающей к опухолевой, а также опухолевыми тканями другой локализации, поэтому эти ткани были использованы нами при селекции (рис. 1).

Другая трудность, с которой сталкиваются при селекции аптамеров, – недостаточно эффективная амплификация сложных смесей, каковыми являются

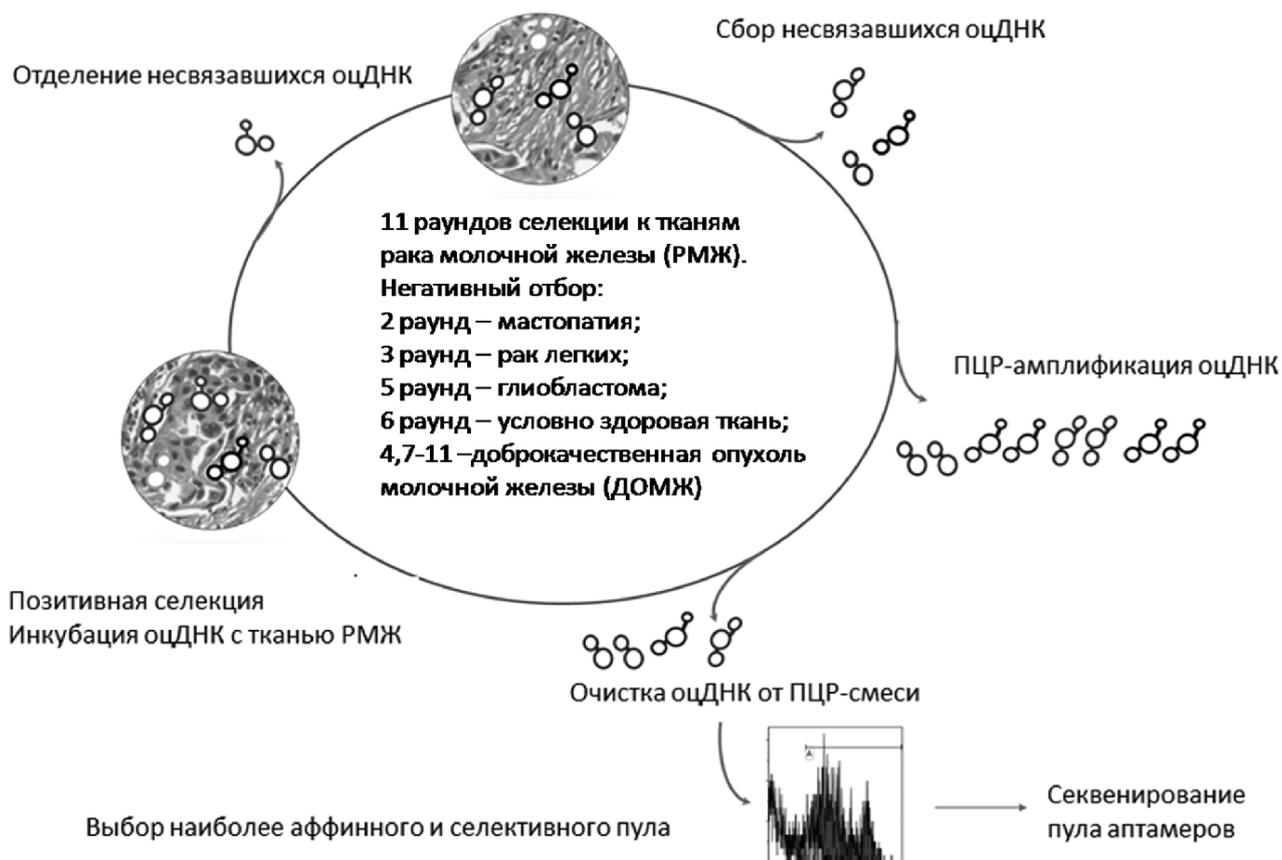


Рисунок 1. Схема селекции ДНК-аптамеров к ткани рака молочной железы (РМЖ) с негативным отбором к тканям с выраженной мастопатией, доброкачественной опухоли молочной железы (ДОМЖ), рака лёгких, глиобластомы головного мозга и условно-здоровым, прилегающим к опухолевым.

