بررسی پتانسیل مهاری پپتید ANP برای هدف‌گیری مسیر Wnt-βcatenin از طریق گیرنده FZD7

نجمه دهقان بنادکی[1]، مجید تقدیر[2]*، رضا حسن ساجدی[3]، حسین نادری‌منش[4]

1- دکتری تخصصی بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- دکتری تخصصی بیوفیزیک، استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- دکتری تخصصی بیوشیمی، دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
4- دکتری تخصصی بیوفیزیک، استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: Taghdir@modares.ac.ir
تلفن: 02182884701، فکس: 02182884718، کد پستی: 14115-175

دریافت: 1399/2/26 پذیرش: 1399/10/10

چکیده:

گیرنده فریزلد7 (FZD7) به‌عنوان هدفی نوظهور برای درمان سرطان‌هایی است که در آنها مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین به‌طور نابه‌جا فعال می‌شود. این گیرنده تراغشایی، در بسیاری سرطان‌ها به‌دلیل اینکه سرطان پستان و سرطان تخمدان دچار افزایش بیان می‌شود و بنابراین هدف‌گیری اختصاصی آن دارای اهمیت است. از طرف دیگر، یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی برای تأثیرات ضدسرطانی پپتید نیتریورتیک دهلیزی (ANP) که در ابتدا به‌عنوان یک هورمون قلبی شناخته شده بود، مهار مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین از طریق فرایندی وابسته‌به FZD است، این در حالی است که مکانیسم مولکولی، این مهار مشخص نیست. در این مطالعه، ما با استفاده از روش‌های محاسباتی شامل مدل‌سازی، داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و همچنین طراحی یک سیستم سلولی با قابلیت ردیابی سینتیک مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین، توانستیم مکانیسم تأثیر این پپتید را بررسی کنیم. نتایج محاسباتی ما نشان می‌دهد ANP می‌تواند به‌طور مستقیم با گیرنده FZD7 میان‌کنش دهد و همچنین، جایگاه اتصال آن با دمین انتهای کربوکسیل لیگاند Wnt (Wnt-CTD) دارای همپوشانی است. یافته‌های مطالعات خاموش‌سازی ژن، وابستگی فعالیت مسیر Wnt-بتاکاتنین را در سیستم سلولی به گیرنده FZD7 تأیید می‌کند. از طرف دیگر، کاهش محتوای بتاکاتنین و در واقع فعالیت مسیر Wnt-بتاکاتنین در سلول‌های تیمارشده با Wnt و ANP در مقایسه با کنترل معنی‌دار است. درنهایت، نتایج ما نشان می‌دهد پپتید ANP این قابلیت را دارد تا به‌عنوان یک چارچوب برای طراحی پپتیدهای اختصاصی، علیه گیرنده FZD7 به کار رود.

کلیدواژگان: گیرنده فریزلد 7، پپتید نیتریورتیک دهلیزی، انتقال پیام Wnt

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

1. مقدمه

این یک واقعیت فراتر از شگفت‌انگیز است که سلول‌ها می‌توانند در محیط شلوغ سلولی تصمیم‌های درست زیست‌شناختی بگیرند. در واقع، آنها می‌توانند اطلاعات دریافتی از داخل و خارج سلول را براساس هدف مشخص، یکپارچه‌سازی کنند و پاسخ مناسب را از طریق تنظیم الگوی شبکه انتقال پیام[1] اعمال کنند [1, 2]. تومورزایی[2]، می‌تواند به‌عنوان اختلال عملکرد این شبکه‌های انتقال پیام[3] پیچیده که ارتباطات مولکولی و فرایندهای سلولی را تنظیم می‌کنند، تفسیر شود [3]. در بین انواع مسیرهای انتقال پیام، پیام‌رسانی Wnt وابسته‌به بتاکاتنین، دارای اهمیت بسیاری است. پیام‌رسانی Wnt وابسته‌به بتاکاتنین، یک مسیر بسیار تنظیم‌شده است و در فرایندهای زیست‌شناختی مختلف، شامل مراحل متفاوت تکوین رویان، ترمیم بافت‌های بالغ و بسیاری از بیماری‌های انسانی از جمله انواع سرطان نقش دارد [4, 5]. نقش کلیدی در تنظیم مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین، بر عهده کمپلکس تخریب[4] است [6] . این کمپلکس، از پروتئین ساختاری اکسین[5] به‌عنوان مرکز و چهار جزء مهم دیگر شامل APC[6] ، CKI[7] ، GSK3β[8] و بتاکاتنین تشکیل شده‌است. جهش در اجزای تشکیل‌دهنده کمپلکس تخریب منجر به سرطان می‌شود [7, 8]. بیان بالای گیرنده‌های سطحی مسیر شامل LRP6[9] و فریزلد[10] (FZD) نیز در سرطان پستان منفی سه‌گانه[11] گزارش شده است [9, 10]. پس از تشکیل کمپلکس سه‌گانه بین لیگاند Wnt و گیرنده‌های FZD و LRP6، پروتئین سیتوپلاسمی Dlv[12] به استخدام غشا درمی‌آید. همچنین، کیناز GSK3β منجر به فسفرلاسیون LRP5/6 می‌شود. که این فرایند، موجب ایجاد جایگاه اتصال بین پروتئین اکسین درگیر در ساختمان کمپلکس تخریب و بخش سیتوپلاسمی LRP می‌شود. نتیجه این فرایند، تنظیم پایین‌دستی کمپلکس تخریب است. درنهایت، مهار کمپلکس تخریب باعث می‌شود سطح غلظت سیتوپلاسمی بتاکاتنین بالا رود و این پروتئین بتواند به هسته وارد شود و در آن‌جا با فاکتور سلول T(TCF[13]) /فاکتور بهبوددهنده لنفوئید(LEF[14]) که از خانواده پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA هستند میان‌کنش دهد. پروتئین‌های TCF/LEF به ژن‌های تنظیم‌کننده مسیر Wnt متصل می‌شوند و رونویسی آنها را آغاز می‌کنند [11]. FZD7 به‌عنوان یکی از گیرنده‌های مسیر Wnt متعلق به خانواده پروتئین‌های هفت بارگذرنده از غشا[15]، FZD است. از آن‌جا که این گیرنده در سطح سلول بیان می‌شود و دارای الگوهای بیانی توموری-جنینی[16] است و مقدار بیان آن در بافت‌های عادی بالغ پایین است، یک بخت منحصر به فرد برای هدف‌گیری سلول‌های سرطانی و تداخل در فرایند رشد آنها محسوب می‌شود [12, 13]. این گیرنده در سرطان‌هایی با منشأ متفاوت شامل مغز، کلیه، تخمدان و پستان بیان می‌شود [12]. FZD7 در رده‌های سلولی مختلف سرطان کبد به مقدار بالا بیان می‌شود و همچنین، در تکثیر سلولی سرطان پستان منفی سه‌گانه نقش ضروری دارد [10, 14]. با توجه به موارد ذکر شده، FZD7 ، به‌عنوان یک «پاشنه آشیل[17]» برای هدف‌گیری سرطان مطرح می‌شود [15]. در مطالعه‌ای مشخص شد آنتی‌بادی

1. Signal transduction
2. Tumorigenesis
3. Signal transduction network
4. Destruction complex
5. Axin
6. Adenomatous polyposis coli
7. Casein Kinase I alpha
8. Glycogen Synthase Kinase 3β
9. Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
10. Frizzled
11. Triple negative breast cancer
12. Dishevelled
13. T-cell factor
14. Lymphoid enhancer facto
15. Seven-transmembrane
16. Onco-fatal
17. Achill heel

