

МЕТОДЫ ОТБОРА АПТАМЕРОВ К БЕЛКОВЫМ МИШЕНЯМ

©2006 г.

А. В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

I. Введение. Области применения аптамеров. II. Методы отбора аптамеров. III. Характеристики аптамеров. IV. Сайт-направленный отбор аптамеров. V. Регулируемые и сигнальные аптамеры. Аптазимы. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АПТАМЕРОВ

В течение долгого времени нуклеиновые кислоты рассматривались в основном как линейные носители информации, в то время как большинство клеточных функций приписывались белковым молекулам, обладающим сложной трехмерной структурой. В то же время, постепенно появлялось все больше примеров, показывающих, что одонитевые молекулы нуклеиновых кислот могут выполнять в клетке множество разных функций. Было установлено, что одонитевые молекулы РНК способны к формированию самых разнообразных трехмерных структур, что позволяет им специфически узнавать различные молекулярные мишени, и даже осуществлять катализ. В качестве хрестоматийных примеров можно назвать молекулы тРНК и рРНК, которые играют ключевую роль в процессе белкового синтеза. Анализ механизмов транскрипции, сплайсинга и трансляции показал, что специфические взаимодействия белков с определенными участками РНК имеют огромное значение в регуляции генной экспрессии. Стало ясно, что огромное комбинаторное разнообразие нуклеиновых кислот и их способность формировать самые различные вторичные и третичные структуры делают возможным направленный

Принятые сокращения: SELEX – systematic evolution of ligands by exponential enrichment, одДНК – одноцепочечная ДНК; ПЦР – полимеразная цепная реакция; нт – нуклеотид.

Адрес для корреспонденции: akulb@img.ras.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-49405, гранта Президента РФ № МК-952.2005.4 и гранта Фонда содействия отечественной науке.

поиск последовательностей нуклеиновых кислот, обладающих определенными свойствами. Это привело к разработке методов эволюции нуклеиновых кислот *in vitro*, позволяющих получать молекулы РНК или оцДНК, способные к узнаванию других молекул или обладающие каталитической активностью [37, 110].

Синтетические одностебельные молекулы РНК или ДНК, способные к специфичному связыванию с другими молекулами-мишенями, были названы аптамерами (от лат. *aptus* – подходящий, прилаженный) [37]. Аптамеры получают направленным отбором *in vitro* из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов. Метод отбора аптамеров получил название SELEX (от англ. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении) [110]. Принцип данного метода изображен на рис. 1. В ходе эксперимента проводится несколько раундов отбора последовательностей, связывающихся с молекулой-мишенью. Каждый раунд включает три основные стадии: (I) библиотека олигонуклеотидов инкубируется с молекулой-мишенью; (II) комплексы олигонуклеотидов с мишенью отделяются от несвязавшихся олигонуклеотидов; (III) производится амплификация связавшихся последовательностей. В результате происходит постепенное обогащение библиотеки олигонуклеотидов последовательностями, обладающими повышенным сродством к молекуле-мишени. Проведение многочисленных экспериментов по отбору *in vitro* показало, что аптамеры могут быть получены практически к любым мишеням: белкам, пептидам, нуклеиновым кислотам, полисахаридам, малым органическим молекулам (аминокислотам, нуклеотидам и другим метаболитам), вирусным частицам, целым клеткам и даже тканям [46].

Аптамеры являются высокоаффинными и очень специфичными лигандами [34, 46]. Аптамеры к белкам часто связываются в функционально важных участках молекулы и являются ингибиторами активности белков-мишеней [93]. По большинству своих характеристик аптамеры не уступают моноклональным антителам и могут быть использованы вместо антител во многих экспериментах [66]. В то же время аптамеры обладают значительно большей стабильностью, чем антитела. Метод отбора аптамеров достаточно прост и позволяет получать новые лиганды в течение всего одного-двух месяцев. В последнее время разработаны методы автоматического отбора аптамеров, которые позволяют проводить одновременный отбор аптамеров к большому числу различных мишеней [27, 39]. Благодаря подобному набору характеристик аптамеры находят все более широкое приме-

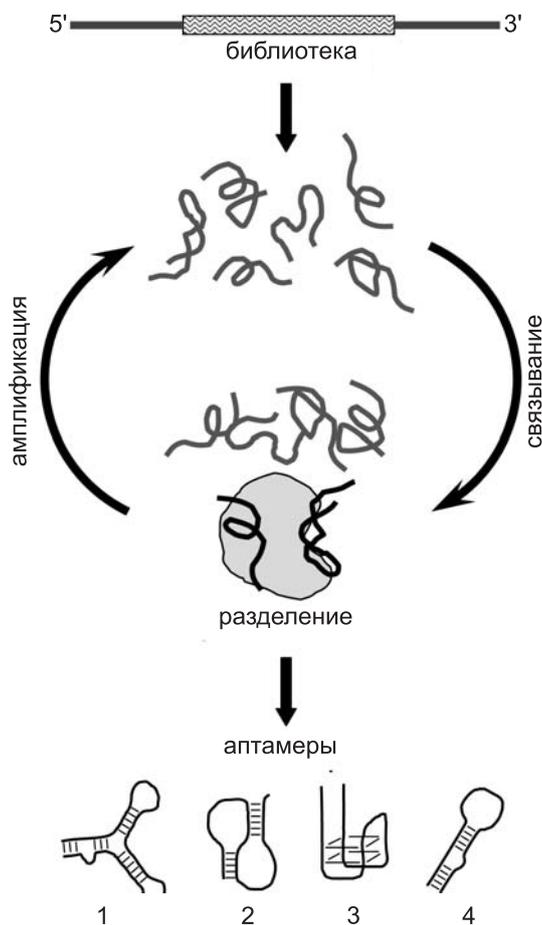


Рис. 1. Общая схема получения аптамеров.

Исходная библиотека олигонуклеотидов содержит случайный район (обозначен волнистой штриховкой), окруженный фиксированными последовательностями (показаны серым цветом). Каждый раунд отбора состоит из трех стадий: (I) случайная библиотека, содержащая большое число последовательностей, способных к формированию различной структуры, инкубируется с белком-мишенью; (II) производится разделение связанных и несвязанных олигонуклеотидов; (III) олигонуклеотиды, связавшиеся с белком, элюируются и амплифицируются. Обогащенную библиотеку используют для проведения следующего раунда отбора. После окончания селекции обогащенную библиотеку клонируют и определяют последовательности индивидуальных аптамеров. Снизу показаны различные варианты вторичной структуры, образуемой аптамерами: шпильки (1 и 4), псевдоузел (2), G-квартет (3).

нение в самых разных (фундаментальных и прикладных) областях исследований. Ниже перечислены некоторые из основных областей применения аптамеров.

1. Аптамеры используют для изучения механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. В случае белков, узнающих специфические последовательности нуклеиновых кислот *in vivo*, использование SELEX позволяет выявить природные последовательности связывания белков с РНК или ДНК [45, 97, 101, 110]. Анализ трехмерной структуры аптамер-белковых комплексов используется для исследования структуры РНК- и ДНК-связывающих сайтов белков-мишеней [26, 63, 65, 69, 96].

2. На основе аптамеров могут быть получены высокоэффективные и специфичные ингибиторы белков-мишеней [9, 46, 106, 111]. Подобные ингибиторы могут использоваться как в фундаментальных исследованиях (в частности, в функциональных исследованиях белков-мишеней), так и для создания новых лекарственных средств. Мишенями в данном случае могут являться, например, различные факторы роста, гормоны, ферменты, рецепторы на клеточной поверхности, токсины, белки вирусов и патогенных микроорганизмов [13, 18, 84, 90, 93, 126]. Несколько лекарств на основе аптамеров в настоящее время проходят клинические испытания, а первый из препаратов уже поступил на фармацевтический рынок [84]. Кроме непосредственного применения аптамеров в качестве специфических ингибиторов, их можно использовать для поиска новых ингибиторов различных белков. С этой целью проводится направленный поиск молекул, конкурирующих с аптамером-ингибитором за связывание с белком-мишенью и, таким образом, взаимодействующих в том же участке белка, что и исходный аптамер [16].

3. Аптамеры находят широкое применение для детекции различных молекул-мишеней (в том числе в диагностических целях). Было показано, что аптамеры могут с успехом заменить антитела в методах ELISA, флуоресцентной гибридизации *in situ*, Вестерн-блоттинга и др. [66]. Аптамеры используют для измерения концентрации различных метаболитов и белковых факторов, для обнаружения токсинов, выявления специфических типов клеток и тканей, клеток болезнетворных микроорганизмов [15, 21, 59, 62, 93]. Кроме того, аптамеры, как и антитела, можно использовать для аффинной очистки и идентификации белков-мишеней [42, 82, 93].

Наиболее перспективным, с точки зрения диагностики, является создание микрочипов, содержащих в своем составе большое количество аптамеров, которые могут быть использованы для одновременного анализа многих молекул-мишеней [12, 23, 80]. В настоящее время

созданы чипы, позволяющие анализировать некоторые факторы роста в крови человека [8]. В дальнейшем предполагается создать микрочипы для анализа экспрессии большого числа различных белков человеческой клетки, что должно иметь огромное значение для развития методов диагностики различных заболеваний, а также в фундаментальных исследованиях [44, 91, 116].

Разнообразные эксперименты по отбору аптамеров, а также возможности практического применения аптамеров в различных областях биологии и медицины подробно рассмотрены в нескольких недавних обзорах [13, 46, 59, 84, 93, 127]. Кроме того, описание технологии получения аптамеров и различных модификаций метода SELEX можно найти на сайте компании SomaLogic (www.somallogic.com), а также в описаниях патентов, ссылки на которые приводятся на данном сайте. В данном обзоре кратко рассмотрены основные методы получения аптамеров к различным белковым мишеням; наибольшее внимание уделяется возможностям направленного отбора аптамеров, обладающих заданными функциональными характеристиками.

