

Aptamerer – en ny type reagenser til forskning, diagnostik og behandling

Overlæge Michael Kemp, e-mail: mke@ssi.dk,
overlæge Jens Jørgen Christensen,
professor Hans Jørn J. Kolmos & projektforsker Keld Andresen

Statens Serum Institut, Afdeling for Bakteriologi,
Mykologi og Parasitologi, og
Odense Universitetshospital, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling

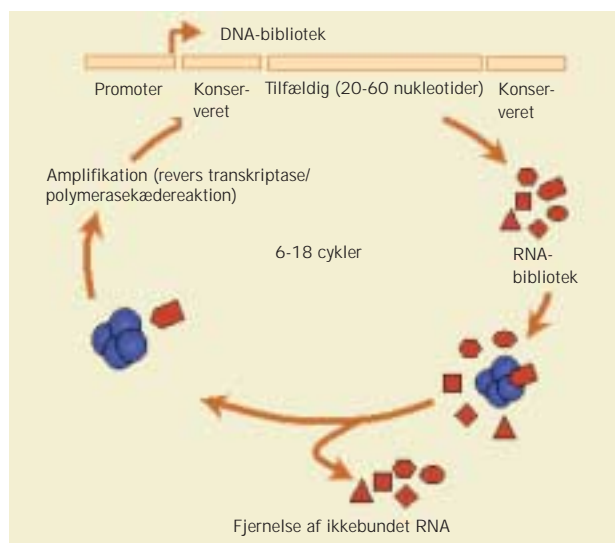
DNA- og RNA-aptamerer er enkeltstrengede molekyler, der folder og danner tredimensionale strukturer, der ligesom anti-stoffer kan binde til definerede mål (*targets*). Aptamerer binder meget specifikt og kan bl.a. skelne mellem proteiner med forskellig fosforyleringsgrad, D- og L-former af molekyler, mv. Den genetiske kode, aptamerer måtte indeholde, er i denne sammenhæng som regel irrelevant. Der findes naturligt forekommende aptamerlignende RNA-molekyler med biologiske funktioner som katalytisk aktivitet og regulation af genskspresion [1].

Udgangspunktet for dannelsen af aptamerer er syntese af et oligonukleotidbibliotek, der indeholder op til 10^{15} forskellige oligonukleotider med en længde på 80-100 baser. De enkelte oligonukleotider består af en variabel sekvens i midten på ca. 40 baser flankeret af to konserverede sekvenser, som er indbyrdes forskellige (Figur 1). Den specifikke tredimensionale struktur af de enkelte aptamerer bestemmes af den variable del, mens de konserverede sekvenser benyttes til kopie-

ringer af molekylet ved polymerasekædeamplifikation. Isoleringen af et enkelt specifikt bindende aptamer ud fra biblioteket sker ved gentagen selektion og amplifikation. Proceduren, der benævnes *systemic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX), kan med et automatiseret system udføres på få dage [2]. Da man almindeligvis blander forskellige aptamerer rettet mod det samme *target*, skal de enkelte aptamerer isoleres, klones og efterfølgende DNA-sekventeres, inden de hver især kan syntetiseres i stor skala. Aptamerer fremstilles in vitro uden immunsystemets medvirken, hvorfor der kan skabes aptamerer, der binder til nonimmunogene strukturer, og der kan endvidere skabes aptamerer, der reagerer med native toksiner eller andre komponenter, som kun vanskeligt kan bruges til immunisering. Aptamerer er relativt små, og de kan derfor ofte benyttes, hvor der er steriske hindringer for antistoffer.

Aptamerer kan benyttes til detektion af specifikke molekyler i testsystemer, der er opbygget som traditionelle immuno-*assays* [3]. Deres ringe størrelse gør det muligt at beklæde overflader med stor tæthed, hvilket gør dem særdeles egnede til *microarray*-systemer. Ved at benytte molekylærbio-logiske metoder til påvisning af bundet aptamer, kan følsomheden af analyserne øges op til 1.000 gange i forhold til konventionelle enzym- og fluorescensimmuno-*assays*. Brugen af aptamerer sammen med nye ultrafølsomme biosensorer fremstår meget lovende [4]. Også i immunhistokemi/in situ-hybridiseringslignende systemer har aptamerer været succesfulde i tilfælde, hvor traditionelle reagenser ikke kunne benyttes. Aptamerer, der er immobiliseret på overflader, kan benyttes til affinitetskromatografisk oprensning af *targets*, som efterfølgende kan frigøres i nativ form under milde elueringsbetingelser. Udtrykket *target validation* dækker over en proces, der påviser, at et givet molekyle eller en nukleinsyresekvens er direkte involveret i en sygdomsproces, og at det derfor kan udgøre et mål for nye lægemidler. Der benyttes forskellige teknikker, som oftest har til formål at hæmme den normale funktion af det pågældende molekyle. Aptamerers korte produktionstid, høje diskriminatoriske evne samt muligheden for intracellulær ekspresion og funktion gør dem ofte attraktive til *target validation*.

Da aptamerer produceres uden anvendelse af dyr, indebærer de ikke nogen af de problemer, der er forbundet med terapeutiske antisera. Bemærkelsesværdigt nok har der kun været begrænset interesse i udvikling af aptamerer som antidoter ved forgiftninger. For bl.a. antisera med ringe forsynings-sikkerhed, f.eks. antisera mod bakterielle og animalske toksiner, synes aptamerer at udgøre et oplagt alternativ. Andre læge-



Figur 1. Fremstilling af aptamerer ved *systemic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX)-procedure. Modificeret fra [2].