пулы аптамеров даже при оптимальных, правильно подобранных условиях. При селекции аптамеров более эффективной в сравнении с классической открытой ПЦР является ПЦР в эмульсии [21-23]. При большом разнообразии олигонуклеотидов первыми амплифицируются последовательности с наиболее простой третичной структурой, более легкой для фермента, что приводит к снижению количества возможных кандидатов в аптамеры за счёт сложности их структуры и повышенного содержания G- и C-нуклеотидов [23], особенно на первых раундах селекции. На практике это выглядит как потеря на геле полосы, характерной для пула аптамеров, и снижение уровня связывания аптамеров с мишенью. При использовании ПЦР в эмульсиях или правильно подобранных условиях открытой ПЦР основные кандидаты в аптамеры восстанавливаются после третьего раунда [23]. При селекции аптамеров к тканям рака молочной железы на 3-ем раунде селекции ДНК-аптамеры стабильно пропадали (на геле исчезали характерные для них полосы) и селекцию приходилось начинать заново. Нам удалось преодолеть эти затруднения и оптимизировать ПЦР-амплификацию заменой ПЦР-буфера и добавлением Enhancer-1, что подробно описано в разделе “Методика”.

Из 11-ти пулов аптамеров был выбран пул шестого раунда с наилучшими показателями связывания. Все пулы аптамеров анализировали

по способности связываться с клетками рака молочной железы, доброкачественной опухоли и здоровой ткани молочной железы. Поскольку опухоли молочной железы разных типов характеризуются достаточно большими различиями по биохимическим параметрам, структурной организации ткани, белковым биомаркерам, нам необходимо было выбрать пул с наилучшими показателями связывания с раковыми тканями разных типов. Хорошим связыванием с клетками рака молочной железы пациентки Б обладали ДНК-аптамеры всех раундов селекции (рис. 2). Следует заметить, что у этой пациентки злокачественная опухоль была первичной и развилась не из доброкачественной, как у двух других пациенток. У пациенток А и В злокачественное ядро образовалось из доброкачественного новообразования. С раковыми клетками пациентки В связывались только аптамеры 6 раунда селекции, при этом доброкачественная опухоль той же пациентки связывалась с аптамерами этого же раунда значительно хуже. У пациентки А, для которой исследования были проведены также как для пациентки Б, на образцах доброкачественной и злокачественной опухолей раковые клетки связывались с аптамерами в большей степени, чем доброкачественные, хотя связывание было невелико и составляло 23%. Можно предположить, что опухоль пациентки А является низкодифференцированной и менее злокачественной.

