

بررسی پتانسیل مهاري پپتيد ANP برای هدف‌گیری مسیر Wnt- β catenin از طریق گیرنده FZD7

نجمه دهقان بنادکی¹، مجید تقدیر^{2*}، رضا حسن ساجدی³، حسین نادری‌منش⁴

- 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

پذیرش: 1399/10/10

دریافت: 1399/2/26

چکیده:

گیرنده فریزلد 7 (FZD7) به‌عنوان هدفی نوظهور برای درمان سرطان‌هایی است که در آنها مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین 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 وابسته به بتاکاتین از طریق فرایندی وابسته به 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 سیتیک مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین، 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 دمنین انتهای کربوکسیل لیگاند Wnt (Wnt-CTD) دارای همپوشانی است. یافته‌های مطالعات خاموش‌سازی ژن، وابستگی فعالیت مسیر Wnt-بتاکاتین را در سیستم سلولی به گیرنده FZD7 تأیید می‌کند. از طرف دیگر، کاهش محتوای بتاکاتین و در واقع فعالیت مسیر Wnt-بتاکاتین در سلول‌های تیمار شده با Wnt و ANP در مقایسه با کنترل معنی‌دار است. در نهایت، 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

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 پیام¹ اعمال کنند [1, 2]. تومورزایی²، می‌تواند به‌عنوان اختلال عملکرد این شبکه‌های انتقال پیام³ پیچیده که ارتباطات مولکولی و فرایندهای سلولی را تنظیم می‌کنند، تفسیر شود [3]. در بین انواع مسیرهای انتقال پیام، پیام‌رسانی Wnt وابسته به بتاکاتنین، دارای اهمیت بسیاری است. پیام‌رسانی Wnt وابسته به 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]. نقش کلیدی در تنظیم مسیر Wnt وابسته به بتاکاتنین، بر عهده کمپلکس تخریب⁴ است [6]. این کمپلکس، از پروتئین ساختاری اکسین⁵ به‌عنوان مرکز و چهار جزء مهم دیگر شامل APC⁶، CKI⁷، GSK3 β ⁸ و بتاکاتنین تشکیل شده‌است. جهش در اجزای تشکیل‌دهنده کمپلکس تخریب منجر به سرطان می‌شود [7, 8]. بیان بالای گیرنده‌های سطحی مسیر شامل LRP6⁹ و فریزلد¹⁰ (FZD) نیز در سرطان پستان منفی سه‌گانه¹¹ گزارش شده است [9, 10]. پس از تشکیل کمپلکس سه‌گانه بین لیگاند Wnt و گیرنده‌های FZD و LRP6، پروتئین

سیتوپلاسمی Div¹² به‌استخدام غشا درمی‌آید. همچنین، کیناز GSK3 β 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-TCF¹³) /فاکتور بهبوددهنده لنفوئید(LEF¹⁴) 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 غشا¹⁵، FZD است. از آن‌جا که این گیرنده در سطح سلول بیان می‌شود و دارای الگوهای بیانی توموری-جنینی¹⁶ 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 3 β
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

2. مواد و روش‌ها

مدل‌سازی پروتئين

ساختار 28 اسیدآمینة‌ای پپتيد ANP، با استفاده از ساختار بلورنگاری باقیمانده‌های 6 تا 26 این پپتيد در کمپلکس با گیرنده نوع C آن (PDB ID: 1YK0) جداسازی و اسیدهای آمینه حذف‌شده ابتدایی و انتهایی پپتيد، با استفاده از برنامه Modeller 9.17 بازسازی شد. برای مدل‌سازی Wnt3a انسانی، توالی اسیدآمینة‌ای از پایگاه‌داده Uniport با شناسه اختصاصی P56704 به دست آمد. موتور جست‌و‌جوی بلاست²²، ساختار بلورنگاری (PDB ID: Wnt3) (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 توالی²³

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 کلاسپرو 2,0²⁴ و سرور هداک 2,02²⁵ انجام شد. با استفاده از سرور کلاسپرو 2,0 فرایندی شبیه‌سازی بدون پیش‌فرض با هدف بررسی چگونگی میان‌کنش پپتيد

