

АПТАМЕРНЫЕ РНК ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

© 2021 А.М. Копылов^{1*}, Л.В. Фаб², О. Антипова¹, Е.А. Савченко³,
А.В. Ревин², В.В. Паршина², С.В. Павлова², И.И. Киреев¹,
А.В. Головин^{1,4}, Д.Ю. Усачев³, Г.В. Павлова^{2,3,4}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: kopylov.alex@gmail.com

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия

³ ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Минздрава России, 125047 Москва, Россия

⁴ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.05.2021

После доработки 15.06.21

Принята к публикации 15.06.2021

Стандартные подходы к исследованию и молекулярному типированию опухолей включают ПЦР, блоттинг, омиксы, иммуноцитохимию и иммуногистохимию; последние два метода самые востребованные, поскольку не только определяют наличие белка-маркера, но и могут его локализовать в клетке. В работе продемонстрированы возможности аптамерных РНК как альтернативы моноклональным антителам для аптацитохимии и аптагистохимии глиобластомы человека (ГБМ). В работе использовали 2'-F-пиримидил-РНК-аптамер ME07 длиной 48 нуклеотидов, специфичный к рецептору эпидермального фактора роста (РЭФР, EGFR, ErbB1, Her1). Проточной цитометрией с флуоресцеиновым производным FAM-ME07 доказана специфичность аптамера к рецептору EGFR на поверхности опухолевых клеток, полуколичественно определена кажущаяся константа диссоциации с рецептором на клетках, а также проведена оценка копийности EGFR на поверхности клетки. Используются клеточные линии с разной степенью экспрессии EGFR: A431 (10^6 копий на клетку), U87 (2×10^4 копий на клетку), MCF7 (10^3 копий на клетку), клетки перевиваемой первичной клеточной культуры глиобластомы пациента ROZH (10^4 копий на клетку). Методом флуоресцентной микроскопии прямо показано взаимодействие FAM-ME07 с рецептором на клетках A431 с последующей интернализацией в цитоплазму и далее – в ядрышко, что открывает возможности использования ME07 как эскорт-аптамера для доставки терапевтических реагентов в клетки опухоли. FAM-ME07 эффективно окрашивает срезы клинических образцов ГБМ человека и четко локализует EGFR-положительные клоны в гетерогенной опухоли, что позволяет перейти к опытам на моделях ГБМ у животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 2'-фтор-пиримидил-РНК-аптамер, EGFR, глиобластома человека, клеточные культуры, опухолевая ткань, проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972521080121

ВВЕДЕНИЕ

Создание молекулярного узнающего элемента (МУзЭля) для тераностики предполагает, что на первом этапе исследуется возможность использования МУзЭля для детекции потенциальной терапевтической мишени в опухоли, в

данном случае – опухолевого маркера трансмембранного рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в глиобластоме. На втором этапе исследуется возможность таргетного блокирования рецептора с помощью МУзЭля либо рецептор-опосредованной таргетной доставки антипролиферативного агента с помощью МУзЭля. При тераностике мультиформной глиобластомы человека (ГБМ) для идентификации EGFR на поверхности клеток/опухоли и блокирования пролиферации EGFR-положительных клеток используют моноклональные антитела и их производные [1]. В последнее время вместо антител начали использовать аптамеры.

В своей книге «Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка» А.С. Спирин ввёл раздел «Эволюция древнего мира РНК путём

Принятые сокращения: EGFR – трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста; FAM – 5(6)-карбоксифлуоресцеин; A431 – линия клеток эпидермоидной карциномы человека; MCF7 – клеточная линия аденокарциномы протоков молочной железы человека; U87 – клеточная линия глиобластомы человека; ГБМ – глиобластома мультиформная человека; k_d – кажущаяся константа диссоциации; МУзЭл – молекулярный узнающий элемент; 2'-F-Пу – 2'-фтор-пиримидин.

* Адресат для корреспонденции.

“систематического экспоненциального обогащения”» [2]. Раздел начинается со следующего абзаца: «В 1990 г. одновременно тремя группами учёных в США (Тюрк и Голд; Эллингтон и Шостак; Робертсон и Джойс) была опубликована методология бесклеточной селекции, или бесклеточной эволюции, в пробирке молекул некодирующих РНК, позволившая быстро получать в лаборатории нужные синтетические функционально активные РНК, специфически взаимодействующие с определёнными лигандами (аптамеры) или катализирующие определенные химические реакции (искусственные рибозимы), а также совершенствовать функции таких РНК... Суть методологии “эволюции в пробирке” состоит в многократном чередовании стадий селекции и амплификации РНК (“Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment”, SELEX)» [2].

По сути, независимо от того, на какую мишень селекционируются молекулы РНК (низкомолекулярный органический краситель [3] или белок [4]) или на какую функцию (рибозим) селекционируются молекулы РНК [5]), задача состоит в том, чтобы отобрать уникальные третичные структуры РНК, которые обеспечивают аффинность и специфичность аптамеров. И в этом смысле РНК действительно обладает высоким потенциалом для формирования сложных третичных структур. Большую роль при этом играет 2'-гидроксильная группа: её наличие в каждом звене макромолекулы обеспечивает РНК многочисленными донорами и акцепторами водородных связей, которые могут стимулировать и определять сворачивание, а также стабилизировать третичную структуру. Именно поэтому в первых работах по SELEX для селекции использовались в основном рандомизированные библиотеки РНК.

С другой стороны, наличие 2'-гидроксильной группы играет негативную роль, поскольку определяет гидролитическую нестабильность молекул РНК. Этот фактор является критичным для продвижения аптамеров в прикладную область, например, в медицину – это трансляция в диагностику и терапию (тераностику, аптагераностику). В связи с этим аптамеры стали отбирать из комбинаторных библиотек РНК, содержащих модифицированные остатки сахаров [6]. В настоящее время наибольшую популярность приобрели 2'-О-метил-, или 2'-фторпроизводные, либо так называемые мостиковые нуклеиновые кислоты (locked nucleic acids, LNA; bridged nucleic acids, BNA) [7]. Ну и, конечно, использование производных без 2'-гидроксила – это комбинаторные библиотеки ДНК.

Необходимо отметить ещё одно обстоятельство – естественно, что результатом селекции

является не одна молекула, а семейство молекул со сходной аффинностью. Отсюда возникает целый ряд теоретических вопросов. Во-первых, молекулы-финалисты (аптамеры) даже из одного семейства имеют разные первичные и пространственные структуры. Каким образом разные структуры обеспечивают специфичность взаимодействия с одной мишенью? Во-вторых, в случае белка, аптамеры одного семейства с различной структурой отбираются к одному или к разным эпитопам белка; комплексы имеют сходные или различные структуры интерфейсов? И, наконец, каковы сравнительные свойства аптамеров, полученных из различных селекций?

Некоторые ответы можно найти при изучении аптамеров к белковой мишени, для которой существует многообразие структур как для самой мишени, так и для аптамеров к ней. Этим условиям удовлетворяет рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР; epidermal growth factor receptor, EGFR; Her1, ErbB1), для которого известен достаточно большой набор аптамерных РНК, ДНК и их модификаций. EGFR, как член семейства тирозинкиназных рецепторов ErbB, является достаточно распространённой мишенью для многих типов рака; имеется большой набор антител к EGFR, включая коммерчески доступные и терапевтические, для ряда антител проводятся клинические испытания, в том числе в случае глиобластом [1]. Получены токсические конъюгаты терапевтических антител, которые также проходят клинические испытания. Таким образом, EGFR позволяет изучать как теоретические, так и прикладные вопросы использования аптамеров.

EGFR – наиболее часто сверхэкспрессируемый онкоген рецепторной тирозинкиназы во всех злокачественных новообразованиях человека, который активируется при связывании различных факторов роста и, как следствие, инициирует каскад передачи сигнала, который стимулирует клеточную миграцию, адгезию, инвазию, пролиферацию, ангиогенез и анти-апоптоз [8]; поэтому EGFR – это привлекательная мишень для терапии злокачественных опухолей. Уровень экспрессии EGFR меняется от тысяч молекул на клетку в норме вплоть до миллионов молекул на клетку – для некоторых опухолевых линий [9–11]. Наиболее часто встречаемый мутант EGFR – это EGFRvIII, который образуется в результате делеции внеклеточной части рецептора от 6 до 273 аминокислоты (экзоны 2–7), этот вариант экспрессируется в глиомах, немелкоклеточных карциномах лёгкого и карциномах молочных желез. Количественный анализ клеток, полученных биопсией глиомы человека, с помощью флуоресценции на клеточном сортере

даёт цифру в несколько сотен тысяч копий EGFRvIII на клетку [12].

Пионерские работы по получению аптамерных РНК к рецептору EGFR и изучению их свойств были сделаны в лаборатории Э. Эллингтона. При этом изучению собственно структуры аптамеров практически не уделялось внимания. Классическим SELEX к внеклеточному домену рецептора для библиотеки РНК с очень большой рандомизированной областью в 62 нт после 12 раундов была получена аптамерная РНК J18 длиной 104 нт. Аптамер J18 связывался с мишенью с кажущейся константой диссоциации (K_d) ~7 нМ [13, 14]. Аптамер J18 не взаимодействовал ни с EGFR мыши, ни с hErbB2 (Her2/neu).