Связывание аптамеров с клетками, %

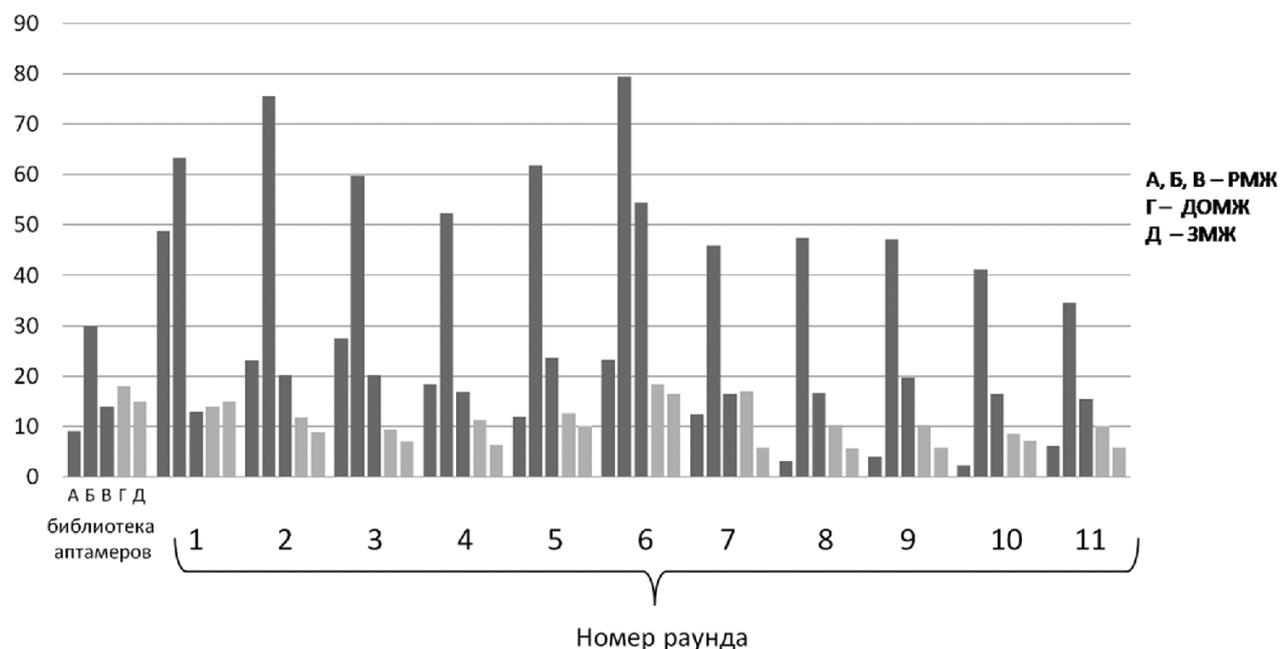


Рисунок 2. Выбор пула ДНК-аптамеров с наилучшими показателями связывания с клетками рака молочной железы (PMJ) в сравнении с доброкачественной опухолью молочной железы (ДОМЖ) и здоровой ткани (ЗМЖ), прилегающей к опухолевой, методом проточной цитометрии. Связывание пулов аптамеров с клетками, выделенными из тканей 3-х пациенток - А, Б, В. Для рака молочной железы (образцы от пациенток А,Б,В), доброкачественной опухоли молочной железы (Г) (от пациентки А) и здоровой ткани, прилегающей к опухолевой (Д) (от пациентки В).

Таким образом, анализ связывания клеток с пулами аптамеров разных раундов селекции, проведенный с помощью проточной цитометрии, показал, что ДНК-аптамеры всех пулов связываются с клетками доброкачественных опухолей на уровне ДНК-библиотеки или даже ниже. Исключение составил 6-ой пул ДНК-аптамеров, связывание которых с клетками доброкачественной опухоли молочной железы было более существенным, однако в несколько раз хуже, чем с клетками рака молочной железы (связывание ДНК-аптамеров с доброкачественной опухолью составляло 18%, со здоровой тканью, прилегающей к опухолевой – 16%, а с клетками рака молочной железы – 55-80%). Эти исследования показали возможное присутствие в пуле ДНК-аптамеров 6 раунда селекции последовательностей олигонуклеотидов, неспецифически связывающихся с опухолевыми клетками молочной железы. С другой стороны, связывание аптамеров с клетками доброкачественных опухолей пациенток с сопутствующим злокачественным новообразованием может свидетельствовать о наличии в прилегающих доброкачественных и условно-здоровых тканях онкомаркеров, таких как рецепторы к эстрогенам и прогестерону или единичных раковых клеток.

Следует отметить, что селекцию пулов аптамеров проводили к тканям 11-ти пациенток с раком молочной железы, 8-ми тканям доброкачественной опухоли, взятых у тех же больных,

что и злокачественная ткань. Исключение составили: раунд 3, в котором использовалась ткань рака лёгких, раунд 5 – ткань доброкачественной опухоли и глиобластомы головного мозга, раунд 6 – условно-здоровая ткань молочной железы. Возможно, именно поэтому аптамеры этого пула обладали наилучшим связыванием и селективностью.

Для повышения селективности 6-го пула ДНК-аптамеров с наилучшими показателями связывания, было проведено два дополнительных (без промежуточной амплификации) негативных раунда отбора non-SELEX 6+ к доброкачественной опухоли пациенток без злокачественного перерождения. Дополнительные негативные раунды селекции значительно улучшили селективность полученных ДНК-аптамеров 6+ раунда селекции. Так, связывание аптамеров раунда 6+ с клетками доброкачественной опухоли снизилось с 23% до 12% (рис. 3, А2), связывание же с клетками глиобластомы как в 6, так и в 6+ раундах не превышало 5% (рис. 3, А3). Однако дополнительная селекция отразилась и на связывании с клетками рака молочной железы, которое уменьшилось с 78% до 63% (рис. 3, А1). Возможно, как раз уменьшение числа неспецифических последовательностей, удалённых из пула во время дополнительной негативной селекции, и привело к снижению флуоресценции пула аптамеров с раком молочной железы, но при этом селективность пула возросла.

СЕЛЕКЦИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

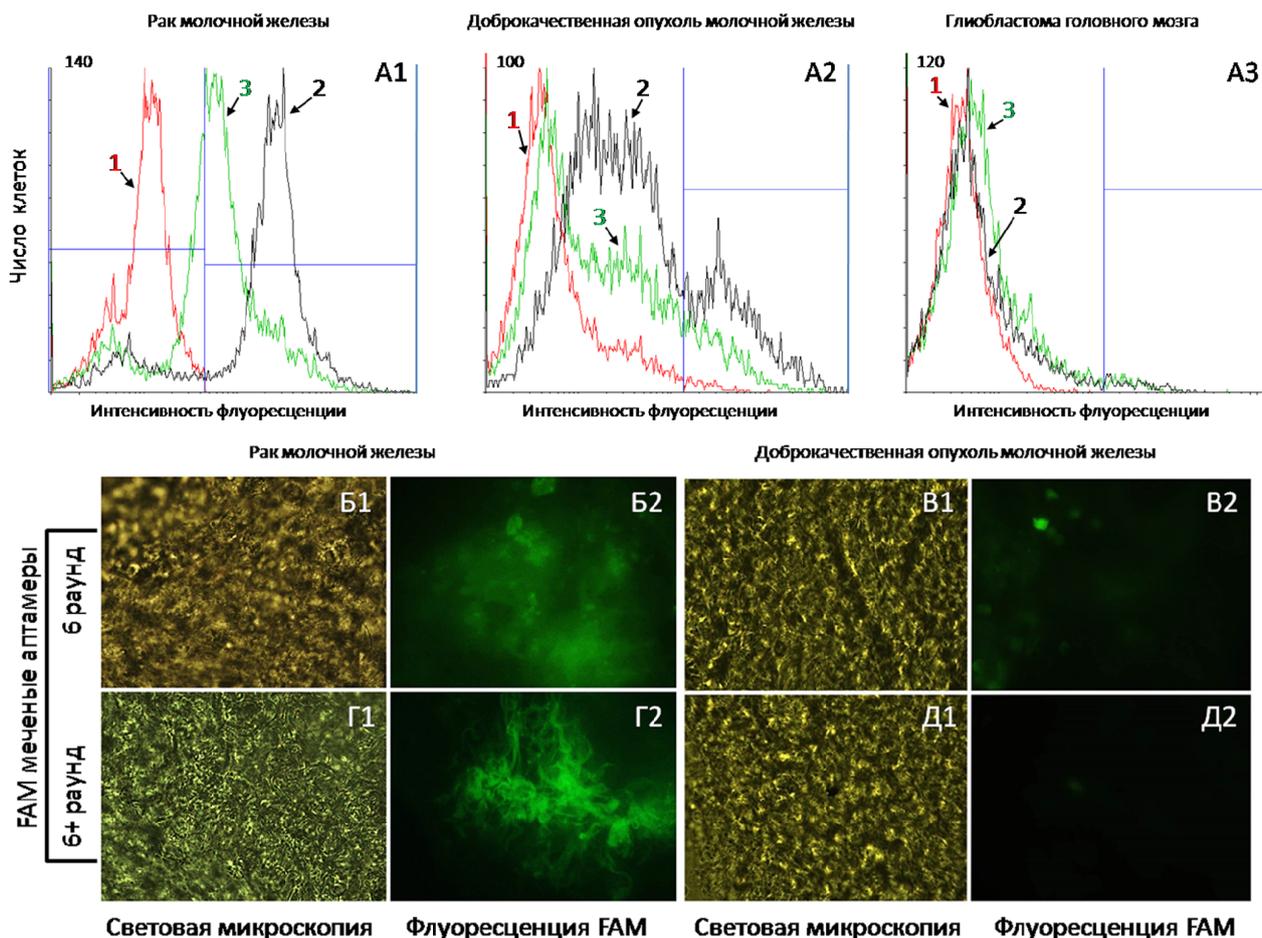


Рисунок 3. Связывание пулов аптамеров 6-го раунда до и после 2-х дополнительных раундов негативной селекции 6+ с клетками, выделенными из тканей: А1 - рака молочной железы, А2 - доброкачественной опухоли молочной железы и А3 - глиобластомы, определенное с помощью проточной цитометрии, где на гистограммах (1) - интактные клетки, (2) - связывание клеток с аптамерами 6 раунда селекции, (3) - связывание клеток с аптамерами 6+ раунда селекции. Связывание аптамеров 6 и 6+ раундов с тканями рака молочной железы (Б,Г) и доброкачественной опухоли молочной железы (В,Д) определенное с помощью флуоресцентной микроскопии. 1 - световая микроскопия, 2 - флуоресцентная микроскопия (флуоресцентная метка FAM). 100х.