OMP18-R5 می‌تواند این گیرنده را هدف قرار دهد [16]. همچنین، به‌تازگی پپتيدی طراحی شده که می‌تواند با القای تغییر بنای فضایی در زمین 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 پروتئين‌های خانواده FZD، پپتيد نیتريورتیک دهلیزی¹⁸ (ANP) دارای اهمیت ویژه است. این پپتيد که به خانواده هورمون‌های قلبی تعلق دارد با تأثیر بر تنظیم فشار و حجم خون، هموستازی¹⁹ محیط قلبی-عروقی را تنظیم می‌کند [18]. همچنین، این پپتيد، تکثیر سلول‌های سرطانی با منشأ متفاوت را مهار می‌کند [19]. بر اساس یک فرضیه، پپتيد ANP، تأثیر مهاري خود را از طریق میان‌کنش مستقیم یا غیرمستقیم با گیرنده FZD انجام می‌دهد، هرچند مکانیسم دقیق مولکولی این فرایند مشخص نیست. در واقع، سرافینو²⁰ و همکاران، مکان‌یابی مشترک پپتيد ANP و گیرنده FZD7 را، 30 دقیقه پس از تیمار سلول‌های سرطانی با پپتيد ANP، در سطح سلول و با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسانس مشاهده کردند اما جزئیات و نحوه میان‌کنش پپتيد 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 پپتيد ANP، برای میان‌کنش مستقیم با گیرنده FZD7 را، با توجه به اهمیت این گیرنده در انواع سرطان‌های انسانی بررسی و از طرف دیگر، قابلیت پپتيد ANP برای رقابت با لیگاند Wnt3a برای اتصال به FZD7 و تأثیر مستقیم آن بر سینتیک مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین مورد بررسی قرار دهیم.

22. Blast search engine

23. Pairwise sequence alignment

24. ClusPro2.0

25. Haddock 2.02

18. Atrial natriuretic peptide

19. Homeostasis

20. Serafino

21. Co-localization

شدیدترین کاهش²⁹ برای حداقل سازی انرژی³⁰ به تعداد 5000 مرحله انجام شد. سپس سیستم به مدت 100 نانوثانیه تحت تعادل رسانی در حجم ثابت قرار گرفت تا دما روی 310 درجه کلون تنظیم شود. به عنوان حمام خارجی، از ترموستات برندنسن³¹ استفاده شد. برای تنظیم فشار روی اتمسفر، خروجی این مرحله وارد فاز تعادل رسانی¹⁰⁰ نانوثانیه دوم شد. در این مرحله از الگوریتم پارانیلو-رحمان³² به عنوان جفت کننده فشار³³ استفاده شد. شرایط مرحله تولید شبیه سازی دقیقاً یکسان با مرحله تعادل رسانی فشار انجام شد. آنالیز نتایج با استفاده از بسته ابزار استاندارد GROMACS روی 10 نانوثانیه انتهایی شبیه سازی انجام شد. مجسم سازی³⁴ ساختارها با استفاده از برنامه های PyMOL و Swiss PDB viewer انجام شد. آنالیز میان کنشها 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
SLRRSSCFGGRMDRIGASGLGCNSFRY
توالی پپتید کنترل
GGSLRSCYSRLRMSISGAFRDGCRFNGQ
توسط نماینده هلندی شرکت ژن-اسکرپیت³⁵ 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

ANP با گیرنده FZD7 انجام شد. ساختار بلورنگاری FZD7 (PDB ID: 5T44) به عنوان گیرنده و ساختار نماینده کلاستر با بیشترین فراوانی به دست آمده از شبیه سازی دینامیک مولکولی پپتید ANP به عنوان لیگاند، استفاده شد. در نهایت، 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 حفظ شدگی توالی به دست آمده از ساختار بلورنگاری کمپلکس Wnt3 انسانی و FZD8 موشی استفاده شد. باقی مانده های احتمالی میان کنش دهنده بین Wnt3a و FZD7 بر اساس هم ترازی توالی ها انتخاب شدند و به عنوان باقی مانده فعال²⁶ وارد برنامه هداک 2,02 شدند. باقی مانده هایی که در توالی پروتئین، اطراف باقی مانده های فعال قرار داشتند، به عنوان باقی مانده منفعل²⁷، به عنوان ورودی برنامه استفاده شد. بهترین کمپلکسها بر اساس امتیاز به دست آمده از برنامه هداک 2,02 تخاب شدند.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

در این مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی All-Atom بر روی سه مجموعه ساختار انجام شد. یک شبیه سازی به طول 200 نانوثانیه برای ANP و دو شبیه سازی 50 نانوثانیه ای روی کمپلکس های ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7 مشتق شده از فرایند شبیه سازی میان کنش مولکولی داکینگ انجام گرفت. کل فرایندها با استفاده از بسته نرم افزاری GROMACS 5.0.7 و میدان نیرو Amber ff03 انجام شد. از مدل آب TIP3P در شبیه سازی استفاده شد. برای داشتن غلظت نمک فیزیولوژیک سیستم خنثی شد و شرایط مرزی تکراری²⁸ برای هر ساختار ابتدایی تعریف شد. از روش

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

26. Active
27. Passive
28. Periodic boundary condition

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

Wnt3a و از محیط تحت‌تأثیر اطراف سلول‌های L به‌عنوان محیط کنترل استفاده شد.