Аптамер был способен связываться с нативным рецептором, встроенным в мембрану клеток A431 эпидермоидной карциномы, которая содержит аномально высокое количество рецептора на поверхности клеток – от 1 до 3 млн [10]. Комплексы клеток с аптамерами, мечеными фикоэритрином, анализировали проточной цитометрией. Связывание аптамера J18 с клетками A431 ингибируется терапевтически антителами к EGFR (Mab 225) [15, 16]. Флуоресцентной микроскопией показано, что связывание аптамера J18 с клетками A431 блокируется 10-кратным избытком фактора роста EGF человека (но не мыши), а также антителами 225. После инкубации 30 мин при 37 °C ~35% аптамера интернализировалось внутрь клеток; на холоду аптамер-рецепторный комплекс оставался на поверхности клетки.

Из-за низкой гидролитической стабильности РНК J18, следующая селекция РНК-аптамеров к EGFR была выполнена для 2'-F-пиримидил-производных РНК (2'-F-Y-РНК) [13]. Селекцию проводили для рекомбинантного химерного белка – внеклеточного домена рецептора (L25–S645) с Fc-доменом IgG1 (P100–K330) через пептидный линкер IEGRMD. Получен высокоаффинный аптамер длиной 93 нт с $K_d = 2,4$ нМ.

Для введения метки в аптамер был использован следующий прием. 6-Карбоксифлуоресцеин (FAM)-меченый олигонуклеотидный зонд длиной 24 нт был комплементарен дополнительному участку аптамера на 3'-конце («якорная» последовательность). После гибридизации 10 мин при 70 °C с последующим отжигом гибрид можно было использовать для флуоресцентной детекции EGFR. Якорный олигонуклеотид использовали для иммобилизации аптамера на поверхности стекла [13] или золота [14].

Для получения новых вариантов аптамеров использовали следующий приём [17]. После селекции 2'-F-Y-РНК один из аптамеров-лиде-

ров (E01) синтезировали с рэндомизацией 30% нуклеотидов, как описано ранее [18], для полученной библиотеки вновь проводили селекцию. В результате получена серия из семи 2'-F-Y-РНК-аптамеров E01–E07; для E07 – длиной 92 нт $K_d = 2,4$ нМ (против 36 нМ – для рецептора клеток мыши, mEGFR). Для введения метки использовали якорный зонд, содержащий биотин, флуорофор вводили с помощью конъюгата стрептавидина с фикоэритрином.

Аптамер E07 взаимодействовал с клетками A431, интернализация E07 составляла 23% по сравнению с антителами C225 – 28% и фактором роста EGF – 71%.

Аптамер E07 ингибировал активацию EGFR-зависимого каскада фосфокиназ под действием 2 нМ EGF с $IC_{50} = 300$ нМ, а антитела C225 – с $IC_{max} = 100$ нМ [17].

Аптамеры E07 и их производные использовали для изучения пролиферации и миграции в микроканалах [19], для электродетекции клеточного EGFR в металлических нанощелях [20], а также для выделения EGFR-позитивных клеток [21, 22].

Текущие направления исследования аптамеров к EGFR довольно разнообразны. Во-первых, это минимизация аптамеров серии E – получение ME07 длиной 48 нт [23]. Аффинность ME07 к внеклеточному домену EGFR, измеренная интерферометрией биослоя, была высокой, $K_d = 0,3$ нМ, а к мутанту EGFRvIII – в тысячу раз хуже, $K_d = 0,3$ мкМ [24, 25]. Во-вторых, получение производных аптамеров для визуализации опухоли *in vivo* на моделях животных. Например, для иммунодефицитных мышей с высоко туморогенной опухолью горла OSC-19 с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии провели визуализацию конъюгатов полых золотых наночастиц с аптамером E07, меченых гамма-эмиттером ^{111}In ; конъюгаты с аптамерами накапливаются в опухоли в 2 раза лучше, чем конъюгаты с антителами [26]. При использовании ^{18}F -бензоил-ME07 показана возможность визуализации опухоли ксенографа A431 у мыши с помощью позитрон-эмиссионной томографии (ПЭТ), причём отношение опухоль/кровь было 3,9, а опухоль/мышцы – 8,7 [24, 25].

Интернализация рецептора в комплексе с E07 открывает возможности его использования как эскорт-аптамера для доставки гемцитабина и его олигомерных производных [27]. Химерная РНК, состоящая из аптамера и миРНК (Aptamer-siRNA chimera, AsiC), используется для доставки в клетки миРНК и нокдауна. Например, анти-NOTAIR миРНК (НОХ-межгенная РНК) в виде химеры с РНК-аптамером E07 эффективно ин-

тернализуются в эндосомы в клетках тройного негативного рака молочной железы с последующим нокдауном целевого гена [28]. В силу своих малых размеров аптамеры, в отличие от антител, оказались уникальным МУзЭлем, которые позволили развить технику детекции единичных молекул в живых клетках при супер-разрешающей микроскопии [29–31].

Помимо серии E, к EGFR получен целый ряд аптамерных РНК [32, 33], ДНК [34, 35] и миксомеров [36], которые обладают различными функциональными свойствами. Но, как и в случае с моноклональными антителами, при отсутствии данных об эпитопах/эпиаптах и паратопах/парааптах сравнительный анализ этих аптамеров затруднён.

Возможности направленной модификации аптамеров различными флуорофорами, равно как и развитие методов флуоресцентной детекции позволяют получать принципиально новую информацию по механизму взаимодействия аптамеров с клетками и по поведению аптамеров внутри клетки. Все это создает фундамент для развития аптагераностики, возможности которой могут оказаться выше, чем у иммунотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигонуклеотиды. ДНК-олигонуклеотиды синтезированы и очищены методом ВЭЖХ в ООО «Евроген» (Россия). Флуоресцентно-меченный 2'-F-РНК-аптамер FAM-ME07 синтезирован и очищен методом ВЭЖХ в ООО «Синтол» (Россия). Минимизированный вариант РНК-аптамера MJ18 был синтезирован с помощью стандартного набора для транскрипции MegaScript («Thermo Fisher Scientific», США) с предварительно амплифицированной ПЦР дву-

цепочечной ДНК-матрицы, включающей нуклеотидную последовательность аптамера, праймера и промотора РНК-полимеразы T7. Протокол транскрипции включал обработку ДНКазой и очистку переосаждением. Для введения флуоресцентной метки 3'-конец РНК-аптамера имел дополнительную участок в 18 нт, который был комплементарен FAM-меченному 18-меру ДНК: FAM-CATTTAGGACCAACACAA (таблица).

Соли для буферов имели аналитическую чистоту («Biomedicals», Франция). Исходные растворы олигонуклеотидов с концентрацией 10 мкМ готовили в фосфатном буфере (PBS) («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 5 мМ MgCl₂ («Sigma-Aldrich», США). Структуру олигонуклеотидов в растворе преформировали: нагрев до 75 °С, затем медленное охлаждение до 25 °С.

Клеточные линии. Клеточные линии эпителиальной аденокарциномы A431, глиобластомы U87, фибробластов dF и рака молочной железы MCF7 были приобретены в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия. производных без 2'-гидроксила (DMEM, «Gibco», США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Thermo Fisher Scientific») в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Клеточная культура ROZH была получена в НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко, Россия. Клеточная культура из опухолевой ткани глиобластомы пациента была использована с согласия Этического Совета НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко.

Культивирование опухолевых клеточных культур и линий. Линии и первичные культуры клеток, используемые в эксперименте, культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с пируватом натрия («Gibco») с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Thermo Fisher Scientific»), 1%-ного раствора HEPES для поддержания pH («Thermo Fisher Scientific»),

Первичные структуры олигонуклеотидов

Название	РНК/ДНК	Первичная структура
J18	РНК	GGCGCUCGACCUUAGUCUCUGCAAGAUAAACCGUGCUAUUGACCACCCUCAACACACUUAUUAAUGUAUUGAACGGACCUACGAACCGUGUAGCAGCAGA
MJ18	РНК	GGUGCUAUUGACCACCCUCAACACACUUAUUAAUGUAUUGAACGGACCUACGAACCGUGUAGCACC
MJ18h-arm	РНК	GGUGCUAUUGACCACCCUCAACACACUUAUUAAUGUAUUGAACGGACCUACGAACCGUGUAGCACCUGUGUUGGUCCUAAAUG
FAM-Harm	ДНК	FAM-CATTTAGGACCAACACAA
FAM-ME07	2'-F-пиримидил-РНК	FAM-GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCAUGUCAAGCCGGAACCGUCC

1% GlutaMAX («Thermo Fisher Scientific») и 1% антибиотика/антимикотика (раствор пенициллина/амфотерицина, «Cytiva», США). Флаконы с клетками помещали в CO₂-инкубатор («BINDER GmbH», Германия) при температуре 37 °С.

Проточная цитофлуориметрия РНК-аптамера MJ18. Для введения флуоресцентной метки 1 мкМ раствор РНК-олигонуклеотида MJ18 и FAM-ДНК-праймера в PBS с добавлением 5 мМ MgCl₂ нагревали 3 мин до 75 °С и охлаждали со скоростью 1 °С/мин до комнатной температуры.

