



Probable Binding Sites of Mesd and Its Peptide Derived from Carboxyl Terminal on LRP6 First and Second Beta-Propeller Domains; A Structural Approach in Drug Design

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Taghdir M.* PhD,
Dehghan Banadaki N.¹ MSc

How to cite this article

Taghdir M, Dehghan Banadaki N. Probable Binding Sites of Mesd and Its Peptide Derived from Carboxyl Terminal on LRP6 First and Second Beta-Propeller Domains; A Structural Approach in Drug Design. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):47-52.

*Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

¹Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jaleh-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82884701
Fax: -
taghdir@modares.ac.ir

Article History

Received: March 4, 2016

Accepted: February 5, 2017

ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims The Mesd is a universal inhibitor and has therapeutic effect against triple negative breast cancer. The peptide derived from carboxyl terminal, similar to protein, acts as an inhibitor of the pathway. The aim of this study was to investigate the probable binding sites of Mesd and its peptide derived from carboxyl terminal on LRP6 first and second beta-propeller domains from a structural point of view in drug design.

Materials & Methods This experimental study was conducted, using blind and site-directed molecular docking simulation with ClusPro 2.0 and Haddock 2.2 and molecular dynamic simulation. The binding sites of Mesd and the peptide on the first and second beta-propeller domains of receptor LRP6 were investigated and the selected complexes were structurally analyzed.

Findings Extensive levels of Mesd protein were found to interact with LRP6 and the levels involved in the peptide were much lower. The binding region of Mesd to LRP6 was from the carboxyl terminal. The binding region of the peptide and the protein on LRP6 was a similar region between First and Second Beta-Propeller Domains of LRP6. The RMSD and RMSF chart of the Mesd complex and its peptide was approximately the same with the first functional domain of the LRP6 co-receptor.

Conclusion The binding region of the peptide and the protein on LRP6 is not completely similar, but according to molecular simulation of selected complexes, the pattern of the inhibition mechanism is common and emphasizes on inter domain motion control from a structural point of view. Interactive region of each ligand is similar to a region of the co-receptor, which has maximum flexibility. Molecular docking simulation of Mesd and co-receptor shows important role of carboxyl terminal of the protein to bind to LRP6.

Keywords Mesd; LRP6; Wnt signaling; Breast cancer; Molecular docking Simulation

CITATION LINKS

[1] The Wnt signaling pathway in development and disease [2] The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets [3] The many ways of Wnt in cancer [4] WNT secretion and signalling in human disease [5] Wnt signaling in breast cancer: Have we come full circle? [6] LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy [7] Wnt signaling and breast cancer [8] Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines [9] Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. Cancer [10] Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity [11] Mesd is a universal inhibitor of Wnt coreceptors LRP5 and LRP6 and blocks Wnt/ β -catenin signaling in cancer cells [12] The RCSB protein data bank: A redesigned query system and relational database based on the mmCIF schema [13] What if: A molecular modeling and drug design program [14] Molecular dynamics simulation: Elementary methods [15] Amber 10 user's manual [16] Cooperative folding and ligand-binding properties of LRP6 β -propeller domains [17] Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6 [18] The C-terminal region Mesd peptide mimics full-length Mesd and acts as an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling in cancer cells [19] The structure of MESD45-184 brings light into the mechanism of LDLR family folding

جایگاه احتمالی اتصال مسد و پپتید مشتق شده از انتهای کربوکسیل آن، روی دومین‌های بتا-پراپلر اول و دوم LRP6؛ یک دیدگاه ساختاری در طراحی دارو

مجید تقدیر* PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نجمه دهقان بنادکی MSc

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: پروتئین مسد، مهارکننده عمومی مسیر است و اثرات درمانی علیه سرطان پستان منفی سه‌گانه دارد. پپتید مشتق شده از ناحیه انتهای کربوکسیل مسد، مشابه با پروتئین، به‌عنوان مهارکننده عمل می‌نماید. هدف پژوهش حاضر، بررسی جایگاه احتمالی اتصال مسد و پپتید مشتق شده از انتهای کربوکسیل آن، روی دومین‌های بتا-پراپلر اول و دوم LRP6 بود.

مواد و روش‌ها: پژوهش تجربی حاضر با شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی بدون پیش‌فرض و هدفمند، به‌ترتیب توسط دو ابزار تحت شبکه ClusPro 2.0 و Haddock 2.2 و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی صورت گرفت. اتصال پروتئین مسد و پپتید آن روی LRP6 بررسی و کمپلکس‌ها آنالیز ساختاری شدند.