سلول‌های مورد استفاده و نحوه کشت آنها

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

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

از طرف دیگر، محیط تحت‌تأثیر سلول‌های Wnt3a L حاوی لیگاند Wnt3a، فعال‌کننده مستقیم مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین می‌باشد.

جمع‌آوری محیط تحت‌تأثیر³⁶

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 Wnt3a L به‌عنوان محیط محتوی پروتئین

بهینه‌سازی سیستم سلولی برای مطالعه روند سیتیک تغییرات بتاکاتین

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

وسترن بلات

تیمار سلول‌ها با توجه به 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 پایت، 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

آزمایش سینتیک مورد نظر طبق پروتوکل قبل بر روی سلول‌های خاموش شده انجام گرفت. در نهایت، نمونه‌ها طبق معمول جمع‌آوری و به وسیله وسترن بلات 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 نمودار⁴¹ استفاده شد. نوار خطا⁴² با معیار انحراف از معیار⁴³ نمایش داده شده 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. تصویر 1). 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-FZD** حفظ شده باشد [2].

شد و پروتئین‌های جداشده به غشای انتقال **PVDF**³⁷ منتقل شدند و سپس به‌وسیله آنتی‌بادی اولیه موشی بتاکاتین (بی‌دی‌بایوساینس³⁸)، آنتی‌بادی اولیه خرگوش **p-LRP6** (Cell signalling) و آنتی‌بادی اولیه موشی توبولین³⁹ (سل سیگنالینگ⁴⁰) 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 وسترن بلات آماده شد.

خاموش‌سازی بیان ژن‌های **FZD2** و **FZD7**

سلول‌ها با توجه به پنجره زمانی بهینه‌شده 0، 1، 2، 4 و 6 ساعت در پلیت‌های شش‌خانه کشت داده شد. محلول شماره 1 شامل 20 میکرولیتر RNA و 375 میکرولیتر محیط اپتیمم به ازای هر چاهک و محلول شماره 2 شامل 10 میکرولیتر اینترفیرین 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). در نهایت، مقدار 1 میلی‌لیتر از محلول شماره 4 به هر چاهک اضافه شد. خاموش‌سازی به مدت 2,5 روز انجام گرفت. سپس

37. Polyvinylidene difluoride

38. BD bioscience

39. Tubulin

40. Cell signaling

41. Area under the curve

42. Error bar

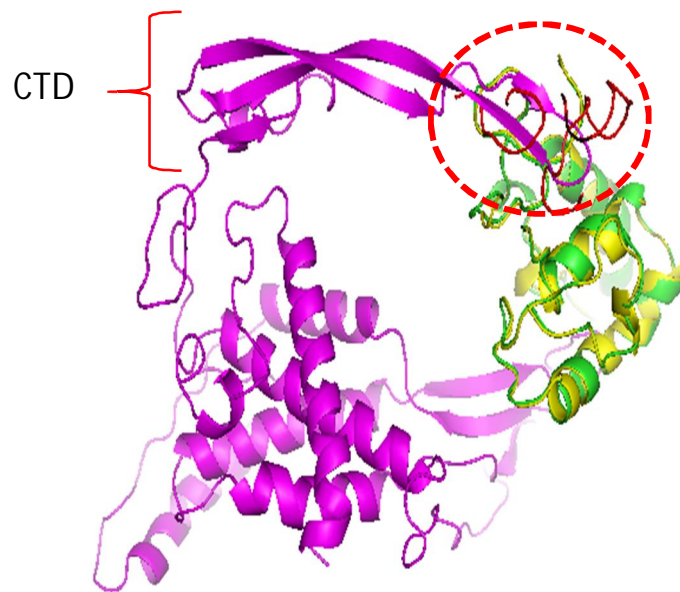
43. Standard deviation

جدول 1- 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 میان‌کنش‌دهنده در کمپلکس Wnt3-FZD8			اسیدهای آمینه میان‌کنش‌دهنده احتمالی در کمپلکس Wnt3a-FZD7		
Wnt3		FZD8	hWnt3a		hFZD7
اسیدهای آمینه درگیر میان‌کنش دمین انتهایی آمینو Wnt3 و FZD8	C208	E64	اسیدهای آمینه محتمل درگیر میان‌کنش Wnt3a	C205	D48
	L211	E68		L208	E52
	S212	Q71		S209	Q55
	G213	F72		S210	F56
		R132			R115
اسیدهای آمینه درگیر میان‌کنش دمین انتهایی کربوکسیل مولکول Wnt3	C332	F86	اسیدهای آمینه محتمل درگیر میان‌کنش Wnt3a	C329	F70
	F334	I95		F331	V79
	W336	Y100		W333	L83
	C338	L147		C335	I120
	V340	C148		V337	C130
	C342	M149		C339	V131
		D150			G132
		Y151			Q133

میان‌کنش بین مولکولی را نشان می‌دهد. (جدول 1). همان‌طور که در تصویر 1 مشاهده می‌شود، جایگاه اتصال ANP با محل اتصال دمین انتهایی کربوکسیل Wnt3a روی گیرنده FZD7 دارای همپوشانی فضایی است.