II. МЕТОДЫ ОТБОРА АПТАМЕРОВ

ОБЩАЯ СХЕМА ОТБОРА

Для отбора аптамеров используют комбинаторные библиотеки олигонуклеотидов, которые содержат центральный район со случайной последовательностью, окруженный двумя районами с фиксированными последовательностями (см. рис. 1). Фиксированные последовательности необходимы для амплификации библиотеки при проведении отбора. оцДНК-библиотеку получают стандартными методами синтеза одностранных олигонуклеотидов, при синтезе случайного района в реакцию добавляют смесь всех четырех производных дезоксирибонуклеотидов. Для получения РНК-библиотеки в 5'-концевую область оцДНК-библиотеки вводят промоторную последовательность для РНК-полимеразы бактериофага T7, при помощи ПЦР получают дцДНК и проводят транскрипцию *in vitro*.

Ключевой стадией отбора аптамеров является разделение комплексов олигонуклеотидов с молекулой-мишенью и несвязавшихся олигонуклеотидов. В экспериментах по отбору аптамеров к белкам для этого используют несколько основных методов.

1. Белок-мишень иммобилизуют на каком-либо аффинном сорбенте; несвязавшиеся олигонуклеотиды удаляют промывкой буферным раствором, а связавшиеся элюируют и используют для дальнейшего отбора (см., напр., [9, 72]).

2. Комплексы белка с олигонуклеотидами сорбируют на нитроцеллюлозных фильтрах (нитроцеллюлоза неспецифически связывает белки, но не взаимодействует с нуклеиновыми кислотами) [97, 110].

3. Комплексы белка с олигонуклеотидами отделяют от свободных олигонуклеотидов при помощи гель-электрофореза в денатурирующих условиях (напр., [108]).

4. Смесь олигонуклеотидов с белком-мишенью разделяют при помощи электрофореза в капиллярах (без использования гелей) [3, 33, 81].

5. При использовании в качестве мишеней различных макромолекулярных объектов (клеток, вирусов) комплексы со связанными олигонуклеотидами отделяют от несвязавшихся последовательностей при помощи центрифугирования [7, 19, 62].

Иногда в ходе одной процедуры SELEX чередуют несколько способов отбора, что увеличивает эффективность селекции и позволяет избежать отбора последовательностей, взаимодействующих с используемым при отборе сорбентом или с примесными белками в препарате белка-мишени. Кроме того, для подавления отбора последовательностей, специфически связывающихся с сорбентом, библиотеку перед каждым раундом отбора инкубируют с сорбентом в отсутствие белка-мишени, что позволяет исключить данные последовательности из отбора.

После проведения каждого раунда отбора последовательности, связавшиеся с молекулой-мишенью, амплифицируются с использованием праймеров, соответствующих фиксированным областям библиотеки. В случае РНК-аптамеров этой стадии предшествует реакция обратной транскрипции. Амплифицированная дцДНК используется для получения обогащенной библиотеки одонитевых олигонуклеотидов, которая затем используется в следующем раунде отбора. При отборе РНК-аптамеров обогащенную РНК-библиотеку получают при помощи транскрипцию *in vitro*. оцДНК может быть получена несколькими методами: (1) в один из праймеров, используемых для амплификации, вносят остаток биотина, цепи ДНК разделяют в денатурирующих условиях на колонке со стрептавидином (напр., [83]); (2) оцДНК получают в реакции асимметричной ПЦР в условиях большого избытка одного из праймеров [38]; (3) на 5'-конец одного из праймеров вносят какие-либо химические группы (например, несколько остатков биотина, флуоресцентные красители и др.), что позволяет разделить две цепи ДНК по размеру при помощи электрофореза в денатурирующих условиях [82]; (4) в 5'-конец одного из праймеров вносится фосфатная группа, и дцДНК, полученная после амплификации, обрабатывается экзонуклеазой фага λ , которая расщепляет фосфорилированную цепь ДНК [42].

В результате отбора происходит постепенное обогащение библиотеки последовательностями, обладающими повышенным сродством к мишени. Обычно в ходе успешного отбора аффинность библиотеки к мишени повышается на несколько порядков. В среднем для получения аптамеров бывает достаточно провести 5–15 раундов отбора. Однако, в некоторых случаях значительное обогащение библиотеки последовательностями, специфичными для белка-мишени, становится заметным уже после первых раундов отбора [3, 5, 42]. Когда аффинность перестает увеличиваться, обогащенную библиотеку клонируют и проводят определение последовательностей индивидуальных аптамеров.

Характеристики аптамеров, получаемых в ходе эксперимента, в основном определяются конкретными условиями отбора. В частности, условия отбора влияют на аффинность, специфичность и вторичную структуру аптамеров, определяют зависимость связывания аптамеров от присутствия в растворе различных ионов и других низкомолекулярных соединений и др. Таким образом, изменяя структуру библиотеки олигонуклеотидов, условия инкубации библиотеки с белком-мишенью и метод разделения связанных и несвязанных олигонуклеотидов, можно получать аптамеры с заданными свойствами.

БИБЛИОТЕКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОТБОРА

1. Классические библиотеки.

В большинстве экспериментов по отбору аптамеров используют библиотеки, содержащие случайный район длиной 20–60 нт. (в некоторых случаях от 8 до 220 нт.). Было предположено, что использование библиотек с более длинным случайным районом может способствовать более эффективному отбору аптамеров, так как более длинные последовательности способны формировать большее разнообразие различных структур [25]. В то же время количество ДНК или РНК, используемое при отборе, обычно составляет 10^{-8} – 10^{-10} М, или 10^{14} – 10^{16} молекул, что соответствует общему количеству различных вариантов последовательностей для олигонуклеотида длиной 25 нуклеотидов ($4^{25} \approx 10^{15}$). Таким образом, библиотеки со случайным районом длиннее 25 нт. являются сильно недопредставленными и содержат такое же число разных вариантов последовательностей, что и более короткие библиотеки. Действительно, при отборе аптамеров к обратной транскриптазе вируса HIV-1 при использовании РНК-библиотек со случайным районом длиной 32, 70 и 80 нт. были получены аптамеры одинаковой структуры [17, 111]. Более того, в эксперименте по отбору аптамеров к изолейцину было показано, что при увеличении

длины случайного района больше 70 нт. происходит уменьшение эффективности отбора аптамеров [76].

В различных экспериментах SELEX используются как РНК, так и оцДНК библиотеки. Анализ большого числа различных аптамеров показывает, что оцДНК-аптамеры по своей аффинности и специфичности не отличаются от РНК-лигандов [10]. Преимущество РНК-аптамеров заключается в том, что они могут быть экспрессированы внутри клеток, что может иметь важное значение при проведении исследований *in vivo*. В то же время ДНК-аптамеры обладают большей стабильностью в широком диапазоне условий. В связи с этим ДНК-аптамеры получают в последнее время все более широкое распространение [10].

2. *Библиотеки с фиксированной структурой (structurally constrained libraries).*

В некоторых экспериментах при отборе используют библиотеки с заданной вторичной структурой.

В этом случае случайный район помещается между фиксированными последовательностями, способными формировать определенную вторичную структуру (шпильку, G-квартет, псевдоузел). Данный прием используется в том случае, если известно, какую вторичную структуру РНК или ДНК способен узнавать белок-мишень, или для увеличения общей стабильности отбираемых аптамеров (см., напр., [6, 54, 55, 57, 110]).

3. *Библиотеки на основе известной последовательности.*

Библиотеки данного типа содержат случайный район на основе какой-либо известной последовательности (например, полученного ранее аптамера), но при синтезе каждой позиции этого района кроме нуклеотида, соответствующего исходной последовательности, используют также небольшое количество остальных трех нуклеотидов (от 1 % до 30 %). Это позволяет получить библиотеку олигонуклеотидов, в различной степени похожих на исходную последовательность (т.н. *doped library*, от англ. *dope* – примесь). Проведение отбора с использованием данной библиотеки позволяет выявить различные варианты исходной последовательности, способные взаимодействовать с молекулой-мишенью. Данный подход применяется для оптимизации связывания полученных ранее последовательностей, а также для выявления нуклеотидов аптамера, которые наиболее важны для связывания [17, 61, 70].

4. *Библиотеки, не содержащие фиксированных последовательностей.*

Данные библиотеки используют для минимизации размеров аптамера (табл.). Во многих случаях участки фиксированных

Таблица.
Различные модификации метода SELEX и их применение

Метод SELEX	Особенности метода	Применение
genomic SELEX	Использование библиотеки на основе геномных последовательностей	Поиск природных последовательностей, узнаваемых различными молекулами
tailored SELEX	Использование библиотеки без фиксированных последовательностей	Минимизация размеров аптамеров
mirror-image SELEX	Использование при отборе энантиомеров природных соединений	Получение шпигельмеров – аптамеров, устойчивых к действию нуклеаз
covalent SELEX	Отбор олигонуклеотидов, образующих ковалентные сшивки с белком-мишенью	Получение фотоаптамеров и создание микрочипов на их основе
toggle SELEX	Чередование при отборе нескольких белков-мишеней	Получение аптамеров с различным уровнем специфичности
blended SELEX	Использование библиотеки олигонуклеотидов, ковалентно связанных с каким-либо лигандом к белку-мишени	Сайт-направленный отбор аптамеров к определенному участку белка-мишени
conditional SELEX	Проведение отбора в присутствии молекулы-регулятора	Получение регулируемых и сигнальных аптамеров, связывание которых с мишенью зависит от молекулы-регулятора

последовательностей исходной библиотеки необходимы для формирования правильной структуры аптамера, и их удаление нарушает связывание с молекулой-мишенью. Для получения аптамеров, не включающих в свой состав фиксированных последовательностей и, таким образом, имеющих меньшие размеры, был предложен метод *tailored* SELEX (от англ. *tailor* – шить, сшивать). В этом случае при отборе используют библиотеку, содержащую очень короткие фиксированные участки (4–6 нт.) по обеим сторонам от случайного района. После каждого раунда отбора к ним при помощи реакции лигирования присоединяют адапторные последовательности, которые используют для амплификации, а перед проведением следующего раунда отбора удаляют [113].