Для проточной цитофлуориметрии выращенные клетки переведены в суспензию, разделены на порции по 500 000 клеток, промыты трижды буфером и ресуспендированы в 500 мкл PBS, содержащего 100 нМ дуплекса РНК-олигонуклеотида MJ18 с FAM-Harm. Контрольные клетки инкубировали с FAM-Harm. Положительный контроль: клетки инкубировали с раствором 1 мкг/мл антител H11 против EGFR («Thermo Scientific») 1 ч при комнатной температуре в темноте; далее 1 ч при 20 °С инкубировали с вторичными антителами, мечеными Cy-2 (конъюгат с Cy2 анти-мышинные антитела AffiniPure, «Jackson ImmunoResearch», Великобритания), разведение 1 : 200 в PBS. Клетки трижды промывали буфером и анализировали на проточном цитофлуориметре Attune NxT («Thermo Fisher Scientific»), измеряли интенсивность сигнала флуоресценции канала BL1, 488 нм, регистрация 10 000 событий. Данные анализировали с помощью FACSDiva версии 5.02 Becton Dickinson. Клеточный дебрис исключали на основании прямого и бокового рассеяния. Уровень флуоресценции рассчитывали относительно контрольной популяции клеток, которую инкубировали без добавления аптамеров.

Проточная цитофлуориметрия 2'-F-РНК-аптамера FAM-ME07. Клетки суспендировали, разделяли на порции по 500 000 клеток, трижды промывали фосфатным буфером и ресуспендировали в 500 мкл PBS, содержащего необходимую концентрацию FAM-ME07. Клетки инкубировали 1 ч при комнатной температуре в темноте. Контрольные клетки, как в опыте с MJ18, окрашивали антителами H11 к EGFR («Thermo Scientific») 1 ч при 4 °С, затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Cy2 (конъюгат с Cy2 анти-мышинных антител AffiniPure, «Jackson ImmunoResearch»), разведение 1 : 200 в PBS, в течение 1 ч при 20 °С. После инкубации клетки трижды промывали PBS. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре AccuriC6 («BD Bioscience», США), измеряли ин-

тенсивность сигнала флуоресценции канала FL1, 488 нм, регистрировали 10 000 событий. Флуоресценцию рассчитывали относительно контрольной популяции клеток, которую инкубировали без аптамера.

Флуоресцентная микроскопия. Скрининг флуоресцирующих клеток проводился на инвертированной микроскопической платформе Eclipse Ti2-E («Nikon», Япония), оборудованной моторизованным широкоформатным предметным столиком H139 («Prior Scientific», Великобритания), системой автофокусировки на основе инфракрасного лазера Perfect Focus System («Nikon») и широкоформатной sCMOS-камеры Neo 5.5 («Andor Technologies», Ирландия) под контролем программного обеспечения NIS-Elements ver.5.11 («Nikon») с модулем для автоматизации скрининга JOBS. Флуоресценцию возбуждали при помощи 16-канального блока LED pE-4000 («CoolLED», Великобритания). Сканирование культуральных планшетов проводили с использованием объектива PlanApo 10× (NA = 0,45), сканирование многолуночных покровных стёкол 8-well μ -Slide («IBIDI», Германия) проводили с использованием объектива PlanApo 20× (NA = 0,75).

Для флуоресцентной микроскопии использовали аптамер FAM-ME07, $\lambda_{ex} = 490$; $\lambda_{em} = 513$.

Сканирование препаратов проводили в автоматическом режиме, для каждой лунки регистрировали 8 полей зрения (для 96-луночных планшетов) и 36 полей зрения (для многолуночных стёкол). Анализ результатов проводили при помощи ImageJ. Для автоматизации анализа была создана серия скриптов, автоматически проводящих подсчёт клеток по флуоресценции ДНК и измеряющих интегральную интенсивность флуоресценции FAM после вычитания фона. Результаты представлены в виде интегральной интенсивности флуоресценции (в относительных единицах), нормированной на количество клеток в поле зрения.

Окраска фиксированных клеточных культур аптамером FAM-ME07. Культуру клеток (10 000 клеток на лунку) высевали в 4-луночные планшеты с вложенными покровными стёклами и инкубировали 2 дня при 37 °С. Фиксировали 4%-ным параформальдегидом 20 мин при 4 °С. Затем промывали 3 раза по 5 мин фосфатным буфером. Клетки инкубировали с 100 нМ FAM-ME07 в растворе PBS с 25 мМ MgCl₂, 60 мин при комнатной температуре. Промывали 3 раза по 5 мин в PBS. Для окраски ядер клеток использовали раствор бисбензимида (Hoechst 33342, «Sigma», разведение 1 : 500 в PBS). Перед анализом клетки фиксировали в среде для заключения на основе поливинилового спирта

Mowiol («Sigma-Aldrich», Германия) 8 ч при 4 °С, а затем сутки — при комнатной температуре. Полученные образцы исследовали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Axiovert 200M с цифровой камерой («Carl Zeiss MicroImaging GmbH», Германия).

Окраска нефиксированных клеточных культур одновременно антителами к EGFR и аптамером FAM-ME07. Клетки, культивируемые на планшетах или на многолуночных стёклах (10 000 клеток на лунку) инкубировали с 500 нМ FAM-ME07 в растворе PBS с 25 мМ MgCl₂ 60 мин при комнатной температуре, затем дважды отмывали от среды тремя объёмами PBS (рН 7,2–7,4), после чего фиксировали добавлением 200 мкл 4%-ного раствора параформальдегида в PBS 30 мин при 4 °С. После фиксации клетки отмывали трижды тремя объёмами PBS. Клетки инкубировали в растворе антител H11к EGFR («Thermo Scientific», разбавление 1 : 100) 1 ч; промывали PBS трижды по 5 мин. Клетки инкубировали с вторичными антителами, мечеными Cy2 в разведении 1 : 100 («Jackson ImmunoResearch») 60 мин при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали раствором бисбензимида (Hoechst 33342, («Sigma»), разведение 1 : 500 в PBS). Клетки фиксировали в среде для заключения на основе поливинилового спирта Mowiol 4-88 («Sigma-Aldrich») с антиоксидантом 1%-ным DABCO («Sigma-Aldrich», Германия) 8 ч при 4 °С, затем сутки — при комнатной температуре. Образцы исследовали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Axiovert 200M с цифровой камерой.

Окраска клеточных культур аптамером FAM-ME07 без предварительной фиксации. Клетки, культивируемые на планшетах или на многолуночных стёклах (10 000 клеток на лунку), инкубировали с FAM-ME07 1 ч, дважды отмывали тремя объёмами PBS (рН 7,2–7,4) и фиксировали добавлением 200 мкл 4%-ного раствора параформальдегида в PBS, 30 мин при 4 °С. Клетки отмывали трижды тремя объёмами PBS. Ядра клеток окрашивали бисбензимином (Hoechst 33342, («Sigma»), разведение 1 : 500 в PBS). Образцы покрывали средой на основе поливинилового спирта Mowiol 4-88 с антиоксидантом 1%-ным DABCO.

Окраска срезов нефиксированной замороженной опухолевой ткани глиобластомы человека аптамером FAM-ME07. Опухолевую ткань глиобластомы человека получали от пациентов в результате операционного вмешательства. Из замороженного в жидком азоте фрагмента опухоли нефиксированной глиобластомы человека с помощью криотома получали срезы толщиной 5 мкм. Срез промывали 5 мин в PBS, высу-

шивали и инкубировали в растворе 100 нМ FAM-ME07 1 ч при комнатной температуре, промывали дважды по 5 мин в PBS. Ядра окрашивали бисбензимином (Hoechst 33342, «Sigma», разведение 1 : 500 в PBS), инкубировали 5 мин при комнатной температуре, промывали в PBS 5 мин. Срезы покрывали средой Mowiol («Sigma-Aldrich») на основе поливинилового спирта, оставляли на 8 ч при 4 °С, затем на 24 ч — при комнатной температуре. Образцы изучали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Axiovert 200M с цифровой камерой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Модели предполагаемых вторичных структур аптамерных РНК к EGFR. Проведен анализ возможных вариантов вторичной структуры аптамерных РНК к EGFR: РНК (J18 и MJ18) и 2'-F-модифицированных РНК (E07, ME07), рис. 1.

Такие достаточно короткие структуры РНК в 50–70 нт доступны для экспериментального изучения.

Проточная цитофлуориметрия аптамерных РНК MJ18 и FAM-ME07 с клетками, экспрессирующими EGFR на поверхности. В качестве стандарта для детекции EGFR на поверхности линейных клеток использовали коммерчески доступное моноклональное антитело H11, которое было мечено с помощью вторичных антител с флуорофором Cy2. Для 2'-фтор-пиримидин-ME07 (2'-F-Py-ME07) при синтезе на 5'-конец вводился флуоресцеиновый флуорофор 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM).