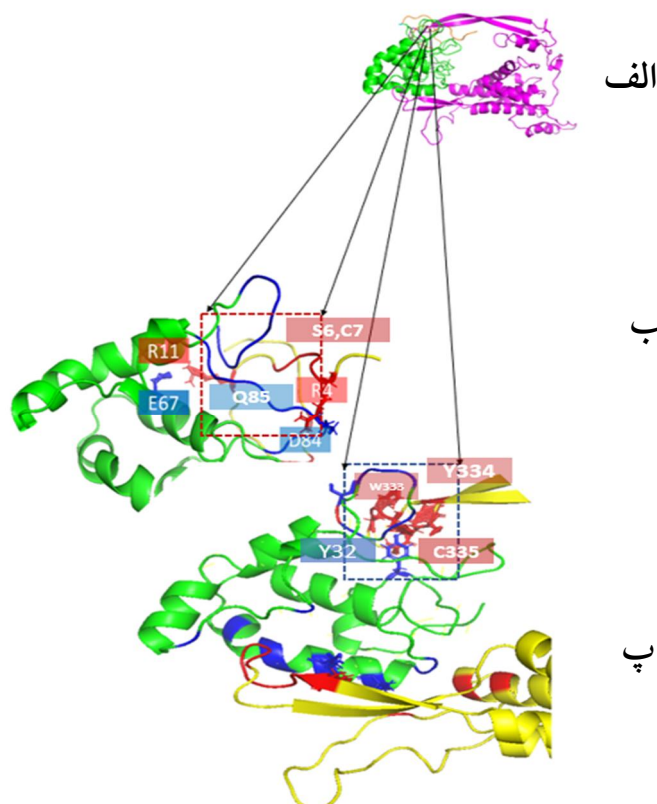
بررسی جایگاه اتصال پروتئین Wnt3a و پپتید ANP روی گیرنده FZD7
تصویر 1 انطباق ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و کمپلکس Wnt3a-FZD7 به دست آمده از شبیه‌سازی



شکل 1- ویژگی‌یابی محل اتصال ANP و دمین انتهایی 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 قرمز رنگ 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.

ماهیت میان‌کنش‌ها در کمپلکس Wnt3a-FZD7، هم در اتصال دمین انتهایی آمینو و هم در اتصال دمین انتهایی 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).

حفظ ثبات این همپوشانی فضایی در جایگاه اتصال، پس از فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی کمپلکس‌ها، پایداری کلی کمپلکس و همچنین، جایگاه لیگاند روی Wnt3a و ANP را بر روی گیرنده FZD7 نشان می‌دهد (تصویر 2). از طرف دیگر، مقایسه نتایج حاصل از آنالیز تغییرات سطح در دسترس حلال، اشتراک باقی‌مانده‌های ناحیه میانی (81-87) و باقی‌مانده‌های ناحیه انتهایی (137-124) بر روی ساختار گیرنده FZD7، بین دو کمپلکس ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7 نشان می‌دهد (شکل 2).