5. Библиотеки на основе геномных последовательностей (*genomic SELEX*).

Данные библиотеки используют для поиска сайтов связывания различных белков с геномными последовательностями ДНК и РНК (например, в случае факторов транскрипции, сплайсинга, регуляторов трансляции) (табл.) [47, 101]. Для создания таких библиотек геномную ДНК фрагментируют на достаточно короткие участки (50–500 нт.) и присоединяют к ним участки фиксированной последовательности. При анализе последовательностей РНК в один из фиксированных участков вносят последовательность T7-промотора. Дальнейший отбор последовательностей, связывающихся с белком-мишенью, проводят стандартными методами.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Проведение отбора *in vitro* позволяет использовать олигонуклеотиды, в состав которых введены химически модифицированные нуклеотиды. Модификации вносятся в 2'-положение нуклеотидов, в 5-положение пиримидинов, 7- и 8-положение пуринов и др. (подробное описание различных модификаций можно найти в обзорах [35, 36, 74, 127]). Существует два альтернативных подхода к получению модифицированных аптамеров. В первом из них модифицированные олигонуклеотиды используются непосредственно при проведении отбора. Главное ограничение в этом случае заключается в том, что модификация не должна значительным образом влиять на способность нуклеотида служить субстратом для РНК- или ДНК-полимеразы. При втором подходе изменениям подвергаются уже полученные аптамеры. При этом значительно увеличивается разнообразие доступных модификаций (так как нет ограничения на их совместимость с энзимологией синтеза РНК и ДНК), однако многие изменения могут приводить к уменьшению сродства аптамеров к их мишеням. В связи с этим приходится проводить поиск модификаций, не влияющих на взаимодействие аптамера с мишенью.

Модификации вносятся для достижения следующих целей.

1. Введение различных модификаций значительно увеличивает потенциальное разнообразие олигонуклеотидов; считается также, что дополнительные функциональные группы могут обеспечить большее количество контактов между аптамерами и их мишеням, что должно способствовать получению аптамеров с большей аффинностью и специфичностью к своим мишеням [36, 112, 120].

2. Многие модификации аптамеров (особенно в 2'-положении рибозы при введении F- или NH₂-группы) делают их устойчивыми к

воздействию нуклеаз, что имеет огромное значение при использовании аптамеров в диагностических и терапевтических целях [36, 66, 84]. Одним из способов получения аптамеров, устойчивых к воздействию нуклеаз, является использование зеркальных аналогов природных нуклеотидов (на основе L-рибозы или L-дезоксирибозы). Данные аптамеры получили название шпигельмеров (от нем. *spiegel* – зеркало), а метод их отбора был назван «зеркальным» SELEX (*mirror-image SELEX*) (табл.) [114]. Так как РНК- и ДНК-полимеразы не способны осуществлять полимеризацию L-нуклеотидов, то отбор в этом случае производится стандартным образом (с использованием D-нуклеотидов), но в качестве мишени используется энантиомер природного соединения (например, пептид, состоящий из D-аминокислот). После определения первичной структуры полученных аптамеров синтезируется L-вариант олигонуклеотида, который по законам симметрии оказывается способен взаимодействовать с природной мишенью (например, L-пептидом) [113, 114, 122]. Олигонуклеотиды, состоящие из L-нуклеотидов, обладают очень высокой стабильностью, так как не узнаются природными нуклеазами.

3. Использование при отборе модифицированных олигонуклеотидов, содержащих функциональные группы, которые могут быть активированы при облучении (например, 5-йод-, 5-бром и 4-тиоуридин), позволяет получить аптамеры, способные к образованию ковалентных сшивок с белком-мишенью (так называемые фотоаптамеры) ([51, 67]). При этом в каждом раунде отбора производится облучение комплексов олигонуклеотидов с белком-мишенью ультрафиолетовым светом и отбор последовательностей, образовавших сшивку (например, при помощи электрофореза в денатурирующих условиях). Метод получения фотоаптамеров получил название «ковалентного» SELEX (*covalent SELEX*) (табл.). Использование фотоаптамеров значительно повышает специфичность узнавания белка-мишени, так как для образования сшивки кроме простого связывания аптамера с белком необходимо правильное взаимное расположение участков нуклеиновой кислоты и белка, образующих сшивку [91, 102]. Технология получения аптамеров, способных к образованию ковалентных сшивок с белками-мишенями, используется в настоящее время для создания микрочипов для анализа экспрессии различных белков человека [8, 51].

4. Внесение в состав аптамера флуоресцентных групп используется для анализа его связывания с белком-мишенью [87]. Наибольшее значение это имеет при использовании аптамеров для детекции различных молекул-мишеней. В простейшем случае связывание

можно детектировать по изменению флуоресценции аптамера, которое вызывается изменениями окружения флуоресцентной группы при образовании комплекса. Кроме того, разработаны методы, позволяющие направленно отбирать аптамеры, флуоресценция которых изменяется при связывании с молекулой-мишенью [53, 87, 104, 124].

АНАЛИЗ АПТАМЕРОВ

После проведения отбора производится исследование характеристик индивидуальных аптамеров и изучается их взаимодействие с мишенью. Схема стандартного эксперимента выглядит следующим образом.

1. Проводится анализ индивидуальных последовательностей, полученных после отбора. На основании гомологии друг другу они группируются в несколько классов. Последовательности каждого из классов исследуются на способность взаимодействовать с белком-мишенью. Для дальнейших исследований отбираются последовательности, обладающие наибольшей аффинностью к мишени.

2. Анализ консервативных мотивов последовательности аптамера используется для предсказания вторичной структуры, характерной для каждого из классов. В настоящее время созданы специализированные программы, позволяющие предсказывать вторичную структуру аптамеров на основе анализа родственных последовательностей внутри одного класса аптамеров [32]. Предсказания структуры проверяются при помощи расщепления аптамеров различными реагентами (химическими соединениями и нуклеазами), специфичными к одно- или двунитевым участкам нуклеиновых кислот.

3. Определяются минимальные размеры аптамера, достаточные для взаимодействия с белком-мишенью. Для этого на основании предсказаний вторичной структуры синтезируются несколько укороченных вариантов олигонуклеотида и проверяется их способность связываться с белком. Минимизация размеров аптамеров особенно важна при их использовании в диагностических и терапевтических целях, так как уменьшение длины аптамера приводит к увеличению специфичности его действия, а также значительно снижает стоимость его производства.

4. Проводится исследование структуры комплекса аптамера с белком-мишенью. Использование различных методов футпринтинга (чаще всего футпринтинг гидроксильными радикалами и различными нуклеазами) позволяет установить, какие участки аптамера непосредственно взаимодействуют с белком. Важность отдельных нук-

леотидов для взаимодействия с мишенью проверяется путем анализа мутационных вариантов аптамера. Контакты аптамера с белком-мишенью могут быть также исследованы при помощи методов ковалентных сшивок, что позволяет выявить участок белка, а в некоторых случаях даже конкретную аминокислоту, с которой взаимодействует аптамер [105]. Эти данные могут быть использованы для создания трехмерной модели комплекса аптамера с белком.

5. Наконец, исследуется влияние аптамера на свойства белка-мишени. Как правило, аптамеры являются ингибиторами активности своих мишеней. Однако в некоторых случаях аптамеры способны оказывать стимулирующее воздействие на активность белка (см., напр., [28, 52]).

III. ХАРАКТЕРИСТИКИ АПТАМЕРОВ

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АПТАМЕРОВ

Характерной особенностью аптамеров является способность к формированию выраженной вторичной структуры. Во многих случаях было показано, что наиболее важными для специфического взаимодействия аптамеров с мишенями являются неспаренные участки олигонуклеотида, а участки со стабильной вторичной структурой необходимы для поддержания правильного взаиморасположения элементов узнавания ([89, 94]). Это подтверждается тем, что многие участки аптамеров в свободном виде неструктурированы (например, петли в шпильках) и приобретают стабильную конформацию только после связывания с мишенью [26, 58, 89].

Обычно в основе аптамера лежит один-два структурных мотива. Наиболее часто в аптамерах встречаются следующие структурные элементы (рис. 1).

1. Шпильки различной структуры. Это один из самых распространенных мотивов вторичной структуры, встречающихся как в РНК, так и в ДНК- аптамерах.

2. Псевдоузлы. Структура псевдоузла образуется в результате элементарных взаимодействий последовательности, ограничивающей шпильку справа или слева, с последовательностью петлевого участка шпильки. Псевдоузлы наиболее характерны для РНК-аптамеров, но встречаются также и в последовательностях ДНК [94, 98, 111].