На рисунке 2, а видно, что клетки A431 (линия клеток эпидермоидной карциномы человека), которые суперэкспрессируют EGFR, дают хороший сигнал с флуоресцентными антителами H11, сигнал характеризуется величиной сдвига правого пика (2) по абсциссе относительно собственной флуоресценции клеток (1). Причём величина сдвига пропорциональна интенсивности флуоресценции, то есть пропорциональна количеству меченого лиганда на EGFR. Несколько более слабый сигнал показывает комплекс аптамерной РНК MJ18 с якорным FAM-ДНК-комплементом (рис. 2, б). Сигнал для отрицательного контроля с олигонуклеотидом с неаптамерной первичной структурой совпадает с сигналом от исходных клеток (левый пик (2) на рис. 2, в; правый пик (3) — сигнал от ME07).

Для верификации специфичности аптамера к рецептору показательны результаты титрования EGFR на поверхности клеток A431 аптамером FAM-ME07. С повышением концентрации

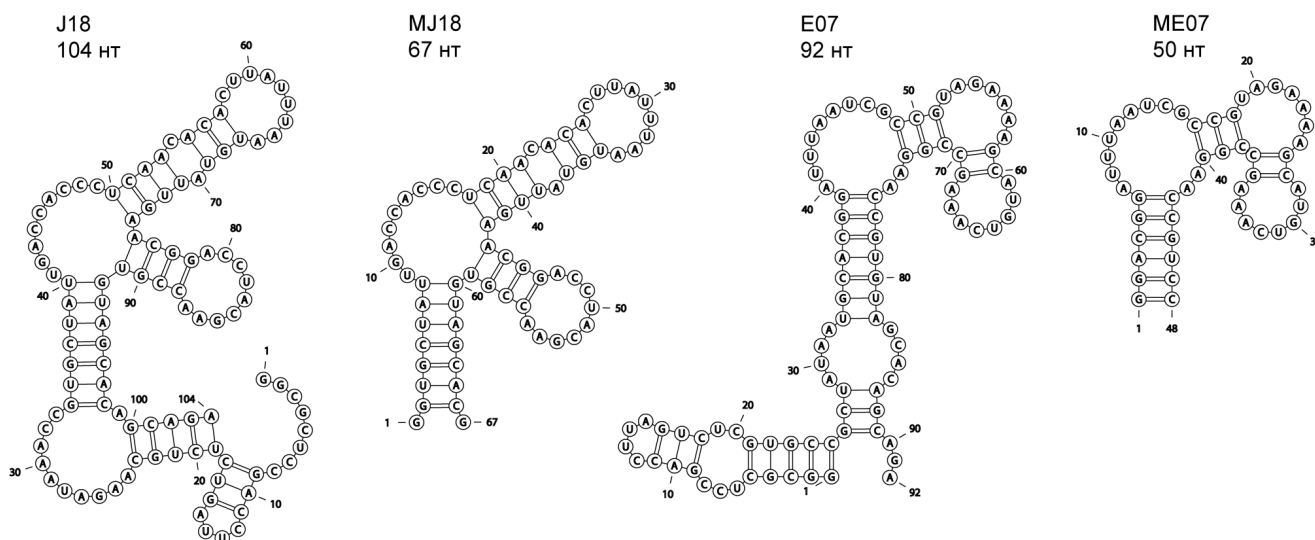


Рис. 1. Предполагаемые вторичные структуры аптамерных РНК к EGFR, полученные моделированием для минимума свободной энергии с помощью алгоритмов RNAStructure [37], визуализация результатов моделирования вторичных структур с использованием сервиса RNApdbec [38]. РНК-аптамер J18 был сокращён до 67 нуклеотидов – MJ18

аптамера увеличивается сдвиг по оси абсцисс (рис. 2, *г* и *д*), что позволяет примерно оценить кажущуюся константу диссоциации аптамера с рецептором в составе клетки – ~100 нМ.

Ещё более показательны данные, полученные для разных типов линейных клеток, которые содержат разное количество рецептора на поверхности клеток в силу их физиологических свойств. Использован следующий ряд стандартных линий клеток. Положительный контроль – линия клеток с суперэкспрессией рецептора EGFR; это эпидермоидная карцинома человека, которая имеет до 3×10^6 молекул рецептора на поверхности одной клетки [39], значения нормализованной экспрессии EGFR NX = 346 (<https://proteintatlas.org>). На два порядка меньшим числом рецепторов на одну клетку обладает стандартная клеточная линия глиобластомы человека U87, которая содержит 2×10^4 молекул на одну клетку [40], значения нормализованной экспрессии NX = 2,6 (<https://proteintatlas.org>). И, наконец, в качестве линии клеток с минимальным количеством рецептора была выбрана стандартная линия клеток аденокарциномы протоков молочной железы человека (MCF7), которая содержит на порядок меньше молекул рецептора на клетку – до 2×10^3 [41], значения нормализованной экспрессии NX = 0,2 (<https://proteintatlas.org>).

Из рис. 2 видно, что при уменьшении количества молекул рецептора на клетку сигнал флуоресценции приближается к собственной флуоресценции клеток, и для клеток MCF7 он практически совпадает с таковой.

Таким образом, метод проточной цитофлуориметрии позволяет полуколичественно оценить число молекул EGFR на поверхности клеток.

Флуоресцентная микроскопия. Принципиально иную информацию о взаимодействии антител и аптамеров с рецептором EGFR на поверхности клеток можно получить с помощью флуоресцентной микроскопии.

В качестве положительного контроля использовали линию клеток A431 с суперэкспрессией EGFR, которую обрабатывали одновременно аптамером FAM-ME07 и моноклональным антителом H11; антитело H11 метили с помощью вторичных антител, конъюгированных с флуорофором Cy2. На рис. 3, *а* показано общее поле для флуоресцентной микроскопии клеток A431 с окрашенными ядрами (синий цвет), антителом H11 (красный цвет) и аптамером FAM-ME07 (зелёный цвет).

Более детально группа из четырех клеток показана на других панелях рис. 3: в комплексе с флуоресцентным антителом H11 (*б*), в комплексе с флуоресцентным аптамером FAM-ME07 (*в*), с окрашенными ядрами (*г*). На рис. 3, *д* показан результат наложения изображений, при совпадении локализации аптамеров и антител получается оранжевый цвет.

Аптамер FAM-ME07, также как и антитело H11, чётко локализуется на мембране клеток A431. При этом не наблюдается заметной конкуренции антител H11 и аптамеров FAM-ME07. В отличие от антитела H11, аптамер FAM-ME07 проникает в цитоплазму клеток и далее попадает в ядрышки.

Для более точной локализации аптамера в клетках A431 был проведён опыт только с аптамером FAM-ME07, без антител H11. На рис. 4 чётко видно свечение аптамера FAM-ME07 в цитоплазме клеток и в ядрышке.

Очень показательные данные получены при сравнении взаимодействия FAM-ME07 с разными типами линейных клеток, имеющих разное количество рецептора EGFR на поверхности. На рис. 5 показана окраска аптамером AM-ME07 следующего набора клеток: положительный контроль – клетки A431; первичная культу-

ра клеток мультиформной глиобластомы человека ROZH, полученная из хирургического образца опухоли пациента; культура клеток фибробластов человека.

Для того, чтобы можно было выявить малое количество рецептора на поверхности клеток, концентрацию FAM-ME07 повысили на порядок – до 1 мкМ. Неудивительно, что при такой высокой концентрации аптамера клетки A431 окрашивались очень интенсивно. Клетки ГБМ ROZH окрашивались в меньшей степени, аптамер FAM-ME07 в основном локализо-