یافته‌ها: سطوح وسیعی از پروتئین مسد در میان‌کنش با LRP6 قرار داشت و سطوح درگیر پپتید بسیار کمتر بود. جهت‌گیری اتصال مسد به کمک‌گیرنده، از ناحیه انتهای کربوکسیل بود. محل اتصال پپتید و پروتئین روی LRP6 ناحیه‌ای مشابه بین دومین‌های بتا-پراپلر اول و دوم این کمک‌گیرنده بود. نمودار RMSD و RMSF کمپلکس مسد و پپتید آن با دومین عملکردی اول کمک‌گیرنده LRP6 تقریباً مشابه بود.

نتیجه‌گیری: محل اتصال لیگاند‌های مسد و پپتید روی کمک‌گیرنده دقیقاً یکسان نیست، ولی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس‌های منتخب، از الگوی مشترک مکانیزم مهار، در پپتید و پروتئین، با تأکید بر کنترل حرکت بین دومینی حکایت دارد. ناحیه درگیر در میان‌کنش هر کدام از لیگاند‌ها، از لحاظ ساختاری نزدیک به ناحیه‌ای از کمک‌گیرنده است که دارای بیشترین انعطاف‌پذیری است. شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی پروتئین با کمک‌گیرنده، بیانگر نقش مهم ناحیه انتهای کربوکسیل در اتصال آن به LRP6 است.

کلیدواژه‌ها: مسد، LRP6، پیام‌رسانی Wnt، سرطان پستان، شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

*نویسنده مسئول: taghdir@modares.ac.ir

مقدمه

تبدیل پیام Wnt/بتا-کاتنین، یک مسیر کلیدی است و در بسیاری از جنبه‌های تکامل روبانی، هومئوستازی بافت‌های بالغ، تجدید سلول‌های بنیادی، تنظیم اتصالات سلولی و حرکات ریخت‌زایی درگیر است^[1]. این مسیر طی تکامل، به‌شدت بین جانوران متازوآ حفظ شده است و در بسیاری از بیماری‌های انسانی و به‌طور خاص سرطان، به‌شکل نابجا فعال می‌شود^[2]. جهش یا بیان تنظیم‌نشده اجزای اصلی مسیر از جمله لیگاند Wnt، گیرنده فریزلد، کمک‌گیرنده LRP5/6 یا کاهش بیان مهارکننده‌هایی چون DKK1، در فعالیت نامناسب آن دخیل است^[3]. چنین ویژگی‌هایی باعث شده است تا این مسیر انتقال پیام به یک هدف درمانی جذاب تبدیل شود. اتصال لیگاند Wnt به گیرنده فریزلد و کمک‌گیرنده LRP5/6، آشنایی از پیام‌های داخل سلولی به‌راه می‌اندازد که درنهایت، بتا-کاتنین را پایدار می‌کند. بتا-کاتنین به‌عنوان یک عامل رونویسی وارد هسته می‌شود و رونویسی از

ژن‌های موثر در رشد و تکثیر سلولی را آغاز می‌نماید^[4]. سرطان پستان یکی از مهاجم‌ترین انواع سرطان در زنان است. این بیماری، دومین عامل مرگ زنان در کشورهای صنعتی است. بین انواع مختلف سرطان پستان، سرطان پستان منفی سه‌گانه (TNBC)، به هورمون‌درمانی‌های رایج پاسخ نمی‌دهد و بسیار مهاجم است و بیشترین تعداد قربانیان را به‌خود اختصاص می‌دهد. اخیراً، مشخص شده است که پیام‌رسانی Wnt/بتا-کاتنین در این بیماری به‌شکل نابجا فعال شده^[5] و گیرنده‌های مسیر مثل فریزلد ۷ و کمک‌گیرنده LRP6 در آن دچار بیان بیش از حد می‌شوند^[6]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که تخریب در سطح رونویسی این پروتئین‌ها می‌تواند در شرایط داخل بدن (In vivo) از رشد تومور جلوگیری کند^[7, 8]. با توجه به موارد ذکرشده، این کمک‌گیرنده می‌تواند برای این بیماری به‌عنوان یک هدف درمانی بالقوه محسوب شود. از طرف دیگر، سرطان پروستات، شایع‌ترین سرطان بین مردان است و با فاصله بسیار کم از سرطان ریه، دومین عامل مرگ محسوب می‌شود. تنظیم پیام‌رسانی Wnt به‌وسیله Wnt3a، DKK1، sFRP-1 و Wnt5a بر رشد و ریخت‌زایی غده پروستات در حال تکوین، تأثیر می‌گذارد. گزارش‌های متناقضی در مورد نقش مسیر Wnt/بتا-کاتنین در این سرطان وجود دارد که از مجموع آنها می‌توان به اهمیت مسیر Wnt/بتا-کاتنین در آن پی برد^[9].