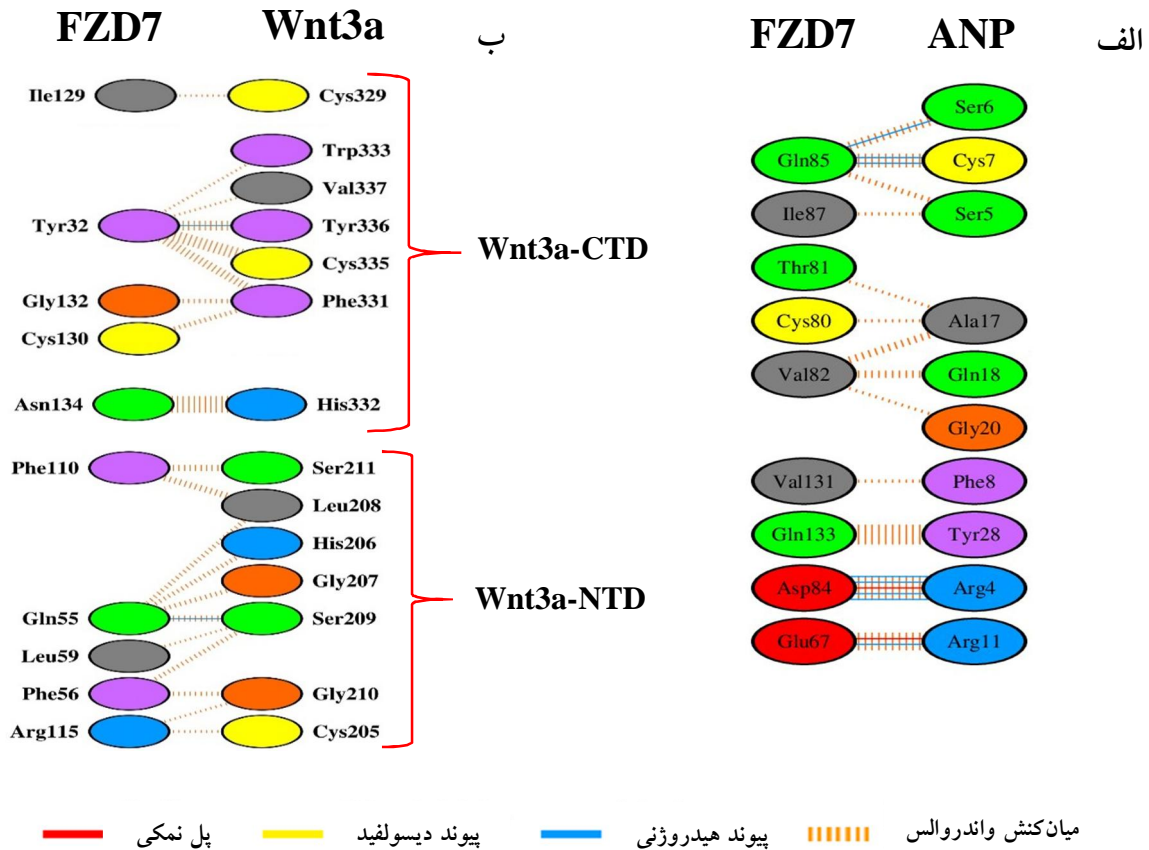


شکل 2- آنالیز جایگاه اتصال ANP و Wnt3a روی گیرنده FZD7. الف-انطباق ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و کمپلکس Wnt3a-FZD7 بعد از شبیه‌سازی. جایگاه اتصال ANP و دمین انتهای کربوکسیل Wnt3a دارای همپوشانی است، ب- نمای نزدیک پپتید ANP که با گیرنده FZD7 کمپلکس تشکیل داده است، پ- نمای نزدیک دمین انتهای کربوکسیل پروتئین 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).

توسط زیر- دمین⁴⁴ 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 در فعالیت آن و تأثیر آن در پایین دست دانست.

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 فرارگیری صحیح این لیگاند روی FZD7 ممانعت می‌کند. با توجه به اهمیت جهت‌گیری صحیح مولکول Wnt روی گیرنده FZD7 و اهمیت آن در انتقال پیام [1] و از طرف دیگر، وجود شواهد آزمایشگاهی مبتنی بر ناتوانی فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt وابسته به بتاکاتنین

44. Sub-domain



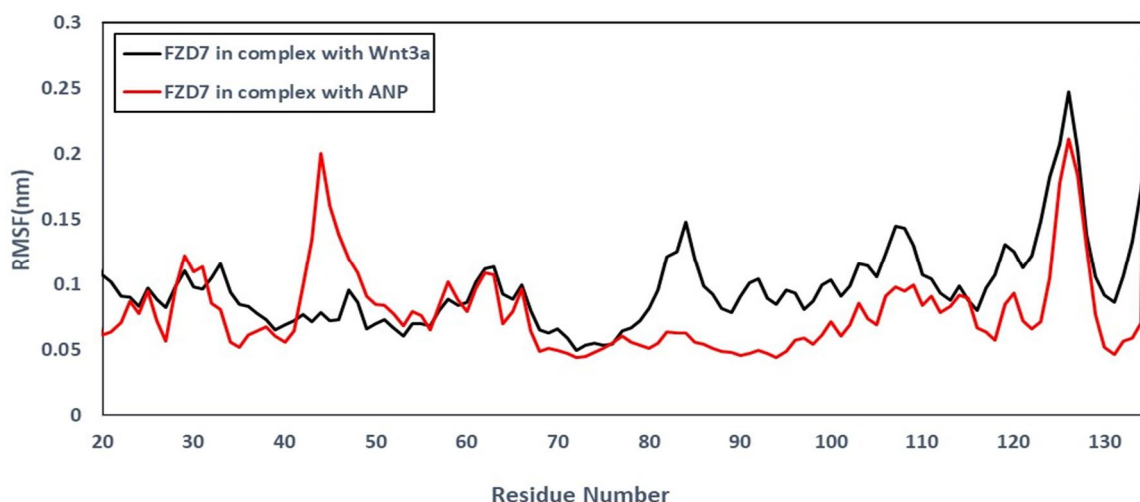
شکل 3- آنالیز جایگاه میان کنش پس از شبیه سازی. الف- آنالیز انواع میان کنش در کمپلکس ANP-FZD7. میان کنش ها، انواع هیدروژنی، یونی و واندروالس را شامل می شوند، ب- آنالیز انواع میان کنش در کمپلکس Wnt3a-FZD7. میان کنش ها شامل پیوند هیدروژنی و واندروالس می باشد.