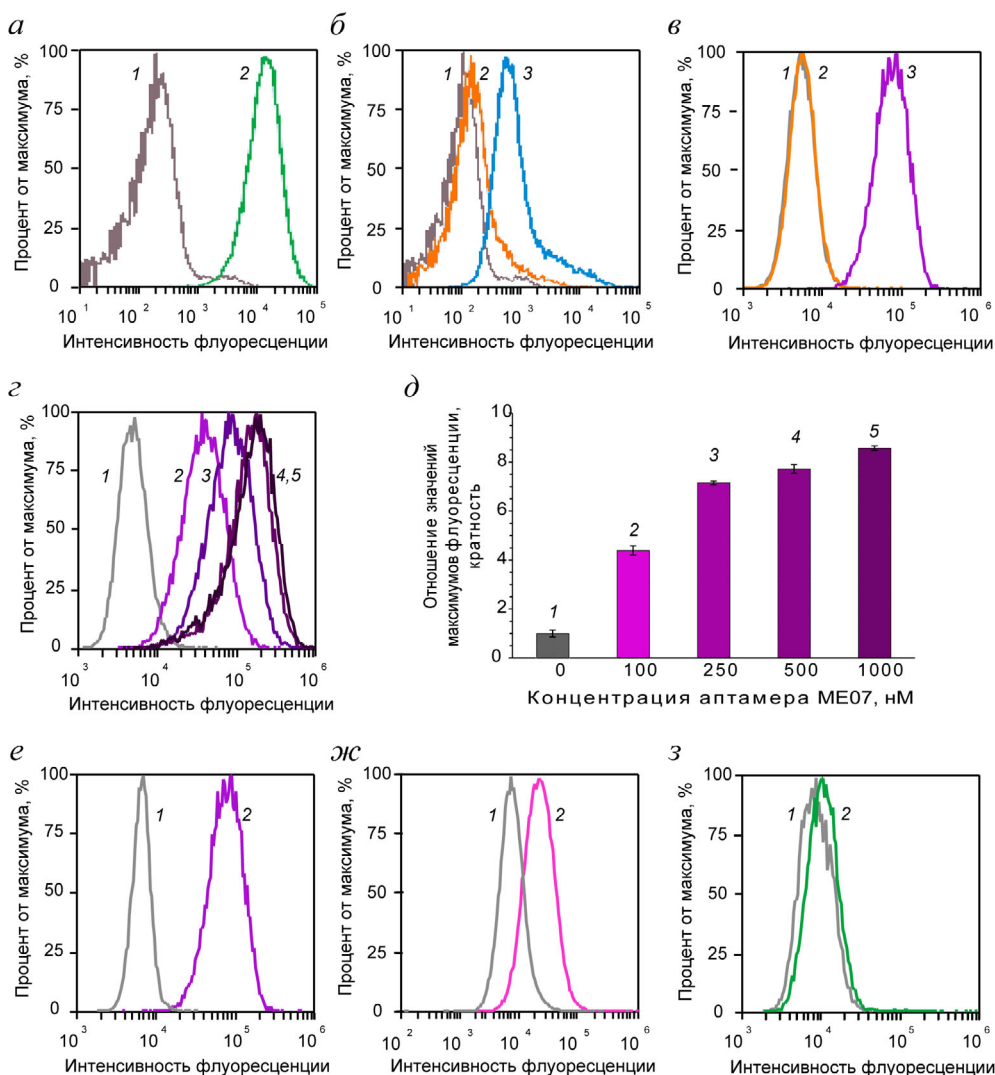


Рис. 2. Проточная цитофлуориметрия. Собственная флуоресценция клеток (серый (1)). Первый ряд. Комплексы меченых антител и аптамеров с линиями клеток. *a* – Клетки A431 с антителами H11 (зеленый (2)); *б* – клетки A431 с якорным FAM-ДНК-комплементом (оранжевый (2)), клетки A431 с аптамером MJ18h и якорным FAM-ДНК-олигонуклеотидом (голубой (3)); *в* – клетки A431 с якорным FAM-ДНК-комплементом (оранжевый (2)), клетки A431 с аптамером FAM-ME07 (фиолетовый (3)). Второй ряд. Титрование клеток A431 аптамером FAM-ME07: *г* – клетки A431 с разными концентрациями FAM-ME07 (1 – 0 нМ, 2 – 100 нМ, 3 – 250 нМ, 4 – 500 нМ, 5 – 1000 нМ), *д* – интенсивность флуоресценции клеток A431 для различных концентраций FAM-ME07 (1–5 повышение концентрации от 0 до 1000 нМ). Третий ряд. Связывание аптамера FAM-ME07 с различными типами клеток с разной представленностью EGFR (2): *е* – клетки A431, *ж* – клетки U87, *з* – клетки MCF7

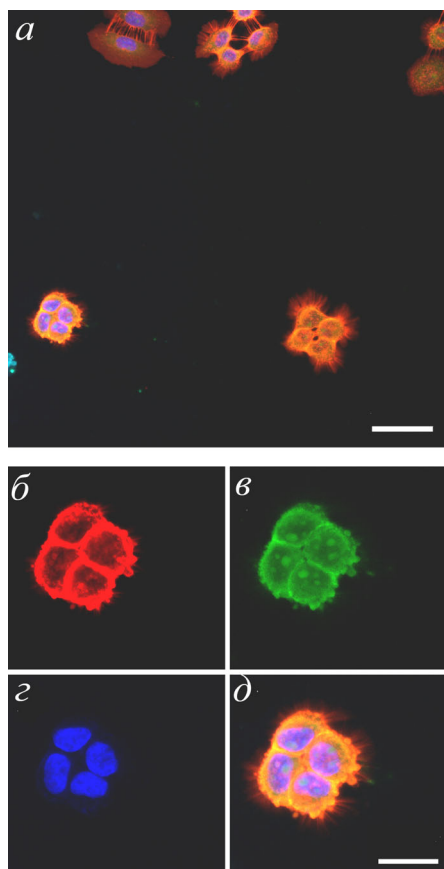


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток после окраски на EGFR. Клетки линии эпидермоидной карциномы A431, суперэкспрессирующие EGFR (замороженный образец). Общее поле для флуоресцентной микроскопии клеток A431 (а). Масштаб – 100 мкм. Окраска б – антителом H11 против EGFR (красный), вторичное антитело – конъюгат с Cy2; в – аптамером FAM-ME07 (зелёный), г – ядра окрашены бисбензими́дом Hoechst 33342 (синий); д – наложение изображений для антитела и аптамера (оранжевый). Масштаб – 20 мкм

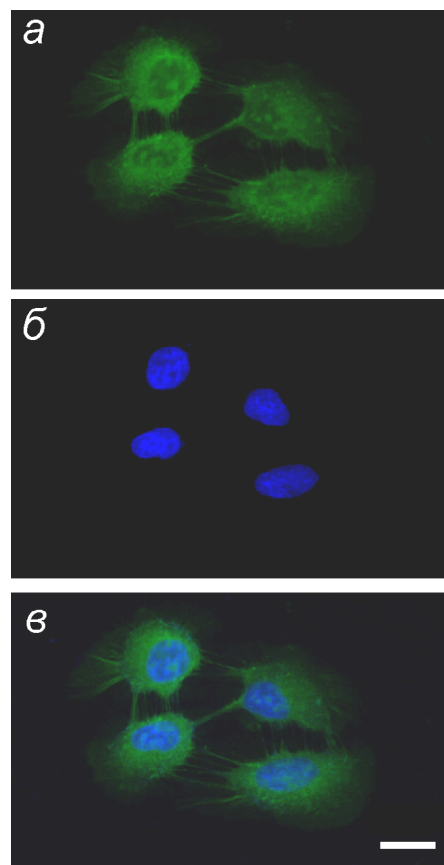


Рис. 4. Окраска клеток линии эпидермоидной карциномы A431 (замороженный образец) аптамером FAM-ME07 (а) (зелёный), окраска ядер бисбензими́дом Hoechst 33342 (б) (синий). в – Совмещение изображений а и б. Масштаб – 20 мкм

вался в цитоплазме. Несмотря на очень высокую концентрацию FAM-ME07, фибробласты практически не окрашивались.

Такие результаты характерны только для живых замороженных клеток. При фиксации клеток формальдегидом наблюдается нехарактерное окрашивание аптамером FAM-ME07 (рис. 6).

Первые положительные полуколичественные результаты аптацитохимии определили удачные попытки аптагистохимии для визуализации EGFR-позитивных клеток в тканях опухоли ГБМ-пациентов. На рис. 7 показана окраска крио-срезы ГБМ, полученного из хирургического биоптата опухоли пациента, с помощью FAM-ME07. EGFR-позитивные клетки составляют довольно значительную часть клеток гетерогенной опухоли и ярко окрашиваются аптамером FAM-ME07.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пионерские работы по получению и изучению свойств аптамерных РНК к рецептору EGFR были сделаны в лаборатории Э. Эллингтона. К внеклеточному домену рецептора сначала получили аптамерную РНК J18 длиной 104 нт, kK_d с EGFR составляла ~ 7 нМ [13, 14]. Затем к химере внеклеточного домена рецептора с константной частью иммуноглобулина селективированы РНК-аптамеры с повышенной стабильностью к нуклеазам, которые содержали 2'-F-пиримидины: E07 длиной 92 нт и его минимизированный вариант ME07 длиной 48 нт [17, 19–22, 26, 27]. При этом структура аптамеров не изучалась.

Нами были проанализированы возможные варианты вторичной структуры как исходных,

так и 2'-F-модифицированных аптамерных РНК, полученных Эллингтоном с коллегами. Для аптамера ME07 предлагаемая нами вторичная структура (рис. 1) отличается от формально предложенной авторами, она допускает возможность формирования единого коаксиального

стэкинг-взаимодействия. Несмотря на разницу в предполагаемых структурах, короткие варианты аптамерных РНК (MJ18) и производных 2'-фтор-пиримидинов РНК (ME07) одинаково хорошо взаимодействуют с EGFR в составе клеток (см. далее).