پروتئین محافظت‌شده مسد (Mesd)، چاپرونی اختصاصی برای تاخوردگی صحیح واحدهای تکراری بتا-پراپلر/EGF در اعضای خانواده LDLR و به‌طور خاص LRP5/6 است^[10]. نشان داده شده است که مسد می‌تواند در سطح سلول به LRP5/6 متصل شود و مسیر پیام‌رسانی Wnt/بتا-کاتنین را در سلول‌های بیان‌کننده این کمک‌گیرنده‌ها مهار نماید. تیمار موش‌های دارای تومور MMTV-Wnt1 با مسد نوترکیب یا پپتید جداشده از ناحیه انتهای کربوکسیل پروتئین مسد که برای اتصال به کمک‌گیرنده در سطح سلول ضروری است، منجر به کاهش رشد تومور، بدون ایجاد اثرات جانبی شده است^[6]. تیمار سلول‌های سرطانی با پروتئین مسد و همین‌طور پپتید مذکور نشان داده است که پروتئین کامل، تأثیر بیشتری بر کاهش رشد سلول‌های سرطانی دارد^[11].

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که دردسترس‌بودن زیستی پپتید و پروتئین مسد یکسان است^[6]، درنتیجه تفاوت در عملکرد، به تفاوت در پایداری پپتید نسبت به پروتئین کامل نسبت داده شده است، هرچند نحوه میان‌کنش پروتئین مسد و پپتید آن با دومین‌های کمک‌گیرنده LRP6 به‌شکل دقیق مشخص نیست و مقایسه‌ای بین نحوه القای مهار روی کمک‌گیرنده از طریق پپتید یا پروتئین پیشنهاد نشده است.

با توجه به اهمیت درک مکانیزم القای مهار در طراحی زیست‌داروهایی با کارایی بالاتر علیه سرطان، تصمیم بر آن شد تا با انجام فرآیند شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی، به‌مقایسه محل اتصال پپتید و پروتئین روی کمک‌گیرنده LRP6 پرداخته شود و با انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روی کمپلکس‌های انتخاب‌شده، مکانیزم مهار بررسی شود تا درک بهتری از پارامترهای موثر در مهار، برای طراحی زیست‌داروها با کارایی بالاتر ارایه شود. بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی جایگاه احتمالی اتصال مسد و پپتید مشتق شده از انتهای کربوکسیل آن، روی دومین‌های بتا-پراپلر اول و دوم LRP6، به‌عنوان یک دیدگاه ساختاری در طراحی دارو بود.

مواد و روش‌ها

دریافت داده ساختاری: در پژوهش تجربی حاضر، مختصات پروتئین مسد و کمک‌گیرنده LRP6 به ترتیب با کد 3s98 و 2kgi از بانک داده پروتئین دریافت شد [12]. ناحیه انتهای کریوکسیل پروتئین مسد (اسیدهای آمینه ۱۹۱-۱۵۵)، از فایل مختصات این پروتئین، استخراج و ذخیره شد. از زنجیره A موجود در فایل مختصات کمک‌گیرنده LRP6 برای مراحل بعد استفاده شد.

مطالعات شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی: در اولین فرآیند، میان‌کنش دومین عملکردی اول کمک‌گیرنده LRP6 شامل دو بتا-پراپلر ابتدایی با پروتئین مسد و در شبیه‌سازی دوم میان‌کنش همان بخش کمک‌گیرنده با ساختار میانگین حاصل از شبیه‌سازی ۴۰ نانوثانیه‌ای پپتید طبیعی مشتق شده از ساختار پروتئین مسد بررسی شد. فرآیند شبیه‌سازی در دو مرحله بدون پیش‌فرض (کور) و هدفمند (هدایت شده) به ترتیب توسط دو ابزار تحت شبکه ClusPro 2.0 و Haddock 2.2 انجام گرفت [13, 14].

آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی قبل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: بهترین کمپلکس‌های ایجاد شده توسط ClusPro براساس دو معیار اندازه کلاستر (احتمال و آنتروپی ایجاد کمپلکس) و انرژی (پایداری کمپلکس) انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱) نتایج شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی بدون پیش‌فرض با ابزار تحت شبکه ClusPro 2.0

ClusPro	شماره کلاستر	اندازه کلاستر	انرژی وزن‌دهی شده
کمپلکس پپتید-گیرنده	۰	۲۸۵	-۳۷۷
کمپلکس پروتئین-گیرنده	۰	۱۰۴	-۹۸۵/۵

با استفاده از ابزار تحت شبکه What if و فرمول‌نویسی اکسل، تغییرات سطح در دسترس، محاسبه و اسیدهای آمینه درگیر در میان‌کنش استخراج شد [13]. در مرحله بعد، این اسیدهای آمینه به عنوان باقی‌مانده فعال در شبیه‌سازی میان‌کنش هدفمند استفاده شدند. در نهایت، بهترین کمپلکس‌ها با توجه به معیارهای انرژی، اندازه کلاستر، امتیاز Haddock و Z انتخاب و برای انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و بررسی مکانیزم مهار، انتخاب شد (جدول ۲).

جدول ۲) نتایج شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی بدون پیش‌فرض با ابزار تحت شبکه Haddock 2.2

Haddock	شماره کلاستر	اندازه کلاستر	امتیاز Haddock	امتیاز Z
کمپلکس پپتید-گیرنده	۱	۱۵۱	-۵-۱۲۴/۱+	-۱/۷
کمپلکس پروتئین-گیرنده	۱	۱۶۲	-۸/۳-۱۸۵/۹+	-۱

مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: در این پژوهش سه فرآیند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد. شبیه‌سازی اول روی پپتید مستخرج از ساختار پروتئین مسد به مدت ۴۰ نانوثانیه و شبیه‌سازی دوم و سوم به ترتیب روی کمپلکس منتخب شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی پروتئین مسد با کمک‌گیرنده LRP6 و کمپلکس منتخب شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی پپتید مسد با کمک‌گیرنده LRP6، به مدت ۴ نانوثانیه انجام گرفت. تمام شبیه‌سازی‌ها با نرم‌افزار AMBER 10 و میدان نیروی ff03

انجام شد [15]. جعبه شبیه‌سازی با ابعاد ۵۱۲Å³ تعریف شد. محیط شبیه‌سازی به وسیله یون‌های با بار مخالف، خنثی و مولکول مورد نظر در آب مدل TIP3P حل شد. مرحله بهینه‌سازی انرژی، ۵۰۰۰ گام و همین‌طور تعادل‌رسانی در حجم ثابت برای تنظیم دما روی ۳۱۰ درجه کلوین و تعادل‌رسانی در فشار ثابت برای تنظیم فشار روی یک اتمسفر، هر کدام به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه انجام شد. سپس برحسب سیستم مورد مطالعه، شبیه‌سازی به مقدار مناسب ادامه یافت.

به منظور آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، از برنامه جانبی [PTRAJ، مادل محاسباتی برنامه Amber10 برای انجام آنالیز ساختاری و استخراج ساختار میانگین، محاسبه RMSF، RMSD و شعاع ژیراسیون استفاده شد [15] و به منظور آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی میان‌کنش بین مولکولی پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، اسیدهای آمینه درگیر در میان‌کنش با استفاده از نرم‌افزار تحت شبکه What if و فرمول‌نویسی اکسل، کمپلکس‌های شبیه‌سازی شده استخراج و باقی‌مانده‌های درگیر در میان‌کنش بین کمپلکس پروتئین مسد و کمک‌گیرنده و همچنین پپتید مسد و کمک‌گیرنده مقایسه شد.

یافته‌ها

سطوح وسیعی از پروتئین مسد در میان‌کنش با LRP6 قرار داشت، در حالی که سطوح درگیر در مورد پپتید بسیار کمتر و حدود یک سوم سطح درگیر شده در کمپلکس پروتئین و کمک‌گیرنده بود (جدول ۳).

جدول ۳) سطح درگیر در میان‌کنش

کمپلکس پپتید-کمک‌گیرنده	کمپلکس پروتئین-کمک‌گیرنده	مسیر
۲۲۹ آنکستروم	۷۲۷/۲۵ آنکستروم	لیگاند
۱۹۱/۶ آنکستروم	۷۷۴/۱۴ آنکستروم	گیرنده

درصد اسیدهای آمینه قطبی و باردار میان‌کنش‌دهنده در کمپلکس پروتئین مسد و LRP6 بیشتر و به دنبال آن، میان‌کنش‌های هیدروژنی و پل‌های نمکی نیز بیشتر بود (جدول ۴).