3. Четырехнитевые структуры (квадруплексы). Поперечное сечение квадруплекса, как правило, образовано четверкой гуаниновых нуклеотидов (G-квартетом). Каждое гуаниновое основание в G-квар-

тете образует водородные связи с двумя соседними основаниями. Обычно в составе квадруплекса присутствуют 2–3 расположенных подряд G-квартета. Подобные структуры обладают очень высокой стабильностью по сравнению с более простыми структурными мотивами. Дополнительная стабилизация квадруплекса происходит в присутствии ионов K^+ , которые координируются между плоскостями двух соседних G-квартетов [68]. G-квартетные структуры оказались наиболее характерны для ДНК-аптамеров, хотя в некоторых случаях они были найдены и в РНК-лигандах [2, 9, 72, 99, 105, 117, 118]. Предполагается, что во всех случаях структурный мотив G-квартета служит архитектурной основой аптамера, а в узнавании белка участвуют нуклеотиды в переменных петлях, расположенных между тяжами квадруплекса.

АФФИННОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

В большинстве экспериментов в результате отбора удается получить аптамеры, взаимодействующие со своими мишенями с очень высокой аффинностью. Белки являются наилучшими мишенями для отбора аптамеров, и константы диссоциации (K_d) комплексов аптамеров с белковыми мишенями обычно лежат в наномолярном и субнаномолярном диапазоне (10^{-11} – 10^{-9} М). В случае различных низкомолекулярных мишеней K_d обычно составляют 10^{-6} – 10^{-7} М [46]. Более высокое сродство аптамеров к белковым мишеням, вероятно, объясняется тем, что в таких комплексах больше площадь контакта аптамера с молекулой-мишенью [34].

Кроме высокой аффинности, аптамеры также обычно обладают большой специфичностью к молекуле-мишени. Было предположено, что отбор на высокое сродство к мишени автоматически приводит к идентификации высокоспецифичных лигандов [34]. Это связано с тем, что наиболее аффинные лиганды, как правило, имеют большую площадь взаимодействий с мишенью и образуют с ней очень плотные «комплементарные» контакты. В результате даже минимальные изменения поверхности мишени (в случае близкородственных белков) могут значительно ослаблять взаимодействия с аптамером.

Вместе с тем способность аптамеров различать похожие белки в каждом конкретном случае, видимо, определяется тем, в каком участке белка-мишени происходит связывание. Если аптамер связывается с переменным районом белковой молекулы, то взаимодействие будет более специфичным, чем при связывании с консервативным районом, так как в первом случае узнаваемый эпитоп будет сильнее отличаться даже у родственных белков. Соответственно, уровень гомологии

белков, определяющий границу специфичности аптамеров, может различаться в разных случаях. Так, аптамеры к белку Rev вируса HIV-1 узнают также белок вируса HIV-2, хотя эти белки идентичны всего на 65% [125]. В то же время аптамеры к протеин-киназе С не взаимодействуют с близкородственной изоформой фермента, отличающейся всего на 4% [24]. При анализе аптамеров к тромбину [109], репликазе вируса гепатита С [6], обратной транскриптазе вируса HIV-1 [41] были получены точечные мутации в белке-мишени, которые приводили к значительному ухудшению связывания аптамера с мишенью (Кд комплексов увеличивалась более чем в 100 раз). Таким образом, можно сделать вывод, что аптамеры способны различать белки, отличающиеся единственной аминокислотной заменой.

Специфичность аптамеров к белку-мишени можно регулировать в процессе отбора. Так, если требуется получить аптамер, обладающий очень высокой специфичностью, то в ходе SELEX необходимо отбирать последовательности, связывающиеся с белком-мишенью, но не взаимодействующие с другим, близкородственным белком. Напротив, если необходимо получить аптамер, способный узнавать несколько родственных белков (например, белки-ортологи из разных организмов), то при проведении эксперимента отбирают последовательности, способные связываться с несколькими белками-мишенями (данная процедура получила название *toggle-SELEX*, от англ. *toggle* – переключать (табл.) [119]).

ЭПИТОПЫ, УЗНАВАЕМЫЕ АПТАМЕРАМИ

Аптамеры к белкам, как и антитела, узнают специфические участки поверхности мишени, которые получили название эпитопов. Считается, что большинство аптамеров узнают *структурированные* эпитопы на белках-мишенях [34, 46, 91]. Так как при отборе аптамеров в качестве мишени обычно используют полноразмерные белки, находящиеся в нативном состоянии, то в состав эпитопа, узнаваемого аптамерами, могут входить несколько участков белка, сближенных в трехмерной структуре. Это отличает аптамеры от антител, которые селекционируются в организме на связывание с достаточно короткими фрагментами процессированного белка-мишени. Тем не менее, известны примеры аптамеров, способных узнавать короткие пептиды [123] и денатурированные белки [5]. Вероятно, в этих случаях взаимодействие происходит по принципу индуцированного сродства, и при связывании с аптамером пептид приобретает определенную конформацию [42, 58, 123].

Анализ большого числа экспериментов показывает, что в ходе отбора один эпитоп белка-мишени может стать доминантным при наличии многих других потенциальных сайтов связывания олигонуклеотидов. Было обнаружено, что даже при наличии существенных различий в нескольких экспериментах по отбору аптамеров полученные лиганды часто имеют общую структуру и связываются с одним и тем же эпитопом белка-мишени. Одним из наиболее ярких примеров может служить отбор аптамеров к обратной транскриптазе вируса HIV-1. В трех независимых экспериментах были использованы три различные РНК-библиотеки и разные схемы отбора [17, 111]. Тем не менее, во всех случаях подавляющее большинство отобранных последовательностей формировало один и тот же класс аптамеров, имеющих структуру псевдоузла, и связывающихся в области природного РНК-связывающего центра фермента. В другом эксперименте было обнаружено, что использование в качестве мишени для отбора аптамеров изолированного рибосомного белка S1, целой 30S-субчастицы рибосомы, а также репликазы фага Q β приводит к выявлению одного и того же класса аптамеров, которые взаимодействуют с белком S1, входящим в состав всех трех мишеней [14, 94].

Оказалось, что часто даже разные классы аптамеров, отличающиеся по последовательности и трехмерной структуре, также связываются с одинаковыми или перекрывающимися эпитопами белка-мишени. В качестве примера можно привести аптамеры к обратной транскриптазе вируса HIV-1 [22, 98], к ДНК-полимеразе *T. aquaticus* [29], фактору элонгации трансляции EF-Tu [29], РНК-полимеразе *E. coli* [72]. Таким образом, можно сделать вывод, что один и тот же эпитоп белка способен связывать несколько аптамеров, обладающих различной последовательностью и, вероятно, вторичной и третичной структурой. Стоит отметить, что в случае РНК- и ДНК-связывающих белков аптамеры обычно связываются в естественных сайтах связывания нуклеиновых кислот [29, 72, 111]. Данный феномен, вероятно, можно объяснить асимметричным распределением зарядов по поверхности белков: как правило, участки молекулы, взаимодействующие с РНК или ДНК, несут частичный положительный заряд, в то время как вся остальная поверхность является нейтральной или заряжена отрицательно [30, 111].

Эффект доминирования одного (или очень небольшого числа) эпитопов наиболее ярко проявляется при отборе аптамеров к так называемым сложным мишеням (complex targets), которые содержат большое количество разных белков. В качестве примеров можно привести эксперименты по отбору аптамеров к вирусным частицам

[88], клеткам трипаносом [62], мембранам эритроцитов [82], культурам клеток [19, 60], плазме крови [42], кровеносным сосудам [7] и др. Во всех перечисленных случаях в результате отбора было получено лишь несколько классов аптамеров, несмотря на наличие многих тысяч различных белковых мишеней. Так, аптамеры, полученные к клеткам глиобластомы, оказываются специфичны к белку внеклеточного матрикса TN-C (tenascin-C) [60]. Мишенью аптамеров к трансформированным эндотелиальным клеткам является белок *rigren* [7]. В случае отбора аптамеров к белкам плазмы крови большая часть лигандов оказывается специфична к протромбину [42]. При отборе аптамеров к активированным нейтрофилам получены лиганды, узнающие экспонированную на мембране нейтрофилов эластазу и имеющие ту же структуру, что и аптамеры, полученные ранее к изолированной эластазе [20].

Эффект доминирования при отборе ограниченного числа различных эпитопов, по-видимому, объясняется самой природой отбора *in vitro*, в ходе которого осуществляется преимущественная амплификация небольшого числа последовательностей, которые с наибольшей эффективностью связываются с мишенью, в то время как остальные последовательности постепенно исключаются из библиотеки. Действительно, при анализе динамики отбора аптамеров к белкам плазмы крови человека было обнаружено, что на начальных стадиях отбора в обогащенной библиотеке присутствуют аптамеры ко многим белкам плазмы, в то время как при дальнейшем проведении отбора количество разных классов аптамеров значительно сокращается [42]. Таким образом, сокращение числа раундов при отборе может приводить к выявлению большего числа разных классов аптамеров. С этой точки зрения, наиболее перспективным является разработанный недавно метод отбора аптамеров при помощи капиллярного электрофореза, который позволяет получать высокоаффинные аптамеры в одну стадию, без проведения амплификации библиотеки [3, 4].

IV. САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ ОТБОР АПТАМЕРОВ

Во многих случаях задачей исследования является получение аптамеров к определенному эпитопу белка-мишени, например, лигандов к различным доменам белка, к активному центру или субстрат-связывающему центру ферментов и т. д. При анализе сложных биологических мишеней в задачи исследования часто входит получение лигандов к максимально большому числу разнообразных белков.

Однако в результате доминирования одного или нескольких эпитопов мишени достижение этой цели при проведении ненаправленного отбора часто оказывается невозможным. В данном разделе кратко рассмотрены различные методы, позволяющие избежать отбора аптамеров к какому-либо нежелательному эпитопу, или, наоборот, получать лиганды к конкретным эпитопам белков-мишеней.

Для подавления доминирующего эпитопа мишени и получения аптамеров к другим участкам белка (или к другим белкам в случае сложных мишеней) используют следующие методы.

1. При отборе используют библиотеки разной структуры. В нескольких экспериментах было показано, что использование РНК и ДНК библиотек может привести к получению аптамеров к различным эпитопам одной и той же мишени. Так, описано получение РНК- и ДНК-аптамеров к тромбину, которые связываются в разных участках молекулы и по-разному влияют на функциональные свойства тромбина [9, 71].

2. Доминирующий сайт связывания нуклеиновых кислот можно экранировать различными полианионными конкурентами связывания нуклеиновых кислот: гепарином [106], poly(dA-dT), тРНК [1], неамплифицируемой случайной библиотекой [67, 125] и др. В этом случае отбор либо может быть направлен к другому эпитопу мишени, либо привести к идентификации более аффинных аптамеров к прежнему сайту связывания.

3. Для экранирования доминирующего эпитопа можно использовать полученные ранее аптамеры, узнающие данный сайт белка (см., напр., [73]).

4. Для того, чтобы исключить какой-либо эпитоп белка-мишени из отбора, можно использовать модифицированную форму белка, у которого отсутствует данный эпитоп.

5. Аналогичного результата можно достичь, используя процедуру *контрселекции (counter-selection)*, которая позволяет исключить из олигонуклеотидной библиотеки последовательности, специфичные для данного эпитопа. Эта процедура заключается в том, что в некоторых раундах проводится отбор последовательностей, которые *не взаимодействуют* с конкретным эпитопом белка-мишени. Так, при ненаправленном отборе аптамеров к Q β -репликазе селекционируются аптамеры, узнающие белок S1. Направление отбора удается изменить, проводя контрселекцию аптамеров против 30S-субчастицы рибосомы. При этом последовательности, узнающие белок S1, взаимодействуют с рибосомой и исключаются из дальнейшего отбора [14].

6. Для удаления последовательностей доминирующего класса был предложен метод их направленной деградации при помощи РНКазы H. Для этого библиотеку инкубируют с короткими олигонуклеотидами (8–12 нт.), комплементарными участку последовательности доминирующего класса аптамеров. В случае РНК-библиотеки используются ДНК-олигонуклеотиды и наоборот. РНКазы H специфически опознает и расщепляет участки РНК/ДНК гибрида, что приводит к уничтожению данного класса последовательностей [100].

7. При отборе аптамеров к мишеням, состоящим из большого количества белков, перед проведением отбора можно удалить белок, содержащий доминирующий эпитоп. Например, при отборе аптамеров к малой субчастице рибосомы для того, чтобы избежать отбора аптамеров к белку S1, в качестве мишени были использованы 30S-субчастицы, не содержащие данного белка [94]. Одним из способов удаления доминирующего белка из сложных мишеней, содержащих смесь многих белков, является связывание его на аффинной колонке с аптамером, специфичным к данному белку. Использование обедненной мишени в последующем эксперименте по отбору позволяет идентифицировать новые классы аптамеров, специфичных к другим белкам. Последовательное применение данной процедуры может быть использовано для идентификации большого количества белков и анализа состава сложных мишеней [42].

Для получения аптамеров к какому-либо конкретному эпитопу белка-мишени используются следующие методы направленного отбора.

1. Одним из наиболее простых методов направленного отбора аптамеров является конкурентная элюция последовательностей, связанных с молекулой-мишенью, другими лигандами, специфичными к конкретному сайту мишени (рис. 2А). В качестве примера можно привести отбор аптамеров к агглютинину (элюция проводилась аналогом природного субстрата триацетил-хитотриозой [11]) и *Pe*-тРНК-синтазе (для отбора аптамеров к сайту связывания тРНК элюция проводилась *Pe*-тРНК, [52]). Аналогичная методика может быть использована для отбора аптамеров-ингибиторов, взаимодействующих с сайтами связывания многих известных антибиотиков. Недостаток метода конкурентной элюции заключается в том, что элюция подвергается только те последовательности, которые находятся в быстром равновесии с раствором, а аптамеры, образующие наиболее прочные комплексы, остаются связанными с белком и теряются при отборе. Этого недостатка можно избежать, если в каждом раунде отбора сначала отбирать последовательности,

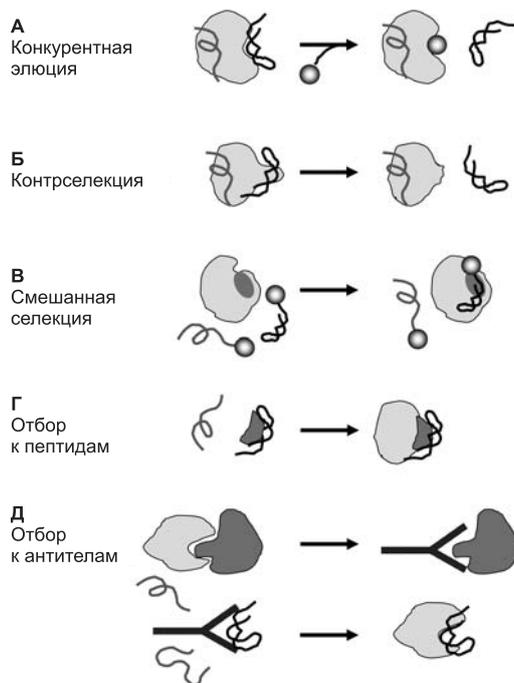


Рис. 2. Основные методы сайт-направленного отбора аптамеров.

А. Метод конкурентной элюции аптамеров при помощи другого лиганда, связывающегося в данном сайте белка.

Б. Метод контрселекции. В ходе эксперимента отбираются последовательности, взаимодействующие с полноразмерным белком, но не связывающиеся с мутантным белком, лишенным данного эпитопа.

В. Метод смешанной селекции. Олигонуклеотиды, используемые при отборе, несут в своем составе какой-либо известный лиганд, специфичный к данному белку. Проведение отбора приводит к получению аптамеров, взаимодействующих с участком (показан темно-серым цветом) вблизи от сайта связывания данного лиганда.

Г. Отбор аптамеров к пептиду, соответствующему какому-либо эпитопу белка-мишени (показан темно-серым цветом). Полученные в результате аптамеры способны узнавать данный эпитоп в составе полноразмерного белка.

Д. Отбор аптамеров при помощи антиидиотипического подхода. На первой стадии получают антитела, специфичные к какому-либо белку-партнеру (показан темно-серым цветом), узнаваемому белком-мишенью (в качестве антигена можно использовать короткий пептид, соответствующий конкретному эпитопу). На второй стадии производится отбор аптамеров, взаимодействующих с полученными антителами. За счет комплементарности сайтов взаимодействия аптамеров, антител, белка-партнера и белка-мишени полученные аптамеры способны узнавать белок-мишень.

образующие прочные комплексы с белком-мишенью, а затем селективировать последовательности, не взаимодействующие с данным белком в присутствии конкурентного лиганда. Использование этого подхода позволило получить аптамеры к бактериальной РНК-полимеразе, которые прочно связывались в участке связывания рифампицина и являлись ингибиторами синтеза РНК [72].

2. Аптамеры к определенному домену белка-мишени могут быть получены при помощи процедуры контрсеlections (рис. 2Б). В этом случае при отборе библиотеку сначала инкубируют с целым белком-мишенью, а затем проводят селекцию олигонуклеотидов, не взаимодействующих с мутантной формой белка, у которого отсутствует тот участок, к которому требуется получить аптамеры. Подобная методика была использована, например, при отборе аптамеров к домену РНКазы Н обратной транскриптазы вируса HIV-1 [2]. Данная процедура может быть использована и в случае сложных мишеней. К примеру, при помощи подобного подхода были получены аптамеры, специфически взаимодействующие с трансформированными клетками глиобластомы и не узнающие нормальные клетки [7]. В качестве мишени и «контрмишени» в данном случае были использованы целые клетки, что позволило получить аптамеры, специфичные к одному из белков, присутствующему в мембранах трансформированных клеток. Было показано, что полученные аптамеры можно использовать в качестве гистологических маркеров для идентификации специфических типов клеток.

3. Отбор аптамеров к конкретному эпитопу можно направить, используя методику «смешанной» селекции (*blended SELEX*) (рис. 2В) (табл.). В этом случае к олигонуклеотидам случайной библиотеки присоединяется какой-либо низкомолекулярный лиганд, взаимодействующим с данным эпитопом белка. Это может быть сделано либо путем прямой ковалентной сшивки между лигандом и олигонуклеотидом (по 5'- или 3'-концу), либо за счет образования комплексных взаимодействий между фиксированной областью библиотеки и другим олигонуклеотидом, модифицированным используемым лигандом. Данный подход был применен, например, при отборе аптамеров-ингибиторов эластазы нейтрофилов человека [20]. В качестве «направляющего» лиганда был использован относительно малоактивный фосфонатный ингибитор сериновых протеаз, который ингибирует фермент, образуя стабильную ковалентную связь с серином активного центра. В результате проведения отбора были получены новые высокоспецифичные ингибиторы эластазы на основе аптамеров, эффективность действия которых в 100 раз превышала эффективность исходного ингибитора.

В некоторых случаях низкомолекулярный ингибитор может быть присоединен к аптамерам уже после проведения отбора. Так, ковалентное присоединение низкоаффинного тетрапептидного ингибитора эластазы к высокоаффинным ДНК-аптамерам, которые, однако, не являлись ингибиторами фермента, резко повысило эффективность ингибирования. Таким образом, аптамеры в данном случае послужили «якорем» для закрепления другого лиганда в своем сайте связывания [77].

Похожий метод можно использовать для селекции более высокоаффинных аптамеров, взаимодействующих поблизости от того же сайта мишени, что и уже полученные аптамеры «первого поколения». Для этого проводят SELEX с использованием библиотеки, в константные районы которой введены последовательности уже известных аптамеров [57].

1. В качестве мишени для отбора аптамеров можно использовать не полноразмерный белок, а отдельный домен белка (см., напр., [43]) или даже короткий пептид, соответствующий нужному эпитопу (рис. 2Г). Так, было показано, что аптамеры, полученные к пептиду белка Rev, взаимодействуют с полноразмерным белком и подавляют репликацию вируса HIV-1 [123]. Аптамеры к неструктурированному эпитопу прионного белка PrP человека узнают полноразмерный белок PrP и ингибируют образование инфекционной формы белка [92]. Данный метод позволяет получать аптамеры практически к любому белку с известной последовательностью (например, к различным гипотетическим белкам, идентифицированным в результате секвенирования геномов) [50]. Эффективность данного метода можно значительно увеличить, если после нескольких раундов отбора против изолированного пептидного фрагмента использовать в качестве мишени целый белок, что позволяет выбрать те из последовательностей, которые опознают искомый эпитоп в его нативной конформации. В случае, если очищенный препарат полноразмерного белка недоступен, в некоторых раундах отбора можно использовать сложные мишени (например, лизаты клеток), которые содержат данный белок [5, 50]. Так как в ходе проведения отбора против пептида библиотека оказывается обогащена лигандами к данному белку, присутствие в сложной мишени других белков не является препятствием для получения высокоспецифичных аптамеров.

2. Наконец, направленный отбор аптамеров может быть основан на антиидиотипическом подходе (рис. 2Д). Данный метод используется для получения аптамеров, мимикрирующих какой-либо другой лиганд к белку-мишени (например, другой белок, короткий

пептид или низкомолекулярное соединение). На первой стадии эксперимента получают антитела против этого лиганда. Затем отбирают аптамеры против полученных антител. Оказалось, что, как и в случае антиидиотипических антител, получаемые аптамеры оказываются способны взаимодействовать с исходным белком. Так, аптамеры к антителам против пептида белка CREB, который является субстратом для протеинкиназы MSK1, взаимодействуют с субстрат-связывающим центром данной протеинкиназы и являются эффективными и специфичными ингибиторами ее активности [57]. Аптамеры, полученные против антител, специфичных к сигналу ядерного экспорта (NES, nuclear export signal) белка Rev, взаимодействуют с белком системы ядерного экспорта CRM1 и блокируют Rev-зависимый экспорт РНК из ядра в цитоплазму [55, 56]. Более того, данные аптамеры сами экспортируются из ядра, что свидетельствует о высокой схожести их трехмерной структуры со структурой природного NES.

V. РЕГУЛИРУЕМЫЕ И СИГНАЛЬНЫЕ АПТАМЕРЫ. АПТАЗИМЫ

Методы отбора аптамеров, описанные в предыдущих разделах, позволяют получать высокоаффинные и специфичные аптамеры к различным белкам, но не дают возможности контролировать связывание аптамеров со своими мишенями. В то же время, во многих исследованиях желательнее использовать лиганды, связывание которых с белками-мишенями можно было бы регулировать. В частности, подобные аптамеры могут иметь большое значение при изучении функций различных белков на разных стадиях клеточного цикла и в процессе эмбрионального развития [115]. Группа методов отбора, позволяющая получать аптамеры, связывание которых с молекулой-мишенью изменяется в зависимости от присутствия другой молекулы-регулятора, получила название *conditional SELEX* (от англ. *condition* – условия) (табл.) [103]. В зависимости от целей эксперимента можно получать аптамеры, либо требующие для своего связывания с белком-мишенью какого-либо соединения, либо, наоборот, неспособные взаимодействовать с мишенью в его присутствии. В первом случае при проведении эксперимента отбирают последовательности, образующие комплекс с белком-мишенью только в присутствии молекулы-регулятора и не взаимодействующие с мишенью в его отсутствие (рис. 3А). Во втором случае все делается наоборот (рис. 3Б). Так, например, при отборе аптамеров к фор-

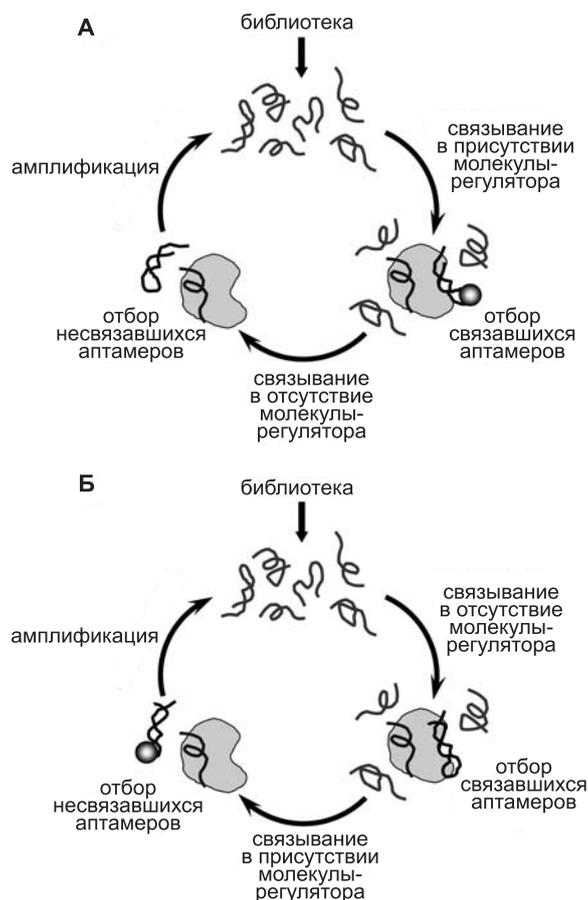


Рис. 3. Методы отбора регулируемых аптамеров.

А. Получение аптамеров, связывающихся с белком-мишенью только в присутствии другой молекулы-регулятора. Каждый раунд отбора проводится в две стадии. На первой стадии библиотека инкубируется с белком-мишенью в присутствии молекулы-регулятора и производится отбор связавшихся олигонуклеотидов. Затем полученные последовательности инкубируются с белком в отсутствие молекулы-регулятора и производится отбор несвязавшихся олигонуклеотидов. Селектированные таким образом последовательности амплифицируются и используются в следующем раунде отбора.

Б. Получение аптамеров, не связывающихся с белком-мишенью в присутствии молекулы-регулятора. На первой стадии отбора производится селекция олигонуклеотидов, взаимодействующих с мишенью в отсутствие регуляторной молекулы, а на второй стадии отбираются последовательности, не связывающиеся в ее присутствии.

мамидопиримидингликозилазе (фермент ДНК-репарации) связанные с белком олигонуклеотиды элюировали неомицином [115]. В результате были получены аптамеры, которые были не способны связываться с белком-мишенью в присутствии неомицина.

Аналогичный подход может быть применен для получения сигнальных аптамеров, которые при связывании с белком-мишенью генерируют какой-либо легкодетектируемый сигнал [59, 103]. Сигнальные аптамеры могут быть использованы для детекции различных молекул-мишеней. Так, например, при помощи данного метода можно получить аптамеры, которые связываются с молекулой-флуорофором в отсутствие белка-мишени, а при взаимодействии с белком-мишенью изменяют конформацию, что приводит к диссоциации флуорофора и увеличению сигнала флуоресценции. Один из возможных способов получения сигнальных аптамеров изображен на рис. 4А.

Метод SELEX позволяет получить аптамеры, которые обладают каталитической активностью, активируемой при связывании с молекулой-мишенью. Подобные аптамеры получили название аптазимов [40, 59]. Схема получения аптазимов приведена на рис. 4Б. Библиотека, используемая при получении аптазимов, содержит в своем составе последовательность какого-либо рибозима (например, hammerhead-рибозима, способного специфически расщеплять собственную последовательность), расположенную рядом с участком случайной последовательности. В ходе отбора производится селекция тех последовательностей, которые не обладают каталитической активностью в отсутствие молекулы-мишени, но осуществляют каталитическую реакцию в комплексе с мишенью. В качестве эффекторной молекулы при отборе аптазимов обычно используют различные метаболиты или короткие пептиды [59, 95]. Стоит отметить, что данный метод позволяет получать как РНК-, так и ДНК-аптазимы. Аптамеры данного типа также могут применяться для детекции молекул-мишеней [59]. Например, если при активации рибозима, содержащего в своем составе флуоресцентную группу и гаситель флуоресценции, происходит отщепление гасителя флуоресценции, то связывание молекулы-мишени можно детектировать по увеличению сигнала флуоресценции [16]. Кроме того, аптазимы можно использовать для создания искусственных систем регуляции генной экспрессии *in vivo*. Так, было показано, что если последовательность аптазима, регулируемого теофиллином, поместить в 5'-нетранслируемой области мРНК, то при экзогенном добавлении теофиллина к клеткам, экспрессирующим химерную мРНК, происходит активация аптазима и расщепление мРНК [31, 107].

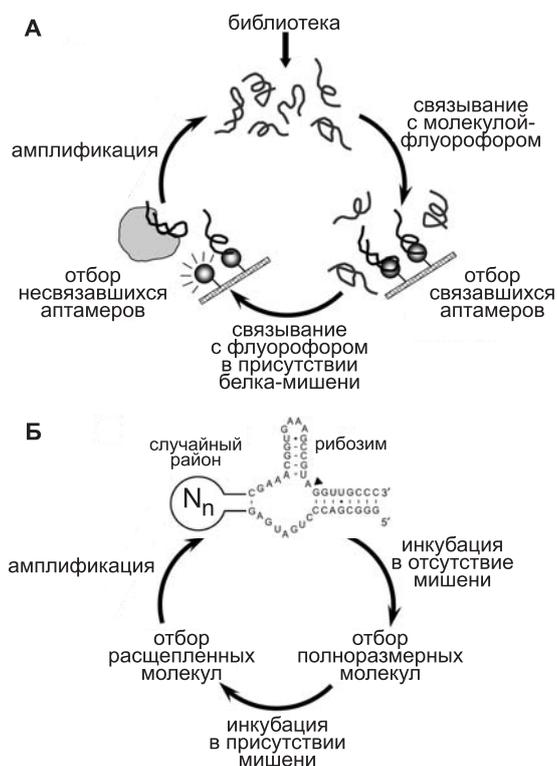


Рис. 4. Метод получения сигнальных аптамеров и аптазимов.

А. Схема получения сигнальных аптамеров, генерирующих флуоресцентный сигнал при взаимодействии с белком-мишенью. Каждый раунд отбора включает две стадии. На первой стадии селекционируются последовательности, способные взаимодействовать с какой-либо флуоресцентной молекулой. Для отбора таких последовательностей можно использовать сорбент, содержащий ковалентно-пришитые молекулы флуорофора. На второй стадии полученные последовательности инкубируют с белком-мишенью, а затем отбирают олигонуклеотиды, не связывающиеся с сорбентом, содержащим молекулы флуорофора. В результате применения подобной схемы отбора могут быть получены лиганды, которые связываются с флуорофором в отсутствие белка-мишени и диссоциируют в его присутствии, что приводит к увеличению сигнала флуоресценции.

Б. Схема получения аптазимов. При синтезе библиотеки случайный район присоединяется к последовательности рибозима, способного осуществлять реакцию расщепления РНК (точка разрыва РНК показана черной стрелкой). В результате присоединения случайного района разные молекулы РНК различаются по своей каталитической активности. В ходе отбора производится селекция тех последовательностей, которые не обладают активностью в отсутствие молекулы-мишени, но осуществляют реакцию расщепления при связывании с мишенью.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные в последние годы методы эволюции олигонуклеотидов *in vitro* позволяют проводить направленный отбор аптамеров, обладающих самыми различными характеристиками. Некоторые из разновидностей метода SELEX, о которых шла речь в данном обзоре, перечислены в таблице. Разнообразные эксперименты по отбору аптамеров наглядно демонстрируют, что нуклеиновые кислоты способны к специфическому узнаванию самых разных молекул. Несмотря на то, что аптамеры являются синтетическими последовательностями, полученными *in vitro*, данное свойство однонитевых молекул нуклеиновых кислот, по-видимому, имеет огромное значение и в живых системах. Давно известно, что многие клеточные процессы регулируются белками, специфически взаимодействующими с определенными последовательностями РНК. В качестве двух примеров можно назвать регуляцию сплайсинга белками сплайсосомы, которые специфически взаимодействуют с различными энхансерами сплайсинга в последовательностях экзонов [78], а также регуляцию трансляции бактерий за счет связывания белков-регуляторов с трансляционными операторами в 5'-концевой области мРНК [85, 121]. Последовательности, специфически узнаваемые такими белками, можно рассматривать в качестве природных аптамеров. Вероятно, в процессе эволюции может происходить направленный отбор последовательностей, взаимодействующих с самыми разными молекулами в клетке. Ярким подтверждением данной гипотезы является недавнее обнаружение в 5'-концевых областях многих бактериальных РНК последовательностей, которые способны специфически взаимодействовать с различными клеточными метаболитами (аминокислотами, коферментами) [75, 79, 86]. В зависимости от присутствия или отсутствия метаболитов-регуляторов данные последовательности образуют разную вторичную структуру, что позволяет регулировать транскрипцию либо трансляцию данного гена. Можно предположить, что подобные специфические взаимодействия различных белков и метаболитов клетки с нуклеиновыми кислотами распространены в природе гораздо шире, чем считалось ранее. Если это действительно так, то многие из таких взаимодействий могут быть выявлены экспериментально при помощи методов геномного SELEX, которые позволяют производить поиск природных аптамеров в геномных последовательностях [47-49, 64].

Автор выражает искреннюю благодарность А. Севостьяновой и Н. Бариновой за помощь в написании данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allen, P., Worland, S., Gold, L. (1995) *Virology*, **209**, 327–336.
2. Andreola, M.L., Pileur, F., Calmels, C., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., Toulme, J.J., Litvak, S. (2001) *Biochemistry*, **40**, 10087–10094.
3. Berezovski, M., Drabovich, A., Krylova, S.M., Musheev, M., Okhonin, V., Petrov, A., Krylov, S.N. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3165–3171.
4. Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A., Krylov, S.N. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1410–1411.
5. Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M.G., Reyes, G.B., Gonzalez Solveyra, C., Santa-Coloma, T.A. (2001) *J. Immunol. Methods*, **252**, 191–197.
6. Biroccio, A., Hamm, J., Incitti, I., De Francesco, R., Tomei, L. (2002) *J. Virol.*, **76**, 3688–3696.
7. Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M., Schluessener, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 16464–16468.
8. Bock, C., Coleman, M., Collins, B., Davis, J., Foulds, G., Gold, L., Greef, C., Heil, J., Heilig, J.S., Hicke, B., Hurst, M.N., Husar, G.M., Miller, D., Ostroff, R., Petach, H., Schneider, D., Vant-Hull, B., Waugh, S., Weiss, A., Wilcox, S.K., Zichi, D. (2004) *Proteomics*, **4**, 609–618.
9. Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J. A., Vermaas, E.H., Toole, J.J. (1992) *Nature*, **355**, 564–566.
10. Breaker, R.R. (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 26–31.
11. Bridonneau, P., Chang, Y.F., Buvoli, A.V., O'Connell, D., Parma, D. (1999) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **9**, 1–11.
12. Brody, E.N., Willis, M.C., Smith, J.D., Jayasena, S., Zichi, D., Gold, L. (1999) *Mol. Diagn.*, **4**, 381–388.
13. Brody, E.N., Gold, L. (2000) *J. Biotechnol.*, **74**, 5–13.
14. Brown, D., Gold, L. (1995) *Biochemistry*, **34**, 14765–14774.
15. Bruno, J.G., Kiel, J.L. (1999) *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 457–464.
16. Burgstaller, P., Jenne, A., Blind, M. (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **5**, 690–700.
17. Burke, D.H., Scates, L., Andrews, K., Gold, L. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 650–666.
18. Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., de Franciscis, V. (2002) *FEBS Lett.*, **528**, 12–16.
19. Cerchia, L., Duconge, F., Pestourie, C., Boulay, J., Aissouni, Y., Gombert, K., Tavitian, B., de Franciscis, V., Libri, D. (2005) *PLoS Biol.*, **3**, e123.
20. Charlton, J., Kirschenheuter, G.P., Smith, D. (1997) *Biochemistry*, **36**, 3018–3026.
21. Charlton, J., Sennello, J., Smith, D. (1997) *Chem. Biol.*, **4**, 809–816.
22. Chen, H., Gold, L. (1994) *Biochemistry*, **33**, 8746–8756.
23. Collett, J.R., Cho, E.J., Ellington, A.D. (2005) *Methods*, **37**, 4–15.
24. Conrad, R., Keranen, L.M., Ellington, A.D., Newton, A.C. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 32051–32054.
25. Conrad, R.C., Giver, L., Tian, Y., Ellington, A.D. (1996) *Methods Enzymol.*, **267**, 336–367.
26. Convery, M.A., Rowsell, S., Stonehouse, N.J., Ellington, A.D., Hirao, I., Murray, J.B., Peabody, D.S., Phillips, S.E., Stockley, P.G. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 133–139.
27. Cox, J.C., Hayhurst, A., Hesselberth, J., Bayer, T.S., Georgiou, G., Ellington, A.D. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, e108.
28. Cui, Y., Rajasethupathy, P., Hess, G.P. (2004) *Biochemistry*, **43**, 16442–16449.
29. Dang, C., Jayasena, S.D. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 268–278.

30. Darst, S.A. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 155–162.
31. Davidson, E.A., Ellington, A.D. (2005) *Trends Biotechnol.*, **23**, 109–112.
32. Davis, J.P., Janji, N., Javornik, B.E., Zichi, D. (1996) In: *Methods in Enzymology*, **267**, pp. 302–306, Academic Press, Inc.
33. Drabovich, A., Berezovski, M., Krylov, S.N. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11224–11225.
34. Eaton, B.E., Gold, L., Zichi, D.A. (1995) *Chem. Biol.*, **2**, 633–638.
35. Eaton, B.E., Pieken, W.A. (1995) *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 837–863.
36. Eaton, B.E. (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 10–16.
37. Ellington, A.D., Szostak, J.W. (1990) *Nature*, **346**, 818–822.
38. Ellington, A.D., Szostak, J.W. (1992) *Nature*, **355**, 850–852.
39. Eulberg, D., Buchner, K., Maasch, C., Klussmann, S. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e45.
40. Famulok, M. (2005) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **7**, 137–143.
41. Fisher, T.S., Joshi, P., Prasad, V.R. (2002) *J. Virol.*, **76**, 4068–4072.
42. Fitter, S., James, R. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 34193–34201.
43. Fukuda, K., Vishinuvardhan, D., Sekiya, S., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kumar, P.K., Nishikawa, S. (1997) *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 237–238.
44. Gander, T.R., Brody, E.N. (2005) *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **5**, 1–3.
45. Giver, L., Bartel, D., Zapp, M., Pawul, A., Green, M., Ellington, A. D. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5509–5516.
46. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 763–797.
47. Gold, L., Brown, D., He, Y., Shtatland, T., Singer, B.S., Wu, Y. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 59–64.
48. Gold, L., Singer, B., He, Y.Y., Brody, E. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 848–851.
49. Gold, L., Brody, E., Heilig, J., Singer, B. (2002) *Chem. Biol.*, **9**, 1259–1264.
50. Gold, L., Zichi, D., Smith, J.D. (2002) USA Patent 6,376,190.
51. Golden, M.C., Collins, B.D., Willis, M.C., Koch, T.H. (2000) *J. Biotechnol.*, **81**, 167–178.
52. Hale, S.P., Schimmel, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2755–2758.
53. Hamaguchi, N., Ellington, A., Stanton, M. (2001) *Anal. Biochem.*, **294**, 126–131.
54. Hamm, J. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2220–2227.
55. Hamm, J., Huber, J., Luhrmann, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12839–12844.
56. Hamm, J., Fornerod, M. (2000) *Chem. Biol.*, **7**, 345–354.
57. Hamm, J., Alessi, D.R., Biondi, R.M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 45793–45802.
58. Hermann, T., Patel, D.J. (2000) *Science*, **287**, 820–825.
59. Hesselberth, J., Robertson, M.P., Jhaveri, S., Ellington, A.D. (2000) *J. Biotechnol.*, **74**, 15–25.
60. Hicke, B.J., Marion, C., Chang, Y.F., Gould, T., Lynott, C. K., Parma, D., Schmidt, P.G., Warren, S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 48644–48654.
61. Hirao, I., Harada, Y., Nojima, T., Osawa, Y., Masaki, H., Yokoyama, S. (2004) *Biochemistry*, **43**, 3214–3221.
62. Homann, M., Goring, H.U. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2006–2014.
63. Huang, D.B., Vu, D., Cassidy, L.A., Zimmerman, J.M., Maher, L.J., 3rd, Ghosh, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9268–9273.
64. Huttenhofer, A., Vogel, J. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 635–646.

65. Jaeger, J., Restle, T., Steitz, T.A. (1998) EMBO J., **17**, 4535–4542.
66. Jayasena, S.D. (1999) Clin. Chem., **45**, 1628–1650.
67. Jensen, K.B., Atkinson, B.L., Willis, M.C., Koch, T.H., Gold, L. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **92**, 12220–12224.
68. Jing, N., Rando, R.F., Pommier, Y., Hogan, M.E. (1997) Biochemistry, **36**, 12498–12505.
69. Kettenberger, H., Eisenfuhr, A., Brueckner, F., Theis, M., Famulok, M., Cramer, P. (2006) Nat. Struct. Mol. Biol., **13**, 44–48.
70. Knight, R., Yarus, M. (2003) Nucleic Acids Res., **31**, e30.
71. Kubik, M.F., Stephens, A.W., Schneider, D., Marlar, R.A., Tasset, D. (1994) Nucleic Acids Res., **22**, 2619–2626.
72. Kulbachinskiy, A., Feklistov, A., Krashe-ninnikov, I., Goldfarb, A., Nikiforov, V. (2004) Eur. J. Biochem., **271**, 4921–4931.
73. Kumar, P.K., Machida, K., Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Vishnuvardhan, D., Shimotohno, K., Taira, K., Nishikawa, S. (1997) Virology, **237**, 270–282.
74. Kusser, W. (2000) J. Biotechnol., **74**, 27–38.
75. Lai, E.C. (2003) Curr. Biol., **13**, R285–291.
76. Legiewicz, M., Lozupone, C., Knight, R., Yarus, M. (2005) RNA, **11**, 1701–1709.
77. Lin, Y., Padmapriya, A., Morden, K.M., Jayasena, S.D. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 11044–11048.
78. Liu, H.X., Zhang, M., Krainer, A.R. (1998) Genes Dev., **12**, 1998–2012.
79. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Cell, **113**, 577–586.
80. McCauley, T.G., Hamaguchi, N., Stanton, M. (2003) Anal. Biochem., **319**, 244–250.
81. Mendonsa, S.D., Bowser, M.T. (2004) J. Am. Chem. Soc., **126**, 20–21.
82. Morris, K.N., Jensen, K.B., Julin, C.M., Weil, M., Gold, L. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 2902–2907.
83. Murphy, M.B., Fuller, S.T., Richardson, P.M., Doyle, S.A. (2003) Nucleic Acids Res., **31**, e110.
84. Nimjee, S.M., Rusconi, C.P., Sullenger, B.A. (2005) Annu. Rev. Med., **56**, 555–583.
85. Nomura, M., Gourse, R., Baughman, G. (1984) Annu. Rev. Biochem., **53**, 75–117.
86. Nudler, E., Mironov, A.S. (2004) Trends Biochem. Sci., **29**, 11–17.
87. Nutiu, R., Li, Y. (2005) Methods, **37**, 16–25.
88. Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wil-son, C.B., Wills, J.W., Golovine, S., Wang, J.F. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 11509–11513.
89. Patel, D.J., Suri, A.K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R.A., Nonin, S. (1997) J. Mol. Biol., **272**, 645–664.
90. Pestourie, C., Tavitian, B., Duconge, F. (2005) Biochimie, **87**, 921–930.
91. Petach, H., Gold, L. (2002) Curr. Opin. Biotechnol., **13**, 309–314.
92. Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Winnacker, E.L., Famulok, M. (2002) Chembiochem., **3**, 717–725.
93. Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, A. (2005) Appl. Microbiol. Biotechnol., **69**, 367–374.
94. Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E.E., Gibson, T., Boni, I., Gold, L. (1995) Biochemistry, **34**, 3640–3648.
95. Robertson, M.P., Knudsen, S.M., Ellington, A.D. (2004) RNA, **10**, 114–127.
96. Rowsell, S., Stonehouse, N.J., Convery, M.A., Adams, C.J., Ellington, A.D.,

- Hirao, I., Peabody, D.S., Stockley, P.G., Phillips, S.E. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 970–975.
97. Schneider, D., Tuerk, C., Gold, L. (1992) *J. Mol. Biol.*, **228**, 862–869.
98. Schneider, D.J., Feigon, J., Hostomsky, Z., Gold, L. (1995) *Biochemistry*, **34**, 9599–9610.
99. Shi, H., Hoffman, B.E., Lis, J.T. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2649–2657.
100. Shi, H., Fan, X., Ni, Z., Lis, J.T. (2002) *RNA*, **8**, 1461–1470.
101. Shtatland, T., Gill, S.C., Javornik, B.E., Johansson, H.E., Singer, B.S., Uhlenbeck, O.C., Zichi, D.A., Gold, L. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, E93.
102. Smith, D., Collins, B.D., Heil, J., Koch, T.H. (2003) *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 11–18.
103. Smith, J.D., Gold, L. (2004) USA Patent 6,706,482.
104. Stojanovic, M.N., de Prada, P., Landry, D.W. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4928–4931.
105. Tasset, D.M., Kubik, M.F., Steiner, W. (1997) *J. Mol. Biol.*, **272**, 688–698.
106. Thomas, M., Chedin, S., Carles, C., Riva, M., Famulok, M., Sentenac, A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 27980–27986.
107. Thompson, K.M., Syrett, H.A., Knudsen, S.M., Ellington, A.D. (2002) *BMC Biotechnol.*, **2**, 21.
108. Triqueneaux, G., Velten, M., Franzon, P., Dautry, F., Jacquemin-Sablon, H. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1926–1934.
109. Tsiang, M., Jain, A.K., Dunn, K.E., Rojas, M.E., Leung, L.L., Gibbs, C.S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 16854–16863.
110. Tuerk, C., Gold, L. (1990) *Science*, **249**, 505–510.
111. Tuerk, C., MacDougal, S., Gold, L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6988–6992.
112. Uphoff, K.W., Bell, S.D., Ellington, A.D. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 281–288.
113. Vater, A., Jarosch, F., Buchner, K., Klussmann, S. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, e130.
114. Vater, A., Klussmann, S. (2003) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **6**, 253–261.
115. Vuyisich, M., Beal, P.A. (2002) *Chem. Biol.*, **9**, 907–913.
116. Walter, G., Bussow, K., Lueking, A., Glokler, J. (2002) *Trends Mol. Med.*, **8**, 250–253.
117. Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M., Winnacker, E.L. (1997) *J. Virol.*, **71**, 8790–8797.
118. Wen, J.D., Gray, D.M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 11438–11448.
119. White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., Sullenger, B. (2001) *Mol. Ther.*, **4**, 567–573.
120. Wilson, D.S., Szostak, J.W. (1999) *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 611–647.
121. Winter, R.B., Morrissey, L., Gauss, P., Gold, L., Hsu, T., Karam, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7822–7826.
122. Wlotzka, B., Leva, S., Eschgfaller, B., Burmeister, J., Kleinjung, F., Kaduk, C., Muhn, P., Hess-Stumpp, H., Klussmann, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8898–8902.
123. Xu, W., Ellington, A.D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7475–7480.
124. Yamamoto, R., Baba, T., Kumar, P.K. (2000) *Genes Cells*, **5**, 389–396.
125. Yamamoto, R., Katahira, M., Nishikawa, S., Baba, T., Taira, K., Kumar, P.K. (2000) *Genes Cells*, **5**, 371–388.

126. Zhang, Z., Blank, M., Schluesener, H.J. (2004) Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.), **52**, 307–315.
127. Копылов А.М., Спиридонова В.А. (2000) Молекулярная биология, **34**, 1097–1113.