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

OMP18-R5 می‌تواند این گیرنده را هدف قرار دهد [16]. همچنین، به‌تازگی پپتیدی طراحی شده که می‌تواند با القای تغییر بنای فضایی در دمین خارج سلولی این گیرنده و شکاف متصل شونده به لیپید آن، مسیر پیام‌رسانی Wnt را در سلول‌های بنیادی روده کوچک مهار و روند رشد این سلول‌ها را تخریب کند [17]. در بین مولکول‌های با پتانسیل مهار فعالیت پروتئین‌های خانواده FZD، پپتید نیتریورتیک دهلیزی[18] (ANP) دارای اهمیت ویژه است . این پپتید که به خانواده هورمون‌های قلبی تعلّق دارد با تأثیر بر تنظیم فشار و حجم خون، هموستازی[19] محیط قلبی-عروقی را تنظیم می‌کند [18]. همچنین، این پپتید، تکثیر سلول‌های سرطانی با منشأ متفاوت را مهار می کند [19]. بر اساس یک فرضیه، پپتید ANP، تأثیر مهاری خود را از طریق میان‌کنش مستقیم یا غیرمستقیم با گیرنده FZD انجام می‌دهد، هرچند مکانیسم دقیق مولکولی این فرایند مشخص نیست. در واقع، سرافینو[20] و همکاران، مکان‌یابی مشترک[21] پپتید ANP و گیرنده FZD7 را، 30 دقیقه پس از تیمار سلول‌های سرطانی با پپتید ANP، در سطح سلول و با استفاده از تکنیک ایمیونوفلورسانس مشاهده کردند اما جزئیات و نحوه میان‌کنش پپتید ANP با گیرنده FZD در سطح مولکولی مورد بررسی قرار نداده‌اند[20]. در این مطالعه، ما قصد داریم با یک دیدگاه مبتنی بر ساختار، پتانسیل بالقوه پپتید ANP ، برای میان‌کنش مستقیم با گیرنده FZD7 را، با توجه به اهمیت این گیرنده در انواع سرطان‌های انسانی بررسی و از طرف دیگر، قابلیت پپتید ANP برای رقابت با لیگاند Wnt3a برای اتصال به FZD7 و تأثیر مستقیم آن بر سینتیک مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین مورد بررسی قرار دهیم.

2. مواد و روش‌ها

مدل‌سازی پروتئین

ساختار 28 اسیدآمینه‌ای پپتید ANP ، با استفاده از ساختار بلورنگاری باقیمانده‌های 6 تا 26 این پپتید در کمپلکس با گیرنده نوع C آن (PDB ID: 1YK0) جداسازی و اسیدهای آمینه حذف‌شده ابتدایی و انتهایی پپتید، با استفاده از برنامه Modeller 9.17 بازسازی شد. برای مدل‌سازی Wnt3a انسانی، توالی اسیدآمینه‌ای از پایگاه‌داده Uniport با شناسه اختصاصی P56704 به دست آمد. موتور جست‌و جوی بلاست[22]، ساختار بلورنگاری Wnt3 (PDB ID: 6AHY) در کمپلکس با FZD8 موشی را به‌عنوان بهترین و تنها الگو با 87%. شباهت انتخاب کرد و Wnt3a از طریق نرم‌افزار تحت وب SWISS-MODEL مدل‌سازی شد.

هم‌ترازسازی جفتی توالی[23]

برای تعیین اسیدهای آمینه ضروری و حفظ‌شده درگیر در میان‌کنش FZD7 و Wnt3a، یک هم‌ترازی جفتی توالی بین FZD7 انسانی و FZD8 موشی و همچنین Wnt3a انسانی و Wnt3 انسانی انجام گرفت. باقی‌مانده‌های حفظ‌شده از نظر ویژگی‌های شیمیایی و فضایی با استفاده از این هم‌ترازی استخراج شد. این باقیمانده‌ها به‌عنوان باقیمانده فعال در فرایند شبیه‌سازی میان‌کنش بین ملکولی استفاده شد.

شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی داکینگ

شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی با استفاده از سرور کلاسپرو2,0 [24] و سرور هدداک2,02 [25] انجام شد. با استفاده از سرور کلاسپرو2,0 فرایندی شبیه‌سازی بدون پیش‌فرض با هدف بررسی چگونگی میان‌کنش پپتید

18. Atrial natriuretic peptide
19. Homeostasis
20. Serafino
21. Co-localization

22. Blast search engine
23. Pairwise sequence alignment
24. ClusPro2.0
25. Haddock 2.02

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

ANP با گیرنده FZD7 انجام شد. ساختار بلورنگاری FZD7 (PDB ID: 5T44) به‌عنوان گیرنده و ساختار نماینده کلاستر با بیشترین فراوانی به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتید ANP به‌عنوان لیگاند، استفاده شد. درنهایت، بهترین مدل کمپلکس بر اساس انرژی و تعداد عضو کلاسترها انتخاب شد.

جهت ساخت یک کمپلکس مدل بین Wnt3a انسانی و FZD7 انسانی، از اطلاعات حفظ‌شدگی توالی به دست آمده از ساختار بلورنگاری کمپلکس Wnt3 انسانی و FZD8 موشی استفاده شد. باقی‌مانده‌های احتمالی میان‌کنش‌دهنده بین Wnt3a و FZD7 بر اساس هم‌ترازی توالی‌ها انتخاب شدند و به‌عنوان باقی‌مانده فعال[26] وارد برنامه هدداک2,02 شدند. باقی‌مانده‌هایی که در توالی پروتئین، اطراف باقی‌مانده‌های فعال قرار داشتند، به‌عنوان باقی‌مانده منفعل[27]، به‌عنوان ورودی برنامه استفاده شد. بهترین کمپلکس‌ها براساس امتیاز به‌دست آمده از برنامه هدداک2,02 تخاب شدند.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

در این مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی All-Atom بر روی سه مجموعه ساختار انجام شد. یک شبیه‌سازی به طول200 نانوثانیه برای ANP و دو شبیه‌سازی 50 نانو ثانیه‌ای روی کمپلکس های ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7 مشتق شده از فرایند شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی داکینگ انجام گرفت.

کل فرایندها با استفاده از بسته نرم‌افزاری GROMACS 5.0.7 و میدان نیرو Amber ff03 انجام شد. از مدل آب TIP3P در شبیه‌سازی استفاده شد. برای داشتن غلظت نمک فیزیولوژیک سیستم خنثی شد و شرایط مرزی تکراری[28] برای هر ساختار ابتدایی تعریف شد. از روش شدیدترین کاهش[29] برای حداقل‌سازی انرژی[30] به تعداد 5000 مرحله انجام شد. سپس سیستم به مدت 100 نانوثانیه تحت تعادل‌رسانی در حجم ثابت قرار گرفت تا دما روی 310 درجه کلوین تنظیم شود. به‌عنوان حمام خارجی، از ترموستات برندسن[31] ستفاده شد. برای تنظیم فشار روی ا اتمسفر، خروجی این مرحله وارد فاز تعادل‌رسانی100 نانوثانیه دوم شد. در این مرحله از الگوریتم پارانیلو-رحمان [32] به عنوان جفت‌کننده فشار[33] استفاده شد. شرایط مرحله تولید شبیه‌سازی دقیقاً یکسان با مرحله تعادل‌رسانی فشار انجام شد. آنالیز نتایج با استفاده از بسته ابزار استاندارد GROMACS روی 10 نانوثانیه انتهایی شبیه‌سازی انجام شد. مجسم‌سازی[34] ساختارها با استفاده از برنامه های PyMOL و Swiss PDB viewer انجام شد. آنالیز میان‌کنش‌ها از طریق سرور WHAT IF و PDBsum انجام گرفت. معیار تغییر مقدار سطح در دسترس برای اسیدهای آمینه 20 آنگستروم در نظر گرفته شد.

سنتز توالی پپتید ANP

توالی پپتید ANP، SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY و توالی پپتید کنترل GGSLRSCYSRLRMSISGAFRDGCRFNGQ توسط نماینده هلندی شرکت ژن-اسکریپت[35] ساخته و به شکل پودر لیوفیلیزه شده دریافت شد. پپتید کنترل، دارای طول، محتوای اسید آمینه و پیوند دیسولفید بین اسیدهای آمینه 7 و 23 همانند پپتید ANP است اما توالی اسیدهای آمینه مورد استفاده در این پپتید با ANP متفاوت

26 .Active
27. Passive
28 .Periodic boundary condition

29. Steepest decent
30. Energy minimization
31. Berendsen
32. Parrinello-Rahman
33. Pressure coupling
34. Visualization
35. Genscript

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

می‌باشد.پپتید ANP و پپتید کنترل آن، به راحتی در آب حل می‌شوند.

