

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-363

**ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ АПТАМЕРЫ К АНТАГОНИСТАМ WNT-ПУТИ DICKKOPF-1
И СКЛЕРОСТИНУ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТАРГЕТНЫЕ СРЕДСТВА
ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТЕОПОРОЗА***

**OLIGONUCLEOTIDE APTAMERS TO WNT PATHWAY ANTAGONISTS DICKKOPF-1
AND SCLEROSTIN AS PROMISING TARGET AGENTS
FOR THE TREATMENT OF OSTEOPOROSIS**

Н. А. Слажнева¹, Н. А. Бондаренко¹, М. А. Воробьева²,
Е. А. Шатунова², В. В. Коваль^{1,2}, В. О. Омельченко¹

¹*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*

²*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

N.A. Slazhneva¹, N.A. Bondarenko¹, M.A. Vorobyeva²,
E.A. Shatunova², V.V. Koval^{1,2}, V.O. Omelchenko¹

¹*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk*

²*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ sitnikovanat9@gmail.com

Аннотация

Остеопороз — глобальная проблема здравоохранения, значение которой увеличивается с ростом и старением населения. В данном исследовании на модели *in vitro* оценен потенциал использования аптамеров к антагонистам Wnt-пути для лечения остеопороза. Установлено, что модифицированные ДНК-аптамеры к белкам Dickkopf-1 и склеростину влияют на уровни экспрессии ключевых генов, задействованных в ремоделировании костной ткани: гена коллагена 1-го типа и гена RANKL.

Abstract

Osteoporosis is a global health problem whose importance increases with the growth and aging of the population. Here, we estimated *in vitro* the potential of aptamers targeted to Wnt antagonists for osteoporosis treatment. It was found that modified DNA aptamers against Dickkopf-1 and sclerostin proteins influence the levels of expression of key genes involved in bone tissue remodeling, namely the type 1 collagen gene and the RANKL gene.

Введение

Остеопороз является серьезным заболеванием с потерей костной массы, снижением плотности кости и разрушением ее микроструктуры. Его развитие находится под контролем нескольких сигнальных путей, в том числе Wnt-пути, который регулирует дифференцировку и пролиферацию хондроцитов, остеобластов, мезенхимальных стволовых клеток и остеокластов [1]. Антагонисты Wnt-пути Dickkopf-1 (DKK-1) рассматривают в качестве мишений для лечения остеопороза. Перспективным способом таргетного ингибирования функциональной активности белков является использование олигонуклеотидных аптамеров.

Цель — исследовать влияние аптамеров к DKK-1 и склеростину на уровни экспрессии ключевых для ремоделирования костной ткани генов коллагена 1-го типа и RANKL в остеобластах человека.

Материалы и методы

В работе использованы ДНК-аптамеры к склеростину apscl56 [2] и scl2 [3], ДНК-аптамеры к DKK-1 TD10 [4] и DK4_41t [5]. Для повышения их биологической устойчивости заменяли четыре концевых дезоксирибонуклеотида 2'-О-метилрибонуклеотидами и вводили на 3'-конец 3'-3'-фосфодиэфирную связь. В случае аптамера scl2 модифицировали только 5'-фрагмент (scl2-1) либо 5'- и 3'-фрагменты (scl2-2). Аптамеры были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом. Их аффинности оценивали колориметрически с иммобилизацией белка в лунках планшета. Остеобlastы человека U2OS культивировали в течение 14 дней в остеогенной среде, затем вносили аптамеры (500 нМ) на 24 и 48 ч. Клетки лизировали реагентом «Лира» (Биолабмикс) и выделяли РНК хлороформ-изопропаноловым методом. Для количественной ОТ-ПЦР использовали набор Биолабмикс с праймерами к генам коллагена 1-го типа, RANKL и флуоресцентными зондами, на приборе LightCycler480 (Roche).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-20111) и Правительства Новосибирской области (соглашение № 81).

Результаты

Получена серия химически модифицированных ДНК-аптамеров к склеростину и DKK-1, специфично связывающих белки-мишени с константами диссоциации в диапазоне 3–41 нМ. Количественный ОТ-ПЦР-анализ показал, что аптамеры к склеростину scl2-1, scl2-2 повышают экспрессию гена коллагена 1-го типа в остеобластах через 24 ч в 2,8 и 3,8 раза соответственно, а через 48 ч уровень экспрессии снижается до контрольного (без добавления аптамеров). Для аптамера aptscl56 отмечена та же тенденция, но повышение уровня экспрессии выражено менее значимо. Аптамеры к DKK-1 (TD10 и DK4_41t) не изменяют уровень экспрессии гена коллагена через 24 ч, а через 48 ч он значимо снижается.

Влияние аптамеров на уровень экспрессии цитокина RANKL оказалось разнонаправленным. Так, аптамеры scl2-1 и TD-10 повышают уровень экспрессии гена RANKL по сравнению с контролем через 24 ч. В случае scl2-2 и DK4_41t уровень экспрессии RANKL через 24 ч не изменяется, а в случае аптамера aptscl56 — значимо снижается. При этом все исследованные аптамеры через 48 ч инкубации значительно снижали уровень экспрессии RANKL. Известно, что цитокин RANKL, продуцируемый остеобластами, активирует остеокласты, а для лечения остеопороза важно снижать их активность.

Выходы

Таким образом, аптамеры к склеростину увеличивают экспрессию гена коллагена 1-го типа в остеобластах, что может свидетельствовать о подавлении активности склеростина и активации Wnt-пути, регулирующего функциональную активность клеток, в остеобластах. Влияние аптамеров на экспрессию гена RANKL является более комплексным. Можно заключить, что аптамеры являются перспективными для более детального изучения их таргетных взаимодействий с ингибиторами Wnt-пути, подбора оптимального режима дозирования и исследования активности *in vivo*.

Литература

1. Liu J., Xiao Q., Xiao J. et al. Wnt/β-catenin signaling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities // Signal Transduction Targeted Ther. 2022. Vol. 7. P. 3.
2. Yu Y., Wang L., Ni S. et al. Targeting loop3 of sclerostin preserves its cardiovascular protective action and promotes bone formation // Nature Communications 2022. Vol. 13. P. 4241.
3. Shum K. T., Chan C., Leung C. M. et al. Identification of a DNA aptamer that inhibits sclerostin's antagonistic effect on Wnt signalling // Biochemistry Journal. 2011. Vol. 434. P. 493–501.
4. Zhou Y., Li W., Tseng Y. J. et al. // Developing slow-off Dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma. Talanta. 2019. Vol. 194. P. 422–429.
5. Shatunova E. A., Rychkova A. S., Meschaninova M. I. et al. Novel DNA aptamers to Dickkopf-1 protein and their application in colorimetric sandwich assays for target detection in patients with axial spondyloarthritis // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25. P. 12214.