Данные, показывающие связывание аптамеров с тканями рака молочной железы и доброкачественной опухоли, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии, подтвердили результаты проточной цитометрии и показали селективность пула ДНК-аптамеров 6 раунда селекции, которая возросла после дополнительного негативного отбора (рис. 3 Б1-Г2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие чувствительных и специфичных молекулярных маркеров рака молочной железы затрудняет выявление этого заболевания на ранних стадиях, что увеличивает смертность от этого заболевания из-за метастазирования опухоли. В последнее время появилась возможность выявления опухолеассоциированных белков в биологических жидкостях с помощью аптамеров. За счёт специфического связывания со своими молекулярными мишенями аптамеры способны идентифицировать их с высокой степенью чувствительности.

В работе описана методика получения ДНК-аптамеров к опухолевой ткани молочной железы с помощью технологии tissue-SELEX с использованием послеоперационных материалов. Обычно для получения аптамеров применяют рекомбинантные белки или клеточные культуры. Однако конформации интактных белков опухолевой и здоровой тканей могут отличаться, что снижает специфичность полученных аптамеров, а фенотипы клеточных культур рака молочной железы отличаются от реальных образцов рака молочной железы онкобольных. Кроме того, и фенотипы опухолевой ткани у разных пациентов могут различаться. Следовательно, аптамеры, полученные к рекомбинантным белкам и клеточным культурам, могут быть недостаточно селективными к реальным опухолеассоциированным белкам больных раком молочной железы. В работе с помощью послеоперационных материалов рака молочной железы, полученных от разных онкобольных, взятых в качестве положительных мишеней, и доброкачественной опухоли молочной железы,

мастопатии молочной железы и опухолей других типов, взятых в качестве негативных мишеней, получен пул ДНК-аптамеров к клеткам рака молочной железы. Полученные ДНК-аптамеры можно использовать для поиска белков-биомаркеров рака молочной железы, ранней диагностики этого заболевания, разработки средств адресной доставки противоопухолевых препаратов и противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (Соглашение №14.607.21.0104 (RFMEFI60714X0104)).