سلول‌های مورد استفاده و نحوه کشت آنها

سلول‌های L (CRL-2648) و سلول‌های L Wnt3a (CRL-2647) از ATCC خریداری شد. سلول‌ها در DMEM(HG)، حاوی 1% آنتی‌بیوتیک Pen/Strep و 10% پروتئین FBS کشت داده و نگه‌داری شد. سلول ها تا پاساژ 17 مورد استفاده قرار گرفتند.

سلول L سلولی فیبروبلاستی موشی است. این سلول، در زمان صفر و در عدم حضور لیگاند Wnt، دارای مقدار بتاکاتنین در نزدیک به صفر است. بتاکاتنین، محصول مستقیم مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین است و مقدار آن در سیتوزول، بازخوانی مستقیم فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین می‌باشد و بنابراین، برای مطالعه مداخلات دارویی در این مسیر، ایدئال است.

از طرف دیگر، محیط تحت تأثیر سلول‌های L Wnt3a حاوی لیگاند Wnt3a ، فعال کننده مستقیم مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین می‌باشد.

جمع‌آوری محیط تحت‌تأثیر[36]

به‌منظور جمع‌آوری محیط تحت‌تأثیر، سلول‌های موجود در یک پلیت 10 سانتیمتری دارای تراکم مناسب، پاساژ و به 5 پلیت دیگر انتقال داده شد. پس از 3 روز، محیط اطراف سلول‌های 4 پلیت از 5 پلیت، در شیشه استریل جمع‌آوری گردید. به سلول‌های این 4 پلیت، محیط کشت تازه اضافه شد و دوباره داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از سه روز محیط این پلیت‌ها جمع‌آوری و به محتوای قبلی اضافه و سلول‌ها دور ریخته شد. از محیط تحت‌تأثیر سلول‌های L Wnt3a به‌عنوان محیط محتوی پروتئین Wnt3a و از محیط تحت‌تأثیر اطراف سلول‌های L به‌عنوان محیط کنترل استفاده شد.

بهینه‌سازی سیستم سلولی برای مطالعه روند سینتیک تغییرات بتاکاتنین

بهینه‌سازی پنجره زمانی با هدف پیدا کردن حداقل زمان مورد نیاز و حداکثر زمان ممکن برای مشاهده سیگنال قبل از اشباع سیگنال و همچنین یافتن بازه‌های زمانی مناسب برای مشاهده روند افزایشی بتاکاتنین انجام شد. برای این کار آزمایش‌های سینتیک متعدد در بازه‌های زمانی مختلف بین حداقل 30 دقیقه و حداکثر 8 ساعت انجام گرفت. پس از بهینه‌سازی پنجره زمانی، بهینه‌سازی غلظت مناسب محیط تحت تأثیر سلول‌های L Wnt3a با هدف یافتن غلظت بهینه حداقل و حداکثر برای فعال‌سازی مسیر Wntوابسته به بتاکاتنین و افزایش بتاکاتنین به‌عنوان نتیجه مستقیم فعال‌سازی این مسیر در سلول‌های L انجام شد. این آزمایش در غلظت‌های 1:1، 1:2، 1:20،1:10، 1:50 و 1:100 محیط تحت تأثیر Wnt3a انجام شد.

وسترن بلات

تیمار سلول‌ها با توجه‌به شرایط هر آزمایش (غلظت Wnt3a، غلظت پپتید و زمان انکوباسیون) انجام و سپس سلول‌ها در دو مرحله به‌وسیله PBS سرد شسته شد. سپس بافر لیزکننده سرد شامل PBS و 1% Triton X-100 به پلیت‌ها اضافه شد. پس از 10 دقیقه، محتوای هر پلیت به مدت 3 دقیقه در 5000 RPM و دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به محلول رویی شامل محتوای سیتوسولی و هسته سلول به اندازه یک سوم حجم محلول جمع‌آوری شده بافر SDS-page اضافه و محتوای ویال به خوبی پایپت، ورتکس و به مدت 3 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. 20 میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌های ژل تریس/ گلیسین دارای ژل بالا غلظت 4% و ژل پایین غلظت 12% بارگذاری

36. Conditioned medium

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

شد و پروتئین‌های جداشده به غشای انتقال PVDF[37] منتقل شدند و سپس به‌وسیله آنتی‌بادی اولیه موشی بتاکاتنین(بی دی-بایوساینس[38])، آنتی‌بادی اولیه خرگوش p-LRP6 (Cell signalling) و آنتی‌بادی اولیه موشی توبولین[39] (سل سیگنالینگ[40]) بلات شدند. تیمار با آنتی‌بادی دومی انجام گرفت. تمام آنتی‌بادی‌ها ، 1000 برابر رقیق و سپس، مورد استفاده قرار گرفتند. ظاهرسازی نوارها طبق پروتوکل استاندارد انجام شد. نتایج وسترن بلات به‌وسیله نرم افزار ImageJ Fiji کمی‌سازی شد.

تیمار سلول‌ها با پپتید ANP و پپتید کنترل

سلول‌ها با تراکم 10^6 سلول در هر چاهک پلیت 6 خانه کشت شدند. 24 ساعت بعد، سلول‌ها با غلظت 10 میکرومولار ANP یا پپتید کنترل در بازه زمانی 1، 2 و 4 و 6 ساعت تحت تیمار با محیط تحت‌تأثیر سلول‌های L Wnt3a یا L قرار گرفتند. پس از تیمار، نمونه‌ها جمع‌آوری و برای آنالیز وسترن‌بلات آماده شد.

خاموش‌سازی بیان ژن‌های FZD7 و FZD2

سلول‌ها با توجه‌به پنجره زمانی بهینه‌شده 0، 1، 2 ،4 و 6 ساعت در پلیت‌های شش‌خانه کشت داده‌شد. محلول شماره 1 شامل 20 میکرولیتر RNA و 375 میکرولیتر محیط اپتیمم به ازای هر چاهک و محلول شماره 2 شامل 10 میکرولیتر اینترفرین و 100 میکرولیتر محیط اپتیمم آماده‌سازی شد. پس از گذشت 5 دقیقه محلول شماره 1 به محلول شماره 2 اضافه شد. پس از 30 دقیقه، محلول شماره 3 با اضافه کردن 740 میکرولیتر اپتیمم به ازای هر چاهک رقیق شد (محلول شماره 4). درنهایت، مقدار 1 میلی‌لیتر از محلول شماره 4 به هر چاهک اضافه شد. خاموش‌سازی به مدت 2,5 روز انجام گرفت. سپس آزمایش سینتیک مورد نظر طبق پروتوکل قبل بر روی سلول‌های خاموش شده انجام گرفت. درنهایت، نمونه‌ها طبق معمول جمع‌آوری و به وسیله وسترن‌بلات آنالیز شد.

آنالیزهای آماری

برای آنالیزهای آماری از نرم‌افزار اکسل و GraphPad Prism 7 استفاده شد. برای محاسبه p-value، از سطح زیر منحنی هر نمودار[41] استفاده شد. نوار خطا [42] با معیار انحراف از معیار[43] نمایش داده‌شده است.