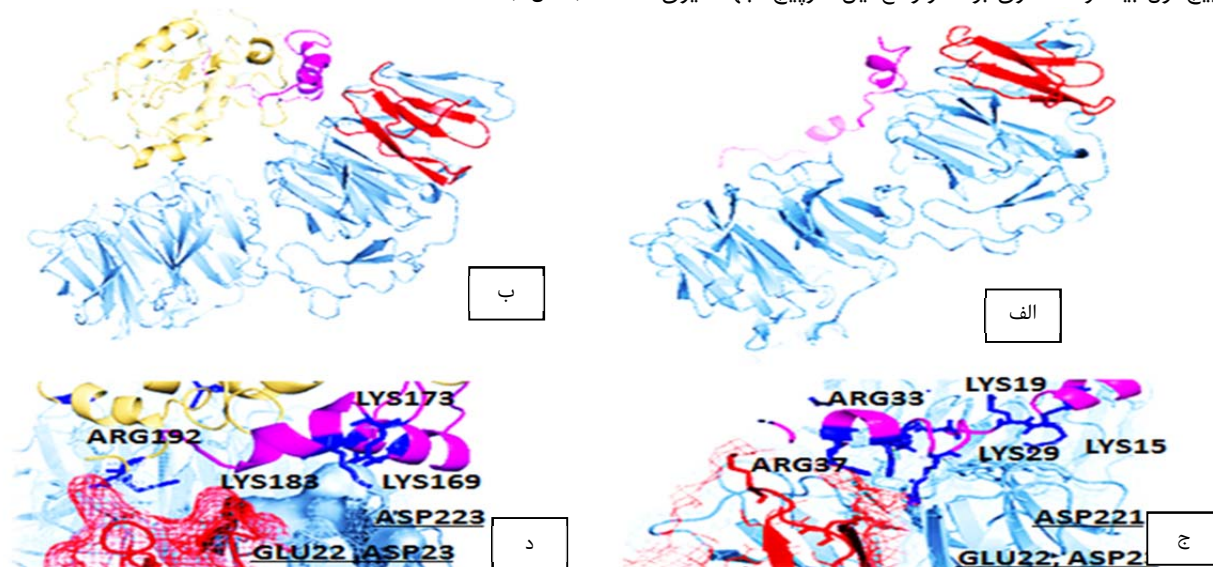
جدول ۴) درصد اسیدهای آمینه غیرقطبی، قطبی و باردار، در کمپلکس‌ها (پپتید-LRP6 و پروتئین-LRP6 حاصل از ساختار میانگین شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به مدت ۴ نانوثانیه)

کمپلکس	اسیدهای آمینه غیرقطبی	اسیدهای آمینه قطبی	اسیدهای آمینه باردار
کمک‌گیرنده در میان‌کنش با پپتید	۳۹/۱۳	۱۷/۳۹	۴۳/۷
پپتید در میان‌کنش با کمک‌گیرنده	۲۷/۷۷	۱۱/۱۱	۵۵/۵۵
کمک‌گیرنده در میان‌کنش با پروتئین	۳۴/۴۸	۱۷/۲۴	۴۸/۲۷
پروتئین در میان‌کنش با کمک‌گیرنده	۱۳/۰۴	۸/۶۹	۶۹/۵۶

جهت‌گیری اتصال مسد به کمک‌گیرنده، از سمت ناحیه انتهای کریوکسیل بود (شکل ۱). شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روی پپتید مشتق شده از این ناحیه نشان از پایداری ساختاری این موتیف در پپتید داشت (شکل ۱-الف؛ نمودار ۱) و در ۵ نانوثانیه آخر دارای کمترین نوسانات بود، در واقع یک تعادل ساختاری ایجاد شد (نمودار ۱). نتایج شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی چه در مورد پروتئین مسد و چه در مورد پپتید آن، نشانگر اهمیت

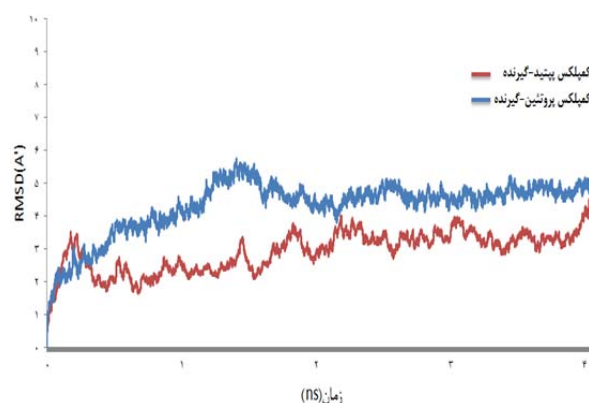
ساختاری را به ماریپیچ دوم القا می‌کند و تحت تاثیر آن، موقعیت میان‌کنش‌های موثر بین ماریپیچ دوم و کمک‌گیرنده ایجاد می‌شود (شکل ۱).