برای اتصال به FZD7 مشترک است دارای الگو نوسان مشابهی است (شکل 4). اسیدهای آمینه درگیر در میان کنش این ناحیه، تعداد زیادی میان کنش واندروالس تشکیل می دهند. شباهت در الگو RMSF، تا حدود اسید آمینه 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 نشان دهنده پیک 0/15 نانومتر برای آسپاراتات 84 گیرنده FZD7 در ساختار کمپلکس Wnt3a-FZD7 می باشد، درحالی که میان کنش های هیدروژنی، یونی و واندروالس بین باقی مانده های ANP و گیرنده FZD7 منجر به کاهش قابل ملاحظه نوسانات ساختاری FZD7 در این ناحیه شده است

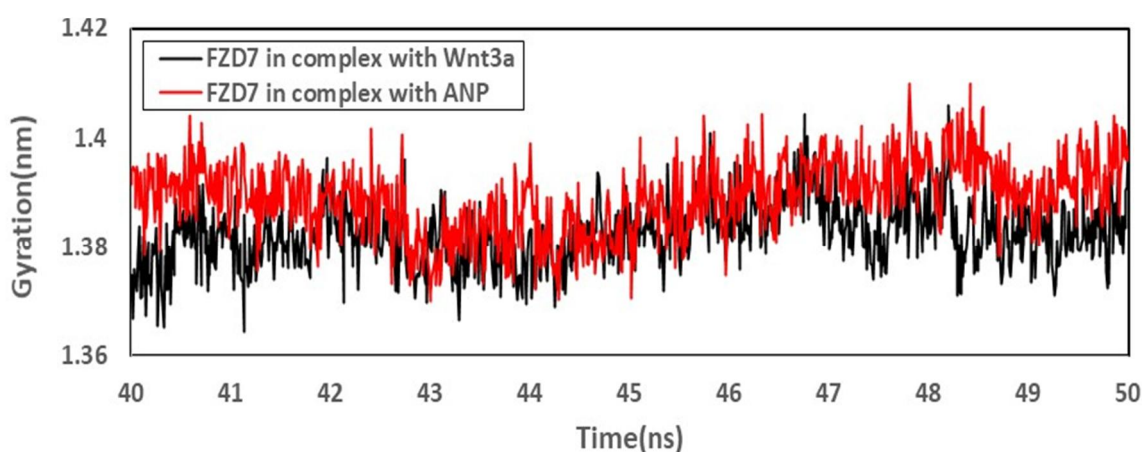
آنالیز دینامیک ساختاری گیرنده FZD7 در در ساختار کمپلکس های ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7 نوسانات ساختاری گیرنده FZD7، در میان کنش با فعال کننده Wnt3a و مهارکننده ANP در سطح تک اسید آمینه بررسی و مقایسه شد. مقدار میانگین معیار RMSF برای FZD7 هنگام میان کنش با ANP 0/08، نانومتر و هنگام میان کنش با Wnt3a 0/1 نانومتر می باشد، و این به این معناست که فعال کننده Wnt3a در مجموع، نوسانات و دینامیک ساختاری بیشتری را در مقایسه با مهارکننده ANP در FZD7 القا می کند. در شکل 4 الف - مشاهده می شود که ناحیه اطراف 135-124 که طبق آنالیز تغییرات سطح در دسترس و میان کنش (شکل 3)، بین ناحیه انتهای کربوکسیل لیگاند Wnt3a و پپتید ANP

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 بتاکاتین تأثیر متفاوت بگذارد.

(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



شکل 4 - 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.