3. نتایج و بحث

بررسی حفظ‌شدگی باقی‌مانده‌های جایگاه اتصال درگیر در میان‌کنش و استخراج معادل آن روی توالی Wnt3a و FZD7

براساس هم‌ترازی، توالی بین Wnt3 و Wnt3a ، بیشتر باقی‌مانده‌های میان‌کنش‌دهنده روی لیگاند Wnt و گیرنده FZD حفظ‌شده هستند (پیوست.تصویر1). باقی‌مانده‌های میان‌کنش‌دهنده کمپلکس Wnt3-FZD8 که از بلورنگاری اشعه ایکس به دست آمده است[21] و معادل آنها در آنالیز هم‌ترازی، برای Wnt3a و FZD7 در جدول 1 فهرست شده است. باقی‌مانده‌های درگیر در میان‌کنش، شامل اسیدهای آمینه آب‌دوست و آب‌گریز هستند. همانند Wnt3، بخشی از اسیدهای آمینه میان‌کنش‌دهنده Wnt3a روی ناحیه انتهای آمینو(NTD) و بخش دیگر، روی دمین انتهای کربوکسیل (CTD) پیش‌بینی می‌شوند. به نظر می‌رسد همان الگوی میان‌کنشی در کمپلکس Wnt3-FZD8 ، در کمپلکس Wnt3a-FZD7 نیز حفظ شده است. با توجه به حفظ‌شدگی جایگاه اتصال بین Wnt و FZD، انتظار می‌رود الگو و معماری میان‌کنش بین جفت‌های لیگاند-گیرنده Wnt-FZDحفظ شده باشد [2].

37. Polyvinylidene difluoride
38. BD bioscience
39. Tubulin
40. Cell signaling
41. Area under the curve
42. Error bar
43. Standard deviation

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

جدول1- اسیدهای آمینه میان‌کنش‌دهنده کمپلکس Wnt3-FZD8 و باقی‌مانده‌های معادل آنها در کمپلکس Wnt3a-FZD7. باقی‌مانده‌های میان‌کنش‌دهنده Wnt3 و شریک میان‌کنش‌دهنده آن روی گیرنده FZD8 استخراج شده از PDB کمپلکس Wnt3-FZD8 و معادل این اسیدهای آمینه روی توالی Wnt3a و FZD7 در جدول زیر فهرست شده‌اند. اسیدهای آمینه نوشته شده به رنگ قرمز حفظ شده می‌باشند.

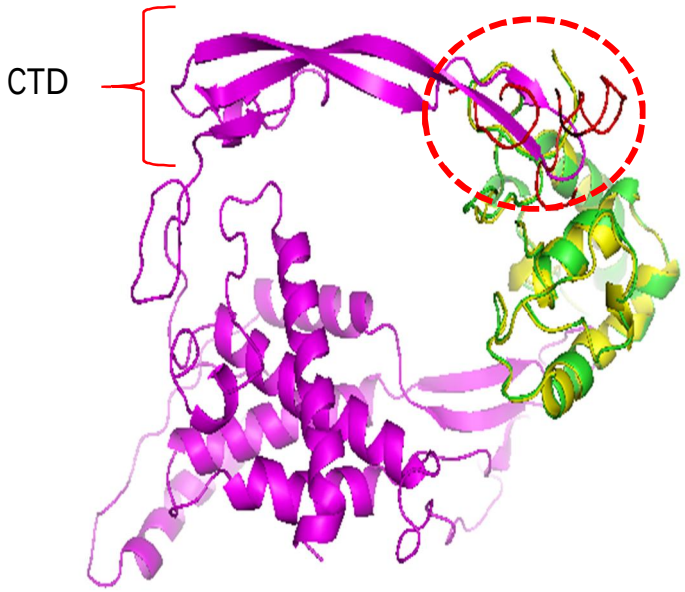
اسیدهای آمینه میان‌کنش دهنده در کمپلکس Wnt3-FZD8			اسیدهای آمینه میان‌کنش دهنده Wnt3a-FZD7 احتمالی در کمپلکس		
	Wnt3	FZD8		hWnt3a	hFZD7
اسیدهای آمینه درگیر میان‌کنش دمین انتهای آمینو Wnt3 و FZD8	C208 L211 S212 G213	E64 E68 Q71 F72 R132	اسیدهای آمینه محتمل درگیر میان‌کنش دمین انتهای آمینو مولکول Wnt3a	C205 L208 S209 S210	D48 E52 Q55 F56 R115
اسیدهای آمینه درگیر میان‌کنش دمین انتهای کربوکسیل مولکول Wnt3	C332 F334 W336 C338 V340 C342	F86 I95 Y100 L147 C148 M149 D150 Y151	اسیدهای آمینه محتمل درگیر میان‌کنش دمین انتهای کربوکسیل مولکول Wnt3a	C329 F331 W333 C335 V337 C339	F70 V79 L83 I120 C130 V131 G132 Q133

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

بررسی جایگاه اتصال پروتئین Wnt3a و پپتید ANP روی گیرنده FZD7

تصویر1 انطباق ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و کمپلکس Wnt3a-FZD7 به دست آمده از شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی را نشان می‌دهد.(جدول 1). همان‌طور که در تصویر 1 مشاهده می‌شود، جایگاه اتصال ANP با محل اتصال دمین انتهای کربوکسیلWnt3a روی گیرنده FZD7 دارای همپوشانی فضایی است.



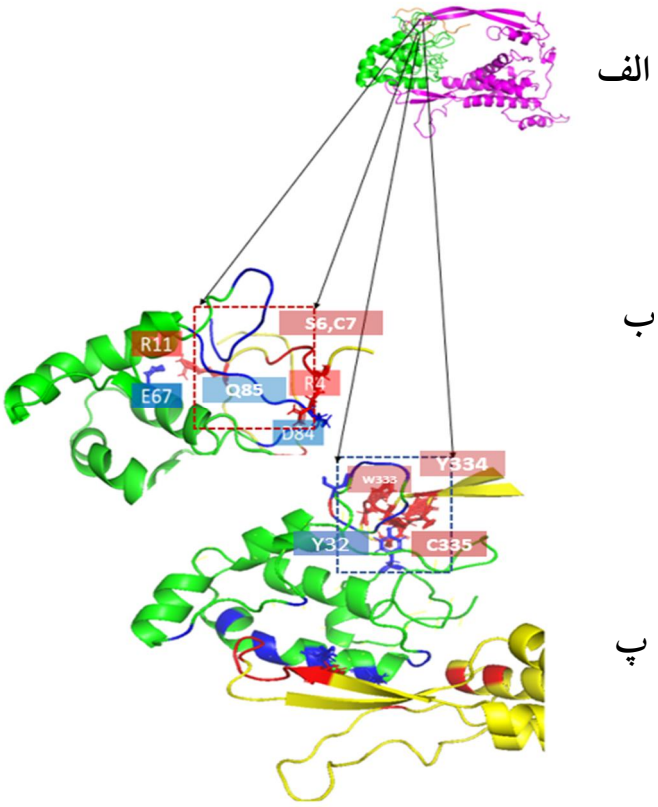
شکل 1- ویژگی‌یابی محل اتصال ANP و دمین انتهای کربوکسیل(CTD) لیگاند Wnt3a روی گیرنده FZD7. انطباق ساختار کمپلکس ANP-FZD7 بر ساختار کمپلکس Wnt3a-FZD7 به دست آمده از شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی داکینگ. همان‌طور که در دایره قرمزرنگ نقطه‌چین مشاهده می‌شود، محل اتصال ANP و Wnt3a-CTD بر روی FZD7 دارای هم‌پوشانی است. Wnt3a به رنگ بنفش، FZD7 به رنگ سبز و ANP به رنگ قرمز نمایش داده شده است.

حفظ ثبات این همپوشانی فضایی در جایگاه اتصال، پس از فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برروی کمپلکس‌ها، پایداری کلی کمپلکس و همچنین، جایگاه لیگاند روی Wnt3a و ANP را بر روی گیرنده FZD7 نشان می‌دهد (تصویر2). از طرف دیگر، مقایسه نتایج حاصل از آنالیز تغییرات سطح در دسترس حلال، اشتراک باقی‌مانده‌های ناحیه میانی(87-81) و باقی‌مانده‌های ناحیه انتهایی(137-124) برروی ساختار گیرنده FZD7، بین دو کمپلکس ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7 نشان می‌دهد (شکل2).