ЛИТЕРАТУРА

1. Пак Д.Д., Усов Ф.Н., Фетисова Е.Ю., Волченко А.А., Ефанов В.В. (2013) Онкология, **4**, 34-39.
2. Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W.W., Comber H., Forman D., Bray F. (2013) Eur. J. Cancer, **49**(6), 1374-1403.
3. Kamangar F., Dores G.M., Anderson W.F. (2006) J. Clin. Oncol., **24**, 2137-2150.
4. Watson M.A., Dintzis S., Darrow C.M. (1999) Cancer Res., **59**, 3028-3031.
5. Ross J.S., Linette G.P., Stec J., Clark E., Ayers M., Leschly N., Symmans W.F., Hortobagyi G.N., Pusztai L. (2003) Expert Rev. Mol. Diagn., **3**, 573-585.
6. Pultz B.A., Luz F.A.C., Faria P.R., Oliveira A.P.L., Araújo R.A., Silva M.J.B. (2014) J. Cancer, **5**, 559-571.
7. Misek D.E., Kim E.H. (2011) Int. J. Proteomics, 343582, 9. DOI: dx.doi.org/10.1021/pr501224f.
8. Berezovski M.V., Lechmann M., Musheev M.U., Mak T.W., Krylov S.N. (2008) J. Am. Chem. Soc., **130**, 9137-9143.
9. Iliuk A.B., Hu L., Tao W.A. (2011) Anal. Chem., **83**, 4440-4452.
10. Wehbe M.B., Labib M.A., Muharemagic D.A., Zamay A.S., Berezovski M.V. (2015) Biosens. Bioelectron., **67**, 280-286.
11. Kolovskaya O.S., Savitskaya A.G., Zamay T.N., Reshetneva I.T., Zamay G.S., Erkaev E.N., Wang X.B., Wehbe M.B., Salmina A.B., Perianova O.V. et al. (2013) J. Med. Chem., **56**, 1564-1572.
12. Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Zamay A.S., Glazyrin Yu.E., Spivak E.A., Zubkova O.A., Kadkina A.V., Erkaev E.N., Zamay G.S., Savitskaya A.G., Trufanova L.V., Petrova L.L., Berezovski M.V. (2014) Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, **8**, 60-72.
13. Zamay A.S., Zamay G.S., Glazyrin Yu.E., Zamay T.N., Krat A.V., Modestov A.A., Zubkova O.A., Spivak E.A., Sukhovolskaia M.A., Kuznetsova S.A., Salmina A.B., Gargaun A.A., Berezovski M.V., Kolovskaya O.S. (2014) Oligos&Peptides - Chimica Oggi - Chemistry Today, **32**, 24-28.
14. Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Glazyrin Y.E., Krat A.V., Zubkova O., Spivak E., Wehbe M., Gargaun A., Muharemagic D. et al. (2015) Molecular Therapy, **23**, 1486-1496.
15. Ruff K.M., Snyder T.M., Liu D.R. (2010) J. Amer. Chem. Soc., **132**, 9453-9464.
16. Zhang K., Tang L., Sefah K., Zhao Z., Zhu G., Sun W., Goodison S., Tan W. (2012) ChemMedChem, **7**, 79-84.
17. Li X., Zhang W., Liu L., Zhu Z., Ouyang G., An Y., Zhao C., Yang C.J. (2014) Anal. Chem., **86**, 6596-6603.
18. Hu Y., Duan J., Zhan Q., Wang F., Lu X., Yang X.-D. (2012) PLoS One, **7**, e31970.
19. Giangrande P., McNamara J., Thiel K., Thiel W., Rockney W. (2013) HER2 Nucleic Acid Aptamers US20130129719.
20. Lee Y.J., Kim S., Park S.-A., Kim Y., Lee J.E., Noh D.-Y., Kim K.-T., Ryu S.H., Suh P.-G. (2013) Mol. Ther., **21**, 1004-1013.
21. Shao K., Ding W., Wang F., Li H., Ma D., Wang H. (2011) PLoS One, **6**, e24910.
22. Yufa R., Krylova S.M., Bruce C., Bagg E.A., Schofield C.J., Krylov S.N. (2015) Anal. Chem., **87**, 1411-1419.
23. Levay A., Breneman R., Hoinka J., Sant D., Cardone M., Trinchieri G., Przytycka T.M., Bereznoy A. (2015) Nucl. Acids Res. doi: 10.1093/nar/gkv534.

Поступила: 11. 11. 2015.
Принята к печати: 30. 12. 2015.

DNA APTAMERS SELECTION FOR BREAST CANCER

G.S. Zamay^{1,2}, I.V. Belayanina², A.S. Zamay², M.A. Komarova², A.V. Krat³, E.N. Eremina^{2,3},
R.A. Zukov^{2,3}, A.E. Sokolov¹, T.N. Zamay^{1,2}

¹Kirensky Institute of Physics, Krasnoyarsk, Russia

²Voyno-Yasenetski Krasnoyarsk State Medical University,

1 Partizana Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022 Russia; tel.: +7(391)2201395; e-mail: tzamay@yandex.ru

³Kryzhanovskiy Krasnoyarsk Regional Clinical Cancer Center, Krasnoyarsk, Russia

A method of selection of DNA aptamers to breast tumor tissue based on the use of postoperative material has been developed. Breast cancer tissues were used as the positive target; the negative targets included benign tumor tissue, adjacent healthy tissues, breast tissues from mastopathy patients, and also tissues of other types of malignant tumors. During selection a pool of DNA aptamers demonstrating selective binding to breast cancer cells and tissues and insignificant binding to breast benign tissues has been obtained. These DNA aptamers can be used for identification of protein markers, breast cancer diagnostics, and targeted delivery of anticancer drugs.

Key words: SELEX, DNA-aptamers, oligonucleotides, breast cancer