میان‌کنش‌های ایجاد شده با کمک‌گیرنده LRP6 توسط ماریپیچ دوم موجود در موتیف انتهای کربوکسیل بود و به‌نظر می‌رسد اهمیت ماریپیچ اول بیشتر ساختاری بود. در واقع این ماریپیچ، جهت‌گیری

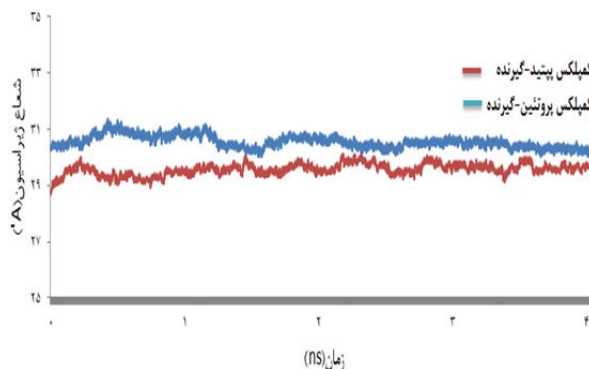


شکل ۱) بررسی اتصال پروتئین و پپتید مسد به کمک‌گیرنده LRP6
 الف) اتصال پپتید مسد (بنفش) به LRP6 (آبی کم‌رنگ)
 ب) اتصال پروتئین مسد (زردرنگ) به LRP6
 ج) اتصال پپتید مسد به کمک‌گیرنده LRP6 در نمای نزدیک
 د) اتصال پروتئین مسد به کمک‌گیرنده LRP6 در نمای نزدیک
 شکل "ج" و "د" مهم‌ترین اسیدهای آمینه درگیر در اتصال را در هر کدام از کمپلکس‌ها نشان می‌دهد.

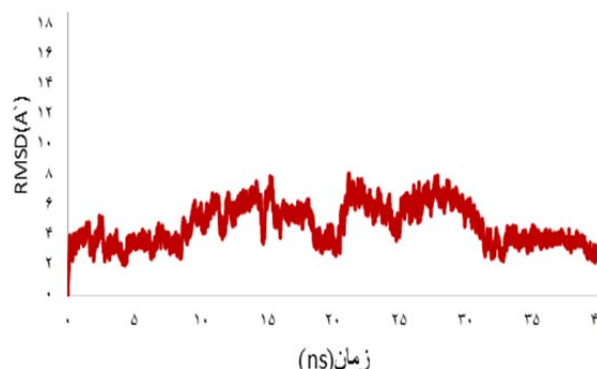
کمپلکس مورد نظر هرچند شدید نبود، ولی دارای الگوی یکسانی نبود (نمودار ۳).



نمودار ۲) مقایسه RMSD کمپلکس پپتید-گیرنده (قرمز) و پروتئین-گیرنده (آبی)



نمودار ۳) مقایسه شعاع ژیراسیون کمپلکس پپتید-گیرنده (قرمز) و پروتئین-گیرنده (آبی)



نمودار ۴) تغییرات RMSD حاصل از شبیه‌سازی پپتید استخراج شده از ناحیه انتهای کربوکسیل پروتئین مسد

محل اتصال پپتید و پروتئین روی LRP6 ناحیه‌ای مشابه بین دومین‌های بتا-پراپلر اول و دوم این کمک‌گیرنده بود. از جمله اسیدهای آمینه پراهمیت، ASP22 و GLU23 کمک‌گیرنده LRP6 بود که بین کمپلکس پپتید و کمک‌گیرنده و همچنین پروتئین و کمک‌گیرنده مشترک بود. از طرف دیگر اسیدهای آمینه با بار مثبت چه درمورد پپتید و چه درمورد ناحیه انتهای کربوکسیل پروتئین، نقش مهمی در اتصال داشتند. الگوی مهار مسیر Wnt/بتا-کاتنین بین پپتید و پروتئین مسد مشترک و با تاکید بر کنترل حرکت بین دومینی انجام پذیرفت (شکل ۱).