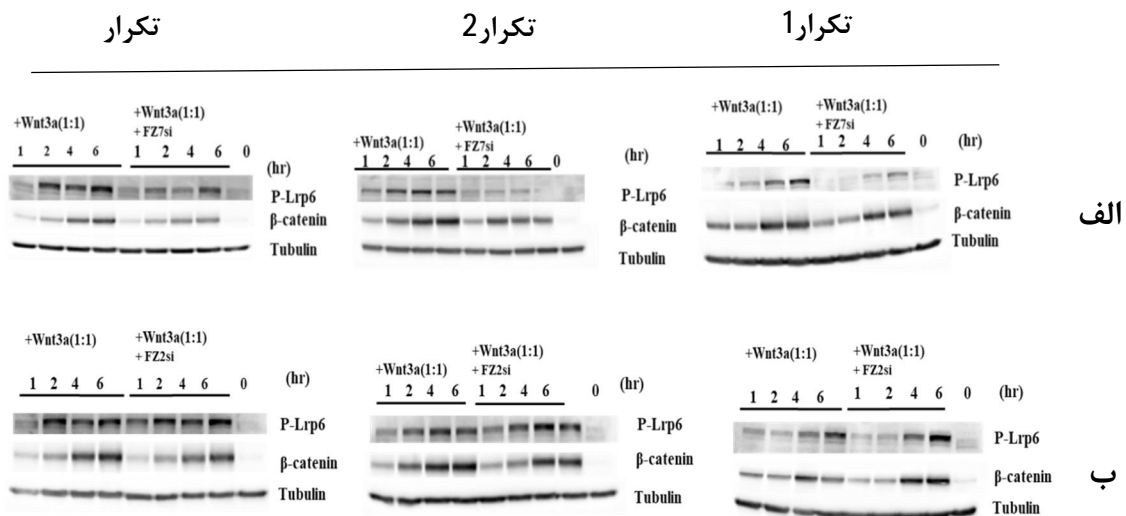


شکل 5 - تغییرات شعاع ژیراسیون در گیرنده FZD7 در ساختار کمپلکس ANP-FZD7 و Wnt3a-FZD7. نمودار گیرنده FZD7 در کمپلکس با ANP به رنگ قرمز و نمودار این گیرنده در کمپلکس با Wnt3a به رنگ سیاه نمایش داده شده است.

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

مطالعات قبلی، توانایی پپتید ANP برای کاهش فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین 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 بتاکاتین 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 بتاکاتین در سلول‌های L قابل ردیابی مستقیم از طریق بازخوانش مقدار بتاکاتین سلول است، ما در ابتدا به وابستگی مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین 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 بتاکاتین در سلول‌های L به شدت تحت تأثیر قرار گرفته است. در واقع حاصل مستقیم فعالیت این مسیر در سلول‌های L افزایش محتوای بتاکاتین سلول است و همان‌طور که نتایج حاصل از وسترن بلات 3 تکرار مستقل در سلول‌هایی که در آنها FZD7 خاموش شده است، نشان می‌دهد. مقدار بتاکاتین 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 بتاکاتین 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.