ماهیت میان‌کنش‌ها در کمپلکس Wnt3a-FZD7، هم در اتصال دمین انتهای آمینو و هم در اتصال دمین انتهای کربوکسیل مولکول Wnt3a به گیرنده FZD7، شامل پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های واندروالس است. این در حالی است که علاوه بر این میان‌کنش‌ها، پل‌های نمکی نیز در اتصال ANP و FZD7 دارای اهمیت می‌باشند (شکل 3.).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]



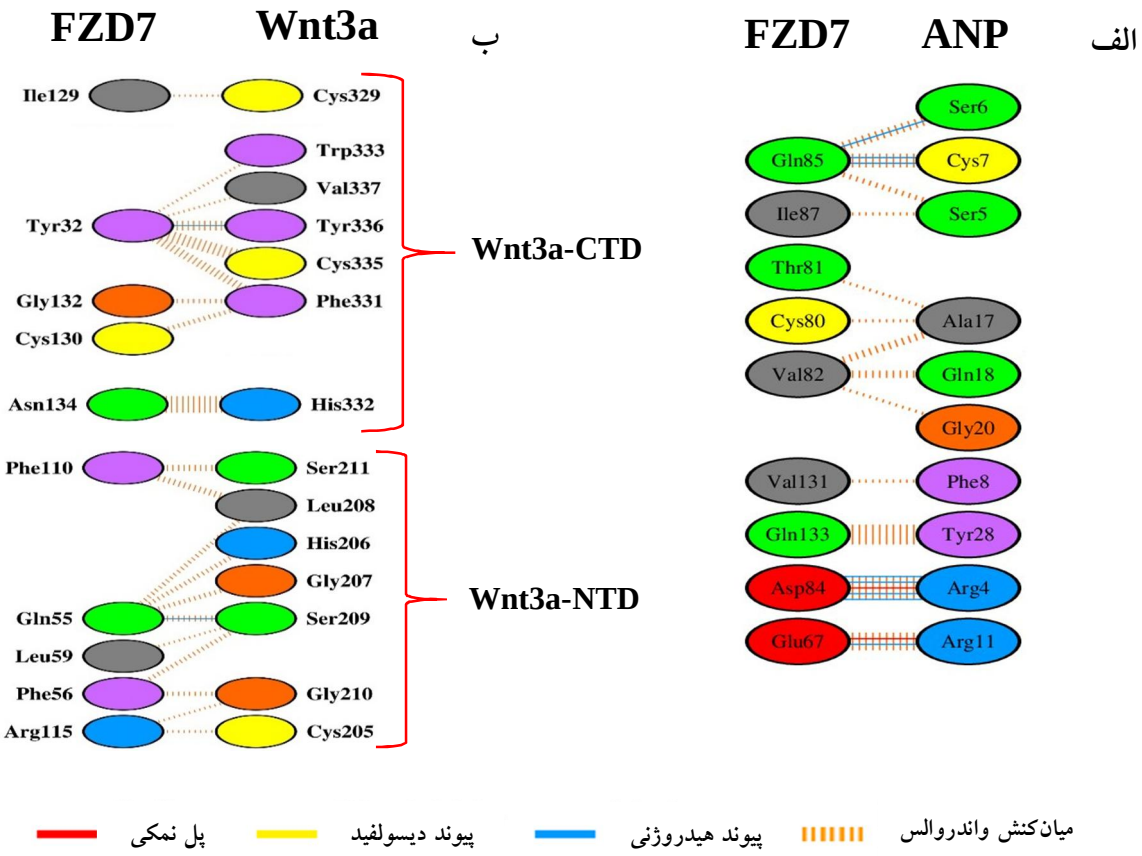
شکل 2- آنالیز جایگاه اتصال ANP و Wnt3a روی گیرنده FZD7. الف-انطباق ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و کمپلکس Wnt3a-FZD7 بعد از شبیه‌سازی. جایگاه اتصال ANP و دمین انتهای کربوکسیل Wnt3a دارای همپوشانی است، ب- نمای نزدیک پپتید ANP که با گیرنده FZD7 کمپلکس تشکیل داده است، پ- نمای نزدیک دمین انتهای کربوکسیل پروتئین Wnt3a که با گیرنده FZD7، کمپلکس تشکیل داده است. (گیرنده به رنگ سبز، لیگاند به رنگ زرد، اسیدهای آمینه میان‌کنش‌دهنده از لیگاند به رنگ قرمز و اسیدهای آمینه میان‌کنش‌دهنده از گیرنده به رنگ آبی نمایش داده شده‌اند.)

در واقع، ANP با ایجاد ممانعت فضایی و همچنین، اختلال در شبکه میان‌کنش‌های واندروالس و هیدروژنی بین دمین انتهای کربوکسیل Wnt3a و گیرنده FZD7 می‌تواند با Wnt3a برای اتصال به FZD7 رقابت و از قرارگیری صحیح این لیگاند روی FZD7 ممانعت می‌کند. با توجه به اهمیت جهت‌گیری صحیح مولکول Wnt روی گیرنده FZD و اهمیت آن در انتقال پیام [1] و از طرف دیگر، وجود شواهد آزمایشگاهی مبتنی بر ناتوانی فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt وابسته به بتاکاتنین توسط زیر- دمین[44]های جداشده مولکول Wnt [22]، می‌توان اختلال ایجاد شده در میان‌کنش لیگاند و گیرنده در سطح ساختار و در بالا دست مسیر را منجر به اختلال درفعالیت آن و تأثیر آن در پایین دست دانست.

44. Sub-domain

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]



شکل 3- آنالیز جایگاه میان‌کنش پس از شبیه‌سازی. الف- آنالیز انواع میان‌کنش در کمپلکس ANP-FZD7. میان‌کنش‌ها، انواع هیدروژنی، یونی و واندروالس را شامل می‌شوند، ب- آنالیز انواع میان‌کنش در کمپلکس Wnt3a-FZD7. میان‌کنش‌ها شامل پیوند هیدروژنی و واندروالس می‌باشد.

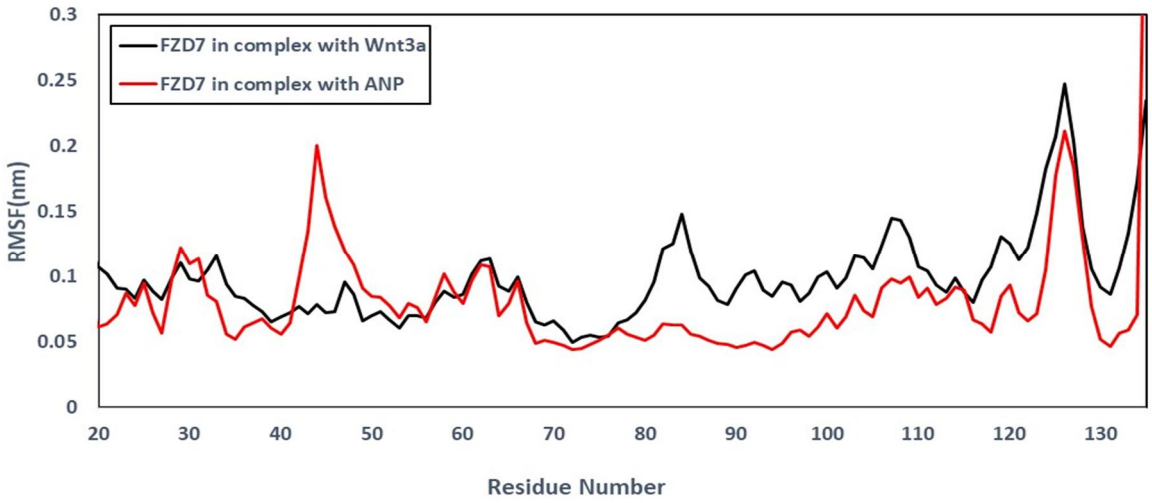
آنالیز دینامیک ساختاری گیرنده FZD7 در در ساختار کمپلکس‌های ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7