نمودار تغییرات RMSD کمپلکس مسد و پپتید آن با دومین عملکردی اول کمک‌گیرنده LRP6 بسیار مشابه بود (نمودار ۲). در هر دو کمپلکس با گذشت زمان حدود ۲۰۰ پیکوثانیه، شبیه‌سازی پایدار شده و تا پایان یعنی انتهای ۴ نانوثانیه، این وضعیت با تغییرات محسوسی مواجه نبود. تغییرات شعاع ژیراسیون در دو

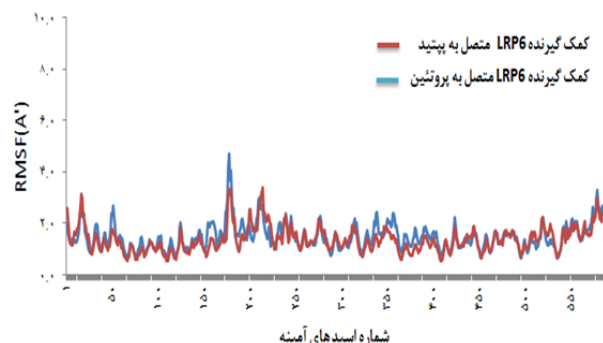
اسیده‌های آمینه قطبی و باردار میان‌کنش‌دهنده در کمپلکس پروتئین و کمک‌گیرنده بیشتر و به دنبال آن میان‌کنش‌های هیدروژنی و پل‌های نمکی نیز بیشتر بود. در نتیجه انتظار می‌رود پایداری کمپلکس پروتئین-کمک‌گیرنده بیش از کمپلکس پپتید-کمک‌گیرنده باشد. با توجه به نتایج شبیه‌سازی میان‌کنش مولکولی و مطابق با پژوهش‌های تجربی، جهت‌گیری اتصال مسد به کمک‌گیرنده، از سمت ناحیه انتهای کربوکسیل بود. ساختار این ناحیه از پروتئین مسد براساس اطلاعات NMR، یک موتیف مارپیچ-لوپ-مارپیچ است^[19]. طبق نتیجه پژوهش‌های تجربی، اگر سلول‌های سرطانی با پپتیدهایی که فقط شامل یکی از دو مارپیچ موجود در ناحیه انتهای کربوکسیل هستند تیمار شوند، تاثیر مهاری مشاهده شده بسیار کمتر از حالتی خواهد شد که تیمار به وسیله پپتید شامل هر دو مارپیچ انجام گیرد^[18].

تغییرات شعاع ژیراسیون در دو کمپلکس مسد و پپتید هرچند شدید نبود، ولی دارای الگوی یکسانی نبود. می‌توان این تفاوت‌ها را به نحوه و محل میان‌کنش پپتید با کمک‌گیرنده LRP6 نسبت داد. جالب است که در هر دو مورد مسد و پپتید، بیشترین ناهمگونی در شعاع ژیراسیون بین نانوثانیه اول و نانوثانیه دوم ایجاد شد. این مساله را می‌توان به مکانیزم مشابه عملکرد پپتید و پروتئین روی LRP6 در القای مهار نسبت داد. قابل توجه است که وقتی این ناحیه در ساختار گیرنده LRP6 مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که از نظر هندسی، نزدیک به بخشی از ساختار کمک‌گیرنده LRP6 است که اسیده‌های آمینه درگیر در میان‌کنش، چه در پپتید و چه در پروتئین در آن ناحیه قرار دارند. به نظر می‌رسد این نزدیکی ساختاری منجر به افزایش دامنه حرکت اسیده‌های آمینه قرارگرفته در این ناحیه می‌شود و در مکانیزم مهار نیز تاثیر خواهد گذاشت. با توجه به این نکته که حذف ناحیه انتهای کربوکسیل از پروتئین مسد منجر به فقدان اثر مهاری آن پروتئین شده و همچنین ناحیه انتهای کربوکسیل برای القای مهار کافی و ضروری است، می‌توان نتیجه گرفت ایجاد این الگوی انعطاف‌پذیری مشترک در کمک‌گیرنده، می‌تواند در مکانیزم القای مهار دخالت داشته باشد.

در نهایت، این پژوهش ضمن تایید یافته‌های قبلی مبتنی بر اهمیت و نقش ناحیه انتهای کربوکسیل پروتئین مسد در القای مهار، دیدگاه جدیدی را درباره مکانیزم این فرآیند ایجاد کرد. در واقع با توجه به نتایج، کنترل حرکت بین دومینی کمک‌گیرنده LRP6 می‌تواند به عنوان مفهومی مفید برای طراحی مهارکننده‌هایی با کارایی بالاتر مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به اهمیت اسیده‌های آمینه ناحیه ۱۵۰ تا ۲۰۰ کمک‌گیرنده LRP6 در میان‌کنش با ناحیه انتهای کربوکسیل و همین‌طور پپتید و نقش احتمالی آن در القای مهار، می‌توان کنترل یا تنظیم حرکات این ناحیه از کمک‌گیرنده را به عنوان هدف برای طراحی مهارکننده مد نظر قرار داد. به طور کلی دستیابی به درک عمیق از مکانیزم و الگوی مهارکننده‌های شناخته شده مسیر، چون DKK1 و مسد که با اتصال به LRP6 عمل می‌کنند می‌تواند برای طراحی زیست‌داروهای ضد سرطان جدید راه‌گشا باشد.

با توجه به اینکه مطالعه میان‌کنش گیرنده و لیگاند در زمان طولانی‌تر می‌تواند اطلاعات بیشتر و دقیق‌تری درباره تاثیر لیگاند روی گیرنده به دست دهد، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در زمان طولانی‌تر روی این کمپلکس‌ها توصیه می‌شود. آنالیز میان‌کنش‌های ایجاد شده و همین‌طور تغییرات کانفورماسیونی و نیز مقایسه این تغییرات با یک فعال‌کننده مسی می‌تواند سودمند

نمودار RMSF این دو کمپلکس نیز الگوی نوسان تقریباً مشابهی را نشان داد (نمودار ۴). حداکثر نوسان ساختاری در ناحیه اسیده‌های آمینه ۱۵۰ تا ۲۰۰ اتفاق افتاد و این مساله چه در مورد کمپلکس پپتید-گیرنده و چه کمپلکس پروتئین-گیرنده دارای الگوی یکسانی بود (نمودار ۴).



نمودار ۴) مقایسه RMSF کمپلکس پپتید-گیرنده (قرمز) و پروتئین-گیرنده (آبی)

بحث

هدف پژوهش حاضر، بررسی جایگاه احتمالی اتصال مسد و پپتید مشتق شده از انتهای کربوکسیل آن، روی دومین‌های بتا-پراپلر اول و دوم LRP6، یک دیدگاه ساختاری در طراحی دارو بود. مسیر پیام‌رسانی Wnt نقش کلیدی در فرآیندهای جنینی و همچنین تومورزایی ایفا می‌کند^[1]. LRP6 که یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های LDLR است، به عنوان کمک‌گیرنده ضروری مسیر، ایفای نقش می‌نماید^[10]. در پژوهشی مشخص شده است که بیان این کمک‌گیرنده در سطح رونویسی در سیتوپلاسم برخی سلول‌های سرطانی، از جمله فیبروبلاست‌ها به شدت زیاد می‌شود^[16]. این در حالی است که در سرطان پستان منفی سه‌گانه، LRP6، حتی در سطح ترجمه نیز افزایش بیان نشان می‌دهد. به این ترتیب، هدف‌گیری این پروتئین در سرطان‌های مرتبط با مسیر Wnt/بتا-کانتین معقول به نظر می‌رسد^[17].

طبق پژوهش‌های تجربی انجام شده، کمک‌گیرنده LRP6 دارای دو دومین عملکردی به نام BP12 و BP34 است. تمام لیگاندهای خارج سلولی شناخته شده این کمک‌گیرنده شامل مسد، Dkk1، SOST و Wnt به این دو دومین عملکردی اتصال می‌یابند^[16]. با توجه به اهمیت ناحیه انتهای کربوکسیل پروتئین مسد (اسیده‌های آمینه ۱۵۵ تا ۱۹۱) در اتصال به LRP6 و ایجاد تاثیر مهار رشد و همچنین پایداری پایین پپتید مشتق شده از این ناحیه^[18]، تصمیم بر آن شد تا محل اتصال پروتئین و پپتید مسد روی دومین عملکردی اول پروتئین مسد (BP12) مورد بررسی قرار گیرد و به این ترتیب، به دیدگاهی صحیح درباره نحوه اتصال و نحوه مهار القاشده توسط پپتید و پروتئین مسد و علت تفاوت عملکرد آنها