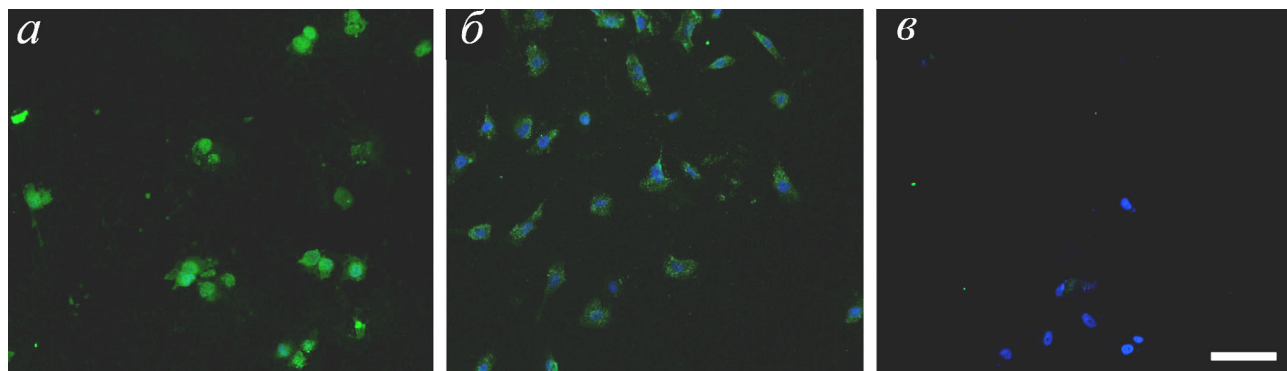


Рис. 5. Окраска клеточных культур с разной представленностью EGFR (замороженные образцы) с помощью аптамера FAM-ME07 (зеленый); окраска ядер бисбензими́дом Hoechst 33342 (синий). *а* – Клетки A431, *б* – первичная клеточная культура глиобластомы человека ROZH. *в* – Фибробласты человека. Масштаб – 50 мкм

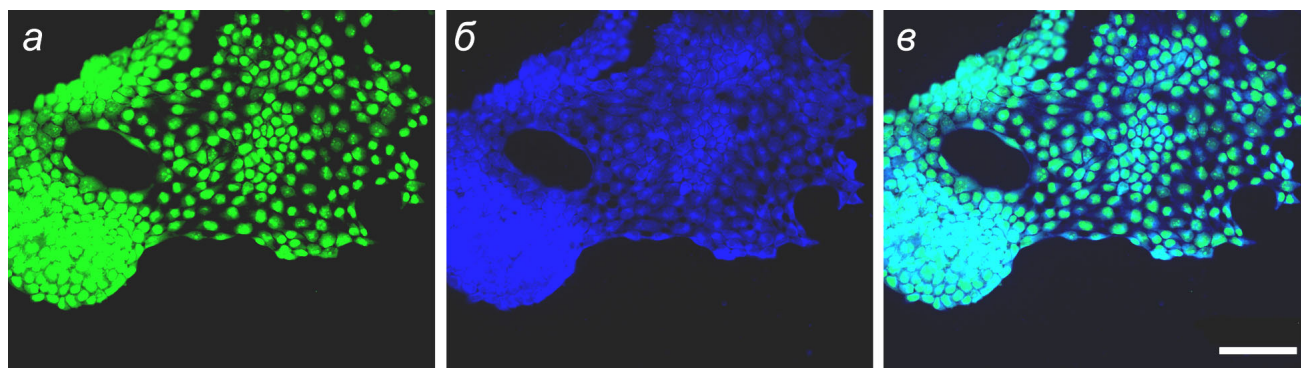


Рис. 6. Окраска фиксированных клеток линии эпидермоидной карциномы A431 с высокой экспрессией EGFR аптамером FAM-ME07 (*а*), окраска ядер бисбензими́дом Hoechst 33342 (*б*), совмещение каналов флуоресценции (*в*). Масштаб – 100 мкм

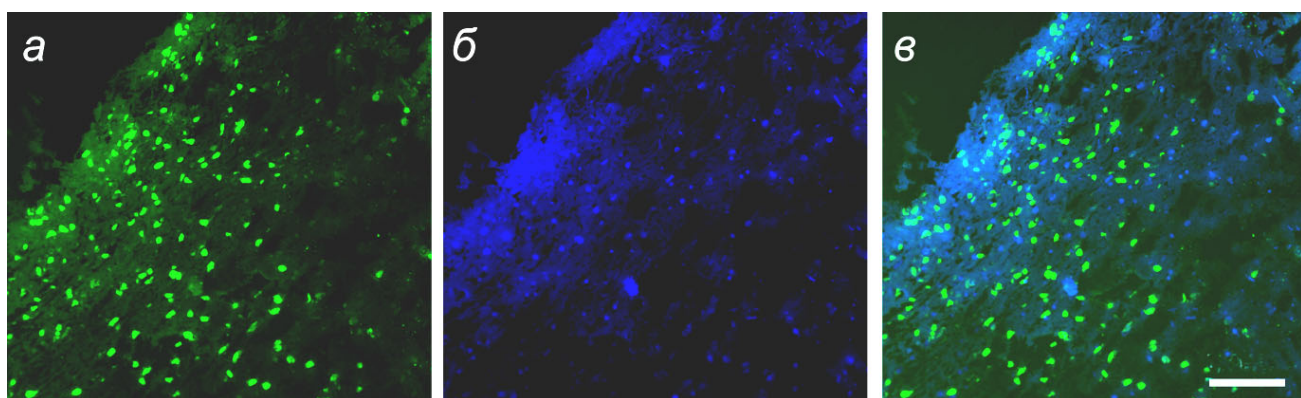


Рис. 7. Окраска крио-срезов нефиксированной опухолевой ткани глиобластомы человека (пациент 76, замороженный образец) аптамером FAM-ME07 (*а*) (зелёный); окраска ядер бисбензими́дом Hoechst 33342 (*б*) (синий). *в* – Результат наложения изображений. Масштаб – 100 мкм

Небольшие размеры и возможность сравнения аптамерных РНК позволяют искать «параапты». По аналогии с антителами, для которых принято использовать термин «эпитоп» для антигенной детерминанты на мишени и термин «паратоп» для узнающего элемента структуры антитела, для аптамеров можно использовать термины «эпиапт» и «параапт» соответственно.

Для применения аптамеров в тераностике прежде всего необходимо изучить возможность их применения для детекции EGFR сначала на поверхности опухолевых клеток, а затем и на тканях. Селекция аптамеров к EGFR проводилась для рекомбинантных белков вне клеток, в составе клеток или ткани может измениться статус EGFR (включая возможные изменения конформации и окружения), что может привести к изменению аффинности и специфичности. Искажать интерпретацию результатов могут и другие обстоятельства. Например, стандартный способ приготовления образца клеток из культуры (или ткани) путём трипсинизации. И, наконец, степень клональной гетерогенности опухоли также может повлиять на возможности детекции EGFR-позитивных клеток в ткани.

В классическом варианте аптамеры селективировали из библиотек РНК, поскольку считалось (и небезосновательно), что РНК, в отличие от ДНК, обладает более развитой третичной структурой благодаря наличию 2'-гидроксила. И действительно, первый аптамер для EGFR, J18, был РНК длиной 104 нт. Нами был получен укороченный вариант аптамера J18, MJ18 длиной 67 нт, который сохранял его аффинность для клеток (рис. 1 и 2).

Однако низкая стабильность к нуклеазам заставила исследователей перейти к использованию 2'-фторпроизводных РНК. Для блокирования нуклеазной активности панкреатического типа используют 2'-фтор-пиримидины (2'-F-Пу). Фторпроизводные РНК не только теряют донорно-акцепторные свойства 2'-гидроксильной группы, но и получают заместитель с сильными гидрофобными свойствами, что не всегда учитывается исследователями. Двухтяжевая структура такой РНК сохраняет А-форму, но повышение гидрофобности сахарофосфатного остова приводит к мало предсказуемой термической стабильности и иногда — к повышенному сродству с белками [42–44].

По этой же причине при использовании аптамерных 2'-F-Пу-РНК для детекции EGFR на поверхности клеток иногда наблюдается повышенное неспецифическое связывание [45]; это требует более тщательных доказательств специфичности 2'-F-Пу-РНК-аптамеров для целей тераностики. Некоторые опубликованные апта-

меры не прошли дополнительные тесты на клетках — ситуация, типична и для моноклональных антител. Необходимо наличие как минимум двух отрицательных контролей. Первый — использование олигонуклеотида с неаптамерной последовательностью оснований; второй — использование клеток с минимальной экспрессией EGFR на поверхности.

Проточная цитофлуорометрия. Оценка количества EGFR на поверхности линейных опухолевых клеток проводилась методом проточной цитофлуорометрии. В качестве стандарта для детекции EGFR на поверхности линейных клеток использовали коммерчески доступное моноклональное антитело H11, которое имеет линейный эпитоп во внеклеточном домене рецептора (в основном в домене 3, аминокислоты 294–543) [46] и которое было мечено с помощью вторичных антител с флуорофором Cy2. В случае 2'-F-Пу-РНК флуоресцентная метка вводилась на 5'-конец аптамера ME07 в процессе синтеза в виде флуоресцеинамидита (FAM).

На рис. 2, а хорошо видно, что клетки A431 с суперэкспрессией EGFR дают хороший сигнал с антителами H11, который проявляется в виде сдвига по абсциссе (правый пик (2)) относительно собственного свечения клеток (левый пик (1)). Хороший сигнал даёт флуоресцентный аптамер 5'-FAM-ME07 (рис. 2, в, правый пик (3)); при этом сигнал для отрицательного контроля с FAM-олигонуклеотидом с неаптамерной первичной структурой совпадает с сигналом от исходных клеток (рис. 2, в, левый пик (2)). Полученные результаты хорошо согласуются с наблюдавшимися ранее [25].