نوسانات ساختاری گیرنده FZD7، در میان‌کنش با فعال‌کننده Wnt3a و مهارکننده ANP در سطح تک اسید آمینه بررسی و مقایسه شد. مقدار میانگین معیار RMSF برای FZD7 هنگام میان‌کنش با ANP 0/08 نانومتر و هنگام میان‌کنش با Wnt3a 0/1 نانومتر می‌باشد، و این به‌این معناست که فعال‌کننده Wnt3a در مجموع، نوسانات و دینامیک ساختاری بیشتری را در مقایسه با مهارکننده ANP در FZD7 القا می‌کند. در شکل 4 الف ـ مشاهده می‌شود که ناحیه اطراف 135-124 که طبق آنالیز تغییرات سطح در دسترس و میان‌کنش (شکل 3)، بین ناحیه انتهای کربوکسیل لیگاند Wnt3a و پپتید ANP برای اتصال به FZD7 مشترک است دارای الگو نوسان مشابهی است (شکل 4). اسیدهای آمینه درگیر در میان‌کنش این ناحیه، تعداد زیادی میان‌کنش واندروالس تشکیل می‌دهند. شباهت در الگو RMSF، تا حدود اسیدآمینه 95 قابل مشاهده است. این در حالی است که با وجود تغییرات سطح در دسترس برای برخی اسیدهای آمینه مشابه در ناحیه 80 تا 90 FZD7 در هر دو کمپلکس، الگو RMSF متفاوت و نشان‌دهنده پیک 0/15 نانومتر برای آسپارتات 84 گیرنده FZD7 در ساختار کمپلکس Wnt3a-FZD7 می‌باشد، درحالی‌که میان‌کنش‌های هیدروژنی، یونی و واندروالس بین باقی‌مانده‌های ANP و گیرنده FZD7 منجر به کاهش قابل ملاحظه نوسانات ساختاری FZD7 در این ناحیه شده است

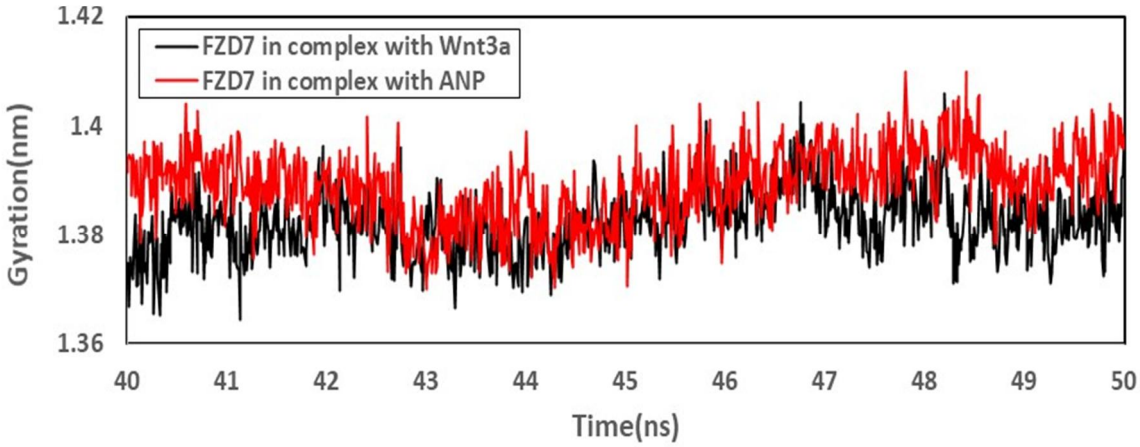
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

(شکل 3 و 4). از طرف دیگر، نوسانات ساختاری ناحیه 50-20 گیرنده FZD7 نیز در هر کدام از کمپلکس‌ها دارای الگو متفاوتی است. فشردگی ساختار گیرنده FZD7 در میان‌کنش با ANP و میان‌کنش با Wnt3a، به وسیله معیار شعاع ژیراسیون مقایسه شد. مشاهده می‌شود که به‌طور کلی، فشردگی ساختار FZD7 در طی 10 نانوثانیه انتهایی شبیه‌سازی در میان‌کنش با Wnt3a بیشتر از زمانی است که این گیرنده با ANP میان‌کنش می‌دهد(شکل 5). در واقع به نظر می‌رسد فشردگی کل ساختار FZD7 می‌تواند با توجه به لیگاند متصل شونده به آن دچار تغییر شود. در مجموع، این تفاوت‌ها می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت الگو دینامیک القا شده در ساختار گیرنده FZD7 از طریق میان‌کنش با فعال‌کننده Wnt3a و یا مهارکننده ANP باشد و بر پایین‌دست مسیر پیام‌رسانی Wnt وابسته به بتاکاتنین تأثیر متفاوت بگذارد.



شکل 4 ـ RMSF باقی‌مانده‌های گیرنده FZD7 در ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7 در دمای 310K. نمودار گیرنده FZD7 در کمپلکس با ANP به رنگ قرمز و نمودار این گیرنده در کمپلکس با Wnt3a به رنگ سیاه نمایش داده شده است.



شکل 5 ـ تغییرات شعاع ژیراسیون در گیرنده FZD7 در ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7. نمودار گیرنده FZD7 در کمپلکس با ANP به رنگ قرمز و نمودار این گیرنده در کمپلکس با Wnt3a به رنگ سیاه نمایش داده شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

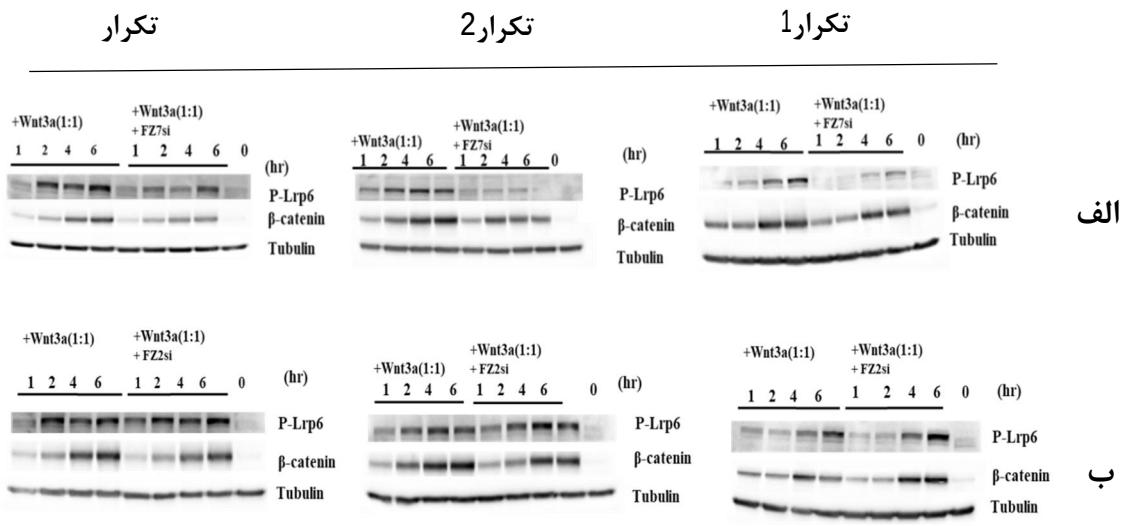
بررسی وابستگی مسیر پیام‌رسانی Wnt وابسته به بتاکاتنین در سلول‌های L به گیرنده FZD7

مطالعات قبلی، توانایی پپتید ANP برای کاهش فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین را از طریق فرایندی وابسته به FZD در سلول‌های سرطانی گزارش شده است اما پتانسیل این پپتید برای مهار این مسیر از طریق یک عضو خاص خانواده پروتئین FZD ارائه نمی‌کند. مطالعات محاسباتی ما پتانسیل اتصال ANP برای اتصال به FZD7 به‌عنوان یک گیرنده دارای اهمیت در سرطان‌های دارای فعالیت نا به جا در مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین و همچنین، قابلیت رقابت آن با لیگاند Wnt3a و همپوشانی جایگاه اتصال آن با Wnt3a بر روی FZD7 را نشان می‌دهد. از آن جا که فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین در سلول‌های L قابل ردیابی مستقیم از طریق بازخوانش مقدار بتاکاتنین سلول است، ما در ابتدا به وابستگی مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین در این سلول‌ها به گیرنده FZD7 به شکل آزمایشگاهی پرداختیم.