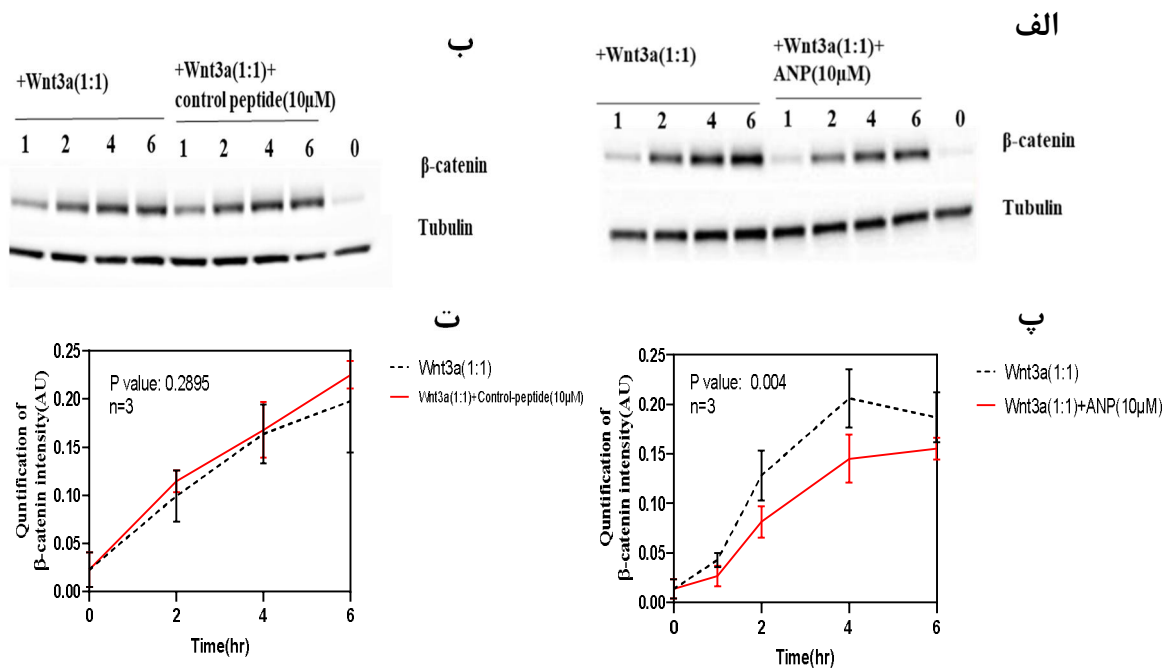


شکل 6- نتایج تأثیر خاموش‌سازی ژن گیرنده‌های سطح سلولی بر فعالیت مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین. نمونه‌های جمع‌آوری شده فرایند خاموش‌سازی برای بتاکاتین، p-LRP6 و توبولین بلات شدند. شکل الف نتیجه بلاتینگ را برای خاموشی ژن FZD7 نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل مشخص است در هر سه تکرار از آزمایش، مقدار بتاکاتین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

بررسی تأثیر مهاري ANP روی مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین

آزمایش‌های متفاوت نشان داد بهترین بازه زمانی برای بررسی سینتیک مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین، 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 بتاکاتین 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 وابسته به بتاکاتین 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 بتاکاتین در سلول‌هایی که گیرنده FZD7 در آنها خاموش شده است، نشان‌دهنده وابستگی مسیر Wnt- بتاکاتین به FZD7 در سلول‌های L است (شکل 6). مجموع این شواهد تأییدکننده مهار مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین، در سلول‌های L، در اثر میان‌کنش مستقیم پپتید ANP و گیرنده FZD7 می‌باشد.



شکل 7 - مقایسه تأثیر مهاری پپتید ANP و پپتید کنترل آن بر سلول‌های تیمار شده Wnt. شکل الف - تصویر بلات نماینده از پروتئین‌های بتاکاتنین و توبولین را در غلظت بهینه Wnt3a در حضور و عدم حضور پپتید ANP نشان می‌دهد، شکل ب - 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 - نمودار میانگین به دست آمده از سه تکرار مستقل را برای سلول‌های تیمار شده با پپتید ANP. P-value مقاداری معنی‌دار است. شکل ت - نمودار میانگین حاصل از سه تکرار مستقل برای سلول‌های تحریک شده با Wnt3a تیمار شده 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.

4. نتیجه‌گیری

مهار میان‌کنش لیگاند و گیرنده می‌تواند به عنوان یک استراژی هدفمند برای مهار جلوگیری از فعالیت مسیر Wnt-بتاکاتین 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 بتاکاتین 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 FZD7 معرفی شده است، اما مکانیسم مولکولی این فرایند مشخص نیست [20]. از طرف دیگر، پتانسیل و اهمیت اعضای متفاوت خانواده FZD در سرطان‌های وابسته به 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 کربوکسیل 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 وابسته به بتاکاتین در این سلول‌ها به FZD7 وابسته است و بنابراین این سلول‌ها می‌توانند به‌عنوان مدلی مناسب برای مطالعه تأثیر مولکول‌های مهاري میان‌کنش دهنده با FZD7 بر سیتیک 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

مهارى 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 مهاري خود را بر مسیر Wnt وابسته به بتاکاتین، 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-بتاکاتین 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 Global Health، prof. Gisou van der Goot، انستیتو Science École Polytechnique Fédérale de Lausanne، کشور سوئیس انجام شده است.

منابع

- 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.
- Janda, C.Y., et al., *Structural basis of Wnt recognition by Frizzled*. Science, 201. **۲**: p. 59-64.
- Sever, R. and J.S. Brugge, *Signal transduction in cancer*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015. **5**(4): p. a006098.
- MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Developmental cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
- Sonderegger, S., J. Pollheimer, and M. Knöfler, *Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation—review*. Placenta, 2010. **31**(10): p. 839-847.

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**:(^): 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.
6. Lybrand, D.B., et al., *Destruction complex dynamics: Wnt/ β -catenin signaling alters Axin-GSK3 β 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**.(۱۰,۲۶۴۰۲)
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. Pesse, 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.

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

Najmeh Dehghanbanadaki¹, Majid Taghdir^{*2}, Reza Hasan Sajedi³, Hossein Naderi-Manesh⁴

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- β catenin 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- β catenin 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- β catenin 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- β catenin signalling of the cellular system to FZD7. The decrease of β catenin 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