Два других эксперимента, несмотря на их очевидную необходимость, в данной работе выполнены впервые.

Для верификации специфичности аптамера к рецептору в составе клеток очень показательны результаты титрования EGFR на поверхности клеток A431 аптамером FAM-ME07. С повышением концентрации аптамера увеличивается сдвиг по оси абсцисс (рис. 2, г и д). Такой сдвиг оказался настолько характеристическим, что позволил примерно оценить K_d аптамера FAM-ME07 с рецептором EGFR в составе клеток A431. Аффинность аптамера к рецептору в составе клетки хуже, по крайней мере в 100 раз, чем для свободного рецептора: ~100 нМ против 1 нМ соответственно. Подобная закономерность отмечалась ранее, например, аптамеры серии E ингибируют протеинкиназную активность рецептора EGFR при концентрациях ~300 нМ [17].

Из рис. 2 видно, что независимо от природы клеток при убывании количества молекул рецептора на клетку сигнал флуоресценции сдвигается

к собственной флуоресценции клеток, и для клеток MCF7 он практически неотличим. Это указывает на возможные значения нижнего порога копияности при обнаружении рецептора, меченого флуоресцеином. Флуоресцеин – не самый яркий флуорофор, который можно использовать для конъюгации с олигонуклеотидами; например, фикоэритрин на порядок чувствительнее [17].

Таким образом, аптамерную РНК ME07, меченную FAM, можно использовать для полуквантитативной оценки копияности рецептора на поверхности клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Флуоресцентная микроскопия. Принципиально новую информацию о взаимодействии аптамеров с рецептором EGFR на клетках можно получить с помощью флуоресцентной микроскопии. На рис. 3 показано, что флуоресцентный аптамер FAM-ME07 может служить хорошей заменой антителу против EGFR. Во-первых, очевидно, что аптамер FAM-ME07, также как и антитело H11, локализуется на мембране клеток A431. Но, в отличие от комплекса с антителами, комплекс аптамер-рецептор способен проникать в клетку. Известная повышенная склонность комплексов EGFR с лигандами к эндоцитозу позволяет предположить, что интернализация происходит по рецептор-опосредованному механизму. Во-вторых, отсутствие заметной конкуренции антител H11 и аптамеров FAM-ME07 позволяет предположить, что эпитопы EGFR для антител не совпадают с эпитопами EGFR для аптамеров. И, наконец, за 30 мин инкубации при комнатной температуре аптамер FAM-ME07 попадает не только в цитоплазму, но и обнаруживается в ядрышках.

Для уточнения такой необычной локализации аптамера FAM-ME07 в клетках A431 был проведён опыт только с аптамером в отсутствие антитела. На рис. 4 чётко видно свечение аптамера FAM-ME07 в цитоплазме клеток и в ядрышке. Уникальные свойства аптамера FAM-ME07 позволяют надеяться, что его можно будет использовать в качестве эскорт-аптамера для специфической EGFR-опосредованной доставки различных агентов в клетки.

Как и в случае проточной цитофлуориметрии, очень показательные данные были получены при сравнении разных типов опухолевых клеток и фибробластов, которые содержат разное количество рецептора EGFR на поверхности благодаря их природе. На рис. 5 показана окраска аптамером FAM-ME07 следующего набора клеток: положительный контроль – линейные клетки A431; первичная культура клеток ROZH, полученная из хирургического об-

разца ГБМ-пациента; культура клеток фибробластов человека. Для того, чтобы выявить малое количество рецептора на поверхности клеток концентрацию FAM-ME07 повышали в 10 раз – до 1 мкМ. Неудивительно, что при такой концентрации аптамера клетки A431 окрашивались настолько интенсивно, что маскировали окраску ядер. Клетки ГБМ ROZH окрашивались в меньшей степени; аптамер в основном локализовался в цитоплазме. Несмотря на очень высокую концентрацию FAM-ME07, фибробласты практически не окрашивались. Таким образом, как и для проточной цитометрии, очевидно, что независимо от природы клеток при уменьшении количества молекул рецептора на клетку флуоресцентный сигнал убывает. Следовательно, аптамер FAM-ME07 можно использовать для аптацитохимии EGFR. Более того, FAM-ME07 можно будет использовать как эскорт-аптамер для доставки реагентов в опухолевые клетки ГБМ человека.

Позитивные результаты аптацитохимии обусловили первые удачные попытки использования аптагистохимии для визуализации EGFR-позитивных клеток в тканях опухоли ГБМ-пациентов. На рис. 7 показана окраска с помощью FAM-ME07 крио-среза ГБМ, полученного из хирургического биоптата опухоли пациента НМИЦН им. акад. Н.Н. Бурденко. Опухоль гетерогенна, EGFR-позитивные клетки представляют довольно значительную часть клеток опухоли и ярко окрашиваются аптамером FAM-ME07.

Таким образом, начало первого диагностического этапа в аптагераностике ГБМ человека с помощью аптамерной РНК FAM-ME07 – визуализации целевых EGFR-позитивных клонов для гетерогенной опухоли, оказалось успешным. Для развития успеха необходимо повысить чувствительность детекции, например, с помощью других флуорофоров; поискать более эффективные аптамеры; разработать методы универсального введения метки в различные аптамеры; разработать методы введения различных агентов как для диагностики (например, ПЭТ), так и целевой терапии для эрадикации EGFR-положительных клонов.

Дальнейшее развитие аптагераностики для EGFR-положительных клеток опухоли позволит направлено удалять агрессивные клоны из гетерогенной ГБМ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030)) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-01047 мк).

Благодарности. Авторы благодарят А.А. Бизяеву, С.Ф. Дрозда и М.В. Рыжову за постоянную помощь.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием лю-

дей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Копылов А. М., Завьялова Е. Г., Павлова Г. В. и Прохнин И. Н. (2020) Перспективы тераностики глиобластомы с помощью моноклональных антител к рецептору эпидермального фактора роста EGFR, *Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко*, **84**, 113-118, doi: 10.17116/neiro202084031113.
2. Спирин, А. С. (2019) *Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка*, Лаборатория знаний, Москва.
3. Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818-822, doi: 10.1038/346818a0.
4. Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510, doi: 10.1126/science.2200121.
5. Robertson, D. L., and Joyce, G. F. (1990) Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature*, **344**, 467-468, doi: 10.1038/344467a0.
6. Антипова О. М., Завьялова Е. Г., Головин А. В., Павлова Г. В., Копылов А. М., Решетников Р. В. (2018) Успехи применения модифицированных нуклеотидов в технологии SELEX, *Биохимия*, **10**, 1161-1172, doi: 10.1134/S0320972518100020.
7. Метелев В. Г., Орецкая Т. С. (2021) Модифицированные олигонуклеотиды: новые структуры, новые свойства, новые области применения, *Биоорганическая химия*, **47**, 179-183, doi: 10.31857/S0132342321020172.
8. Mendelsohn, J. (2004) EGF receptors as a target for cancer therapy, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **115**, 249-253.
9. Carpenter, G. (1983) The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **31**, 1-19, doi: 10.1016/0303-7207(83)90027-8.
10. Carpenter, G. (1984) Properties of the receptor for epidermal growth factor, *Cell*, **37**, 357-358, doi: 10.1016/0092-8674(84)90365-9.
11. Carpenter, G., and Cohen, S. (1979) Epidermal growth factor, *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 193-216, doi: 10.1146/annurev.bi.48.070179.001205.
12. Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII, *Cancer Res.*, **57**, 4130-4140.
13. Wan, Y., Kim, Y. T., Li, N., Cho, S. K., Bachoo, R., et al. (2010) Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology, *Cancer Res.*, **70**, 9371-9380, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0568.
14. Li, N., Larson, T., Nguyen, H. H., Sokolov, K. V., and Ellington, A. D. (2010) Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells, *Chem. Commun. (Camb.)*, **46**, 392-394, doi: 10.1039/b920865h.
15. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., and Mendelsohn, J. (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model, *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1311-1318.
16. Groner, B., Hartmann, C., and Wels, W. (2004) Therapeutic antibodies, *Curr. Mol. Med.*, **4**, 539-547, doi: 10.2174/1566524043360483.
17. Li, N., Nguyen, H. H., Byrom, M., and Ellington, A. D. (2011) Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer, *PLoS One*, **6**, e20299, doi: 10.1371/journal.pone.0020299.
18. Li, N., Wang, Y., Pothukuchy, A., Syrett, A., Husain, N., et al. (2008) Aptamers that recognize drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6739-6751, doi: 10.1093/nar/gkn775.
19. Wan, Y., Tamuly, D., Allen, P. B., Kim, Y. T., Bachoo, R., et al. (2013) Proliferation and migration of tumor cells in tapered channels, *Biomed. Microdevices*, **15**, 635-643, doi: 10.1007/s10544-012-9721-0.
20. Ilyas, A., Asghar, W., Allen, P. B., Duhon, H., Ellington, A. D., and Iqbal, S. M. (2012) Electrical detection of cancer biomarker using aptamers with nanogap break-junctions, *Nanotechnology*, **23**, 275502, doi: 10.1088/0957-4484/23/27/275502.
21. Wan, Y., Liu, Y., Allen, P. B., Asghar, W., Mahmood, M. A., et al. (2012) Capture, isolation and release of cancer cells with aptamer-functionalized glass bead array, *Lab. Chip.*, **12**, 4693-4701, doi: 10.1039/c2lc21251j.
22. Wan, Y., Mahmood, M. A., Li, N., Allen, P. B., Kim, Y. T., et al. (2012) Nanotextured substrates with immobilized aptamers for cancer cell isolation and cytology, *Cancer*, **118**, 1145-1154, doi: 10.1002/cncr.26349.
23. Avutu, V. (2010) *Avidity Effects of MinE07, an Anti-EGFR Aptamer, on Binding to A431 Cells*, Texas Scholar Works University of Texas at Austin.
24. Kim, H. J., Park, J. Y., Lee, T. S., Song, I. H., Cho, Y. L., et al. (2019) PET imaging of HER2 expression with an 18F-fluoride labeled aptamer, *PLoS One*, **14**, e0211047, doi: 10.1371/journal.pone.0211047.
25. Cheng, S., Jacobson, O., Zhu, G., Chen, Z., Liang, S. H., et al. (2019) PET imaging of EGFR expression using an 18F-labeled RNA aptamer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **46**, 948-956, doi: 10.1007/s00259-018-4105-1. Erratum in: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, (2018) **45**, 2245.
26. Melancon, M. P., Zhou, M., Zhang, R., Xiong, C., Allen, P., et al. (2014) Selective uptake and imaging of aptamer- and antibody-conjugated hollow nanospheres targeted to epidermal growth factor receptors overexpressed in head and neck cancer, *ACS Nano*, **8**, 4530-4538, doi: 10.1021/nn406632u.
27. Ray, P., Cheek, M. A., Sharaf, M. L., Li, N., Ellington, A. D., et al. (2012) Aptamer-mediated delivery of chemotherapy to pancreatic cancer cells, *Nucleic Acid Ther.*, **22**, 295-305, doi: 10.1089/nat.2012.0353.
28. Wang, Y. L., Chang, L. C., Chen, K. B., and Wang, S. C. (2021) Aptamer-guided targeting of the intracellular long-noncoding RNA HOTAIR, *Am. J. Cancer Res.*, **11**, 945-954.
29. Opazo, F., Levy, M., Byrom, M., Schäfer, C., Geisler, C., et al. (2012) Aptamers as potential tools for super-resolution microscopy, *Nat. Methods*, **9**, 938 - 939, doi: 10.1038/nmeth.2179.
30. Strauss, S., Nickels, P. C., Strauss, M. T., Jimenez Sabinina, V., Ellenberg, J., et al. (2018) Modified aptamers enable quantitative sub-10-nm cellular DNA-PAINT imaging, *Nat. Methods*, **15**, 685 - 688, doi: 10.1038/s41592-018-0105-0.
31. Delcanale, P., Porciani, D., Pujals, S., Jurkevich, A., Chetrusca, A., et al. (2020) Aptamers with tunable affinity enable single-molecule tracking and localization of

- membrane receptors on living cancer cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **59**, 18546-18555, doi: 10.1002/anie.202004764.
32. Esposito, C. L., Passaro, D., Longobardo, I., Condorelli, G., Marotta, P., et al. (2011) A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death, *PLoS One*, **6**, e24071, doi: 10.1371/journal.pone.0024071.
 33. Passariello, M., Camorani, S., Vetrei, C., Ricci, S., Cerchia, L., and De Lorenzo, C. (2020) Ipilimumab and its derived EGFR aptamer-based conjugate induce efficient NK cell activation against cancer cells, *Cancers (Basel)*, **12**, 331, doi: 10.3390/cancers12020331.
 34. Peng, L., Liang, Y., Zhong, X., Liang, Z., Tian, Y., et al. (2020) Aptamer-conjugated gold nanoparticles targeting epidermal growth factor receptor variant III for the treatment of glioblastoma, *Int. J. Nanomedicine*, **15**, 1363-1372, doi: 10.2147/IJN.S238206.
 35. Zavyalova, E., Turashev, A., Novoseltseva, A., Legatova, V., Antipova, O., et al. (2020) Pyrene-modified DNA aptamers with high affinity to wild-type EGFR and EGFRvIII, *Nucleic Acid Ther.*, **30**, 175-187, doi: 10.1089/nat.2019.0830.
 36. Wang, T., Philippovich, S., Mao, J., and Veedu, R. N. (2019) Efficient epidermal growth factor receptor targeting oligonucleotide as a potential molecule for targeted cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4700, doi: 10.3390/ijms20194700.
 37. Reuter, J. S., and Mathews, D. H. (2010) RNA structure: software for RNA secondary structure prediction and analysis, *BMC Bioinformatics*, **11**, 129, doi: 10.1186/1471-2105-11-129.
 38. Zok, T., Antczak, M., Zurkowski, M., Popenda, M., Blazewicz, J., et al. (2018) RNApdbee 2.0: multifunctional tool for RNA structure annotation, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W30-W35, doi: 10.1093/nar/gky314.
 39. Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J., and Cohen, S. (1978) Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3317-3321, doi: 10.1073/pnas.75.7.3317.
 40. Obaid, G., Samkoe, K., Tichauer, K., Bano, S., Park, Y., et al. (2021) Is tumor cell specificity distinct from tumor selectivity *in vivo*? A quantitative NIR molecular imaging analysis of nanoliposome targeting, *Nano. Res.*, **14**, 1344-1354, doi: 10.1007/s12274-020-3178-x.
 41. Davidson, N. E., Gelmann, E. P., Lippman, M. E., and Dickson, R. B. (1987) Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines, *Mol. Endocrinol.*, **1**, 216-223, doi: 10.1210/mend-1-3-216.
 42. Pallan, P. S., Greene, E. M., Jicman, P. A., Pandey, R. K., Manoharan, M., et al. (2011) Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3482-3495, doi: 10.1093/nar/gkq1270.
 43. Murray, J. B., Dunham, C. M., and Scott, W. G. (2002) A pH-dependent conformational change, rather than the chemical step, appears to be rate-limiting in the hammerhead ribozyme cleavage reaction, *J. Mol. Biol.*, **315**, 121-130, doi: 10.1006/jmbi.2001.5145.
 44. Piao, X., Wang, H., Binzel, D. W., and Guo, P. (2018) Assessment and comparison of thermal stability of phosphorothioate-DNA, DNA, RNA, 2'-F RNA, and LNA in the context of Phi29 pRNA 3WJ, *RNA*, **24**, 67-76, doi: 10.1261/rna.063057.117.
 45. Li, N., Ebright, J. N., Stovall, G. M., Chen, X., Nguyen H. H., et al. (2009) Technical and biological issues relevant to cell typing with aptamers, *J. Proteome Res.*, **8**, 2438-2448, doi: 10.1021/pr801048z.
 46. Cochran, J. R., Kim, Y. S., Olsen, M. J., Bhandari, R., and Wittrup, K. D. (2004) Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments, *J. Immunol. Methods*, **287**, 147-158, doi: 10.1016/j.jim.2004.01.024.

RNA APTAMER FOR THERANOSTICS OF HUMAN BRAIN GLIOBLASTOMA

A. M. Kopylov^{1*}, L. V. Fab², O. Antipova¹, E. A. Savchenko³, A. V. Revishchin², V. V. Parshina², S. V. Pavlova², I. I. Kireev¹, A. V. Golovin^{1,4}, D. Y. Usachev³, and G. V. Pavlova^{2,3,4}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: kopylov.alex@gmail.com

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia

³ Institution "Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125047 Moscow, Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, 11999 Moscow, Russia

Conventional approaches for studying and molecular typing of tumors include PCR, blotting, omics, immunocytochemistry and immunohistochemistry; the last two methods are the most common ones because they detect protein marker and localize it within the cell. The study has demonstrated RNA aptamer abilities as alternatives to monoclonal antibodies for aptacytochemistry and aptahistochemistry of human glioblastoma multiform (GBM). 2'-F-pyrimidyl-RNA aptamer ME07, 48 nucleotides long, which is specific to epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB1, Her1). Application of flow cytometry with fluorescein derivative FAM-ME07 has proved aptamer specificity to the receptor within the cells, it has estimated semi-quantitatively apparent dissociation constant with the receptor within the cells, as well as number of EGFR on the cell surface. The following cell lines have been used having different EGFR copy number: A431 (10⁶ receptor copies per cell), U87 (10⁴ receptor copies per cell), MCF7 (10³ receptor copies per cell), primary culture cells of glioblastoma of patient ROZH. With fluorescent microscopy it has been shown directly interactions of FAM-ME07 with the receptor within A431 cells with the following internalization into the cytoplasm, and then into the nucleolus, which opens possibilities of application of ME07 as escort-aptamer to deliver of therapeutic reagents into the tumor cells. FAM-ME07 efficiently stains sections of clinical specimens of patient GBM, and it precisely indicates EGFR-positive clones within heterogeneous tumor, which is a base to move research to study animal models of GBM.

Keywords: 2'-fluoro-pyrimidyl-RNA-aptamer, EGFR, human glioblastoma, cell cultures, flow cytometry, fluorescence microscopy