همان‌طور که در شکل 3 مشخص است با خاموش‌سازی ژن FZD7 مسیر پیام‌رسانی Wnt وابسته به بتاکاتنین در سلول‌های L به شدت تحت تأثیر قرار گرفته است. در واقع حاصل مستقیم فعالیت این مسیر در سلول‌های L افزایش محتوای بتاکاتنین سلول است و همانطور که نتایج حاصل از وسترن بلات 3 تکرار مستقل در سلول‌هایی که در آنها FZD7 خاموش شده است، نشان می دهد. مقدار بتاکاتنین تجمع یافته در سلول در مقایسه با کنترل به شدت کم شده است. این در حالی است که آزمایش کنترل که خاموش‌سازی ژن FZD2 را در سلول‌های L و در 3 تکرار مستقل نشان می‌دهد، حاکی از این است که مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین در سلول‌های L تحت تأثیر شدید گیرنده FZD2 نیست. بنابراین سلول‌های L به‌عنوان مدل مناسبی برای بررسی تأثیر پپتید ANP بر مسیر Wnt از طریق گیرنده FZD7 مطرح می‌شوند.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]



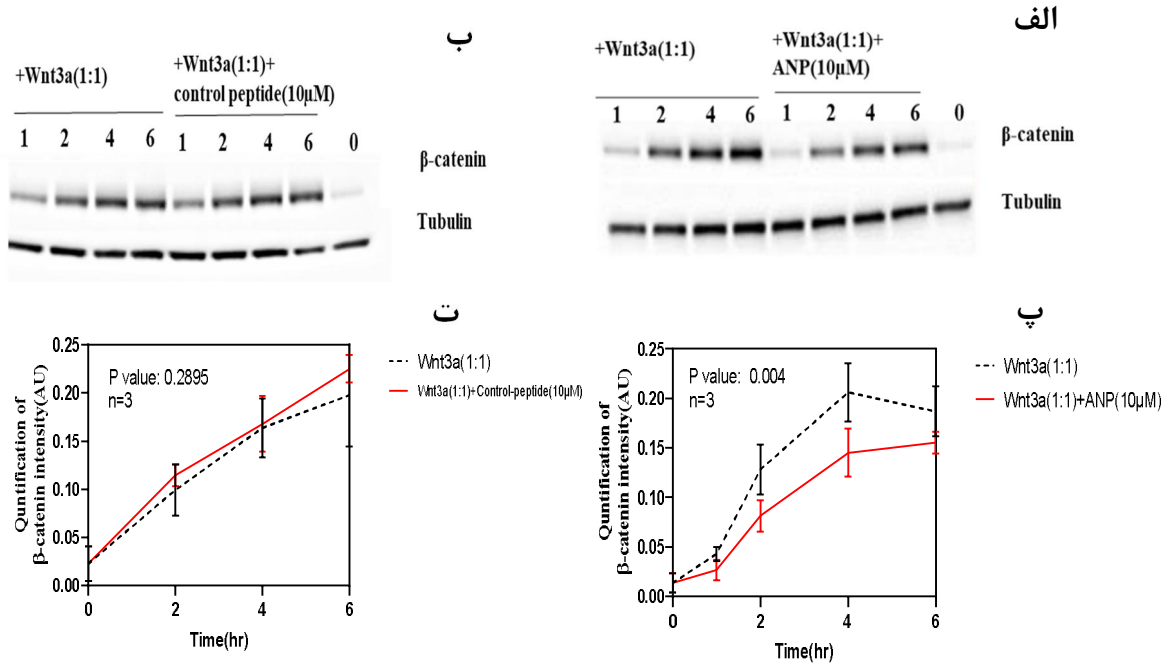
شکل 6- نتایج تأثیر خاموش‌سازی ژن گیرنده‌های سطح سلولی بر فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده فرایند خاموش‌سازی برای بتاکاتنین، p-LRP6 و توبولین بلات شدند. شکل الف نتیجه بلاتینگ را برای خاموشی ژن FZD7 نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل مشخص است در هر سه تکرار از آزمایش، مقدار بتاکاتنین و همچنین p-LRP6 در اثر خاموش‌سازی کاهش پیدا کرده است. شکل ب ـ نتیجه بلاتینگ را برای خاموشی ژن FZD2 نشان می‌دهد. در هر سه تکرار از آزمایش، مقدار بتاکاتنین و همچنین p-LRP6 در اثر خاموش‌سازی نسبت به کنترل دچار تغییرات شدید نشده است.

بررسی تأثیر مهاری ANP روی مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین

آزمایش‌های متفاوت نشان داد بهترین بازه زمانی برای بررسی سنتیک مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین، پنجره زمانی 0 تا 6 ساعت و با بازه‌های زمانی 0، 1، 2، 4 و 6 ساعت می‌باشد. همچنین نسبت 1:1 محیط حاوی Wnt و محیط فاقد Wnt به‌عنوان غلظت بهینه انتخاب شد. همان‌طور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از وسترن بلات، نشان دهنده کاهش مقدار بتاکاتنین در سلول‌های تحت تأثیر Wnt3a تیمار شده با ANP (شکل 7. الف) در مقایسه با شرایط کنترل (تصویر 7. ب) می‌باشد. نتایج کمی‌سازی بلات حاصل از 3 بار تکرار مستقل هر آزمایش نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار پپتید ANP در مقایسه با پپتید کنترل بر روی مهار مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین در این سیستم می‌باشد (شکل 7 پ، شکل 7. ت). داده‌های حاصل از مطالعات محاسباتی ما شامل آنالیز جایگاه اتصال و دینامیک گیرنده FZD7، میان‌کنش مستقیم پپتید ANP با گیرنده FZD7 و رقابت آن با پروتئین Wnt3a را تأیید می‌کند. از طرف دیگر، مطالعات خاموش‌سازی ژن و بازخوانش تغییرات سینتیک مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین در سلول‌هایی که گیرنده FZD7 در آنها خاموش شده است، نشان‌دهنده وابستگی مسیر Wnt- بتاکاتنین به FZD7 در سلول‌های L است (شکل 6). مجموع این شواهد تأییدکننده مهار مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین، در سلول‌های L، در اثر میان‌کنش مستقیم پپتید ANP و گیرنده FZD7 می‌باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]



شکل 7 - مقایسه تأثیر مهاری پپتید ANP و پپتید کنترل آن بر سلول‌های تیمارشده Wnt. شکل الف ـ تصویر بلات نماینده از پروتئین‌های بتاکاتنین و توبولین را در غلظت بهینه Wnt3a در حضور و عدم‌حضور پپتید ANP نشان می‌دهد، شکل ب ـ نشان‌دهنده همین محتوا در غلظت بهینه Wnt3a و پپتید کنترل می‌باشد. همان‌طور که از شکل مشخص است بارگذاری پروتئین در هر چاهک برابر است و روند کاهشی برای بتاکاتنین در شکل ب مشاهده نمی‌شود. شکل پ ـ نمودار میانگین به دست آمده از سه تکرار مستقل را برای سلول‌های تیمار شده با پپتید ANP . p-value مقداری معنی‌دار است. شکل ت ـ نمودار میانگین حاصل از سه تکرار مستقل برای سلول‌های تحریک‌شده با Wnt3a تیمارشده با پپتید کنترل. در این شرایط تفاوت معنی‌داری بین محتوای بتاکاتنین سلول‌های تیمار شده با پپتید کنترل و تیمار نشده وجود ندارد و P value معنی‌دار نیست.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

4. نتیجه‌گیری

مهار میان‌کنش لیگاند و گیرنده می‌تواند به عنوان یک استراژی هدفمند برای مهار جلوگیری از فعالیت مسیر Wnt- بتاکاتنین که کاملاً وابسته به میان‌کنش اولیه بین لیگاند Wnt و گیرنده FZD7 است، استفاده شود. طبق مطالعات گذشته، پپتید ANP قادر است فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین را تحت تأثیر قرار دهد و یکی از مکانیسم‌های محتمل برای خاصیت ضدسرطانی این پپتید، مهار این مسیر از طریق میان‌کنش مستقیم یا غیرمستقیم این پپتید با گیرنده FZD معرفی شده است، اما مکانیسم مولکولی این فرایند مشخص نیست [20]. از طرف دیگر، پتانسیل و اهمیت اعضای متفاوت خانواده FZD در سرطان‌های وابسته‌به مسیر Wnt یکسان نیست و FZD7 به‌عنوان یک پاشنه آشیل در بحث درمان این سرطان‌ها مطرح است [12]. مطالعات محاسباتی ما نشان می‌دهد پپتید ANP این قابلیت را دارد تا با لیگاند Wnt3a برای اتصال به گیرنده FZD7 رقابت کند [23]. در واقع جایگاه اتصال این پپتید با جایگاه اتصال دمین انتهای کربوکیسل پروتئین Wnt3a برای اتصال به FZD7 همپوشانی دارد. از طرف دیگر، بررسی دینامیک ساختار با پارامترهایی چون شعاع ژیراسیون و RMSF نشان می‌دهد الگو دینامیک القا شده به گیرنده، در زمان میان‌کنش با مهارکننده ANP و فعال‌کننده Wnt3a دارای تفاوت است. نتایج آزمایش‌های خاموش‌سازی بیان ژن گیرنده FZD7 در سلول‌های L نشان می‌دهد مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین در این سلول‌ها به FZD7 وابسته است و بنابراین این سلول‌ها می‌توانند به‌عنوان مدلی مناسب برای مطالعه تأثیر مولکول‌های مهاری میان‌کنش دهنده با FZD7 بر سینتیک مسیر Wnt مطرح شود. همچنین، تیمار سلول‌های L تحریک‌شده با Wnt به‌وسیله پپتید ANP نشان می‌دهد این پپتید می‌تواند با Wnt رقابت و روی فعالیت آن تأثیر مهاری داشته باشد. این در حالی است که برای پپتید کنترل چنین نتایجی حاصل نشد. با توجه به این شواهد و همچنین استناد به مطالعات گذشته، نتیجه می‌گیریم این پپتید فعالیت مهاری خود را بر مسیر Wnt وابسته‌به بتاکاتنین، به‌واسطه میان‌کنش مستقیم با گیرنده FZD7 انجام می‌دهد. درنهایت، ANP می‌تواند به‌عنوان یک داربست مناسب برای طراحی پپتیدهایی با قابلیت اتصال بالا و همچنین اختصاصی برای اتصال به FZD7 و هدف‌گیری مسیر Wnt-بتاکاتنین مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران انجام شده است . همچنین، بخش آزمایشگاهی این تحقیق، با همراهی گروه تحقیقاتی prof. Gisou van der Goot، انستیتو Global Health Science، دانشگاه École Polytechnique Fédérale de Lausanne ، کشور سوییس انجام شده است.

منابع

1. Helikar, T., et al., *Emergent decision-making in biological signal transduction networks.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(6): p. 1913-1918.

2. Janda, C.Y., et al., *Structural basis of Wnt recognition by Frizzled.* Science, 201 .۲ :(٦٠٩٠)٣٣٧p. 59-64.

3. Sever, R. and J.S. Brugge, *Signal transduction in cancer.* Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015. **5**(4): p. a006098.

4. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/β-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.* Developmental cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.

5. Sonderegger, S., J. Pollheimer, and M. Knöfler, *Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation–review.* Placenta, 2010. **31**(10): p. 839-847.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

6. Lybrand, D.B., et al., *Destruction complex dynamics: Wnt/β-catenin signaling alters Axin-GSK3β interactions in vivo.* Development, 2019. **146**(13): p. dev164145.

7. Taciak, B., et al., *Wnt signaling pathway in development and cancer*. J Physiol Pharmacol, 2018. **69**.(۱۰,۲٦٤۰۲)

8. Jung, Y.-S. and J.-I. Park, *Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β-catenin and the destruction complex.* Experimental & Molecular Medicine, 2020: p. 1-9.

9. Liu, C.-C., et al., *LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(11): p. 5136-5141.

10. Yang, L., et al., *FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer.* Oncogene, 2011. **30**(43): p. 4437-4446.

11. Steinhart, Z. and S. Angers, *Wnt signaling in development and tissue homeostasis.* Development, 2018. **145**(11): p. dev146589.

12. King, T.D., et al., *Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy.* Cellular signalling, 2012. **24**(4): p. 846-851.

13. Fernandez, A., et al., *The WNT receptor FZD7 is required for maintenance of the pluripotent state in human embryonic stem cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(4): p. 1409-1414.

14. Merle, P., et al., *Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma.* Gastroenterology, 2004. **127**(4): p. 1110-1122.

15. Phesse, T., D. Flanagan, and E. Vincan, *Frizzled7: a promising Achilles' heel for targeting the Wnt receptor complex to treat cancer.* Cancers, 2016. **8**(5): p. 50.

16. Gurney, A., et al., *Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(29): p. 11717-11722.

17. Nile, A.H., et al., *A selective peptide inhibitor of Frizzled 7 receptors disrupts intestinal stem cells.* Nature chemical biology, 2018. **14**(6): p. 582.

18. Song, W., H. Wang, and Q. Wu, *Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA).* Gene, 2015. **569**(1): p. 1-6.

19. Kong, X., et al., *Natriuretic peptide receptor a as a novel anticancer target.* Cancer research, 2008. **68**(1): p. 249- 256.

20. Serafino, A., et al., *Anti-proliferative effect of atrial natriuretic peptide on colorectal cancer cells: Evidence for an Akt-mediated cross-talk between NHE-1 activity and Wnt/β-catenin signaling.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2012. **1822**(6): p. 1004-1018.

21. Hirai, H., et al., *Crystal structure of a mammalian Wnt–Frizzled complex.* Nature structural & molecular biology, 2019. **26**(5): p. 372-379.

22. Kumar, S., et al., Molecular dissection of Wnt3a-Frizzled8 interaction reveals essential and modulatory determinants of Wnt signaling activity. BMC biology, 2014. 12 :(۱)p. 44.

23 Dehghanbanadaki, N., M. Taghdir, and H. Naderi-Manesh, Investigation of Atrial Natriuretic Peptide as A Competitive Inhibitory Candidate Against Wnt/β-Catenin Signalling: A Molecular Dynamics Approach. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021. 27(1): p. 353-363.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Investigation of ANP peptide inhibitory potential for targeting Wnt-βcatenin signalling through FZD7

Najmeh Dehghanbanadaki[1], Majid Taghdir [*2], Reza Hasan Sajedi[3] , Hossein Naderi-Manesh[4]

1-PHD, Department of Biophysics, Faculty of biological science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of biological science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
3- Associated Professor, Department of Biochemistry, Faculty of biological science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
4- Full Professor, Department of Biophysics, Faculty of biological science, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

*Corresponding Author : Taghdir@modares.ac.ir,
Tel: +982182884701, Fax: +9821 8288 4718, Postal Code: 14115-175

Received: 2020/5/15 Accepted: 2020/12/30

Abstract:
FZD7 receptor is considered as an emerging target for treatment of Wnt-βcatenin related cancers. This transmembrane receptor is overexpressed in many cancer types like breast cancer and ovarian carcinoma, and so selective targeting of this receptor has a great therapeutic capacity. On the other hand, one of the mechanisms proposed for the anticancer effect of Atrial natriuretic peptide (ANP) that known as a heart hormone at first, is Wnt-βcatenin inhibition through an FZD dependent manner but, the molecular mechanism of this inhibition is not clear. Here, using computational methods including molecular docking and molecular dynamics simulation, also designing a cellular system that enabled us to trace Wnt-βcatenin kinetics directly, we investigated the mechanism of the peptide inhibitory potential against the pathway. Our computational results show that ANP can directly interact with FZD7 and also, its binding site on FZD7 overlap to the binding region of the Wnt carboxyl-terminal domain (Wnt-CTD). The finding of the silencing experiments demonstrates the dependency of Wnt-βcatenin signalling of the cellular system to FZD7. The decrease of βcatenin in cells treated to ANP and Wnt is also significant to compare to the control experiments. Finally, our results show that ANP is a potential scaffold to design selective peptide against FZD7.

Keywords: Frizzled7 receptor, Atrial natriuretic peptide, Wnt signal transduction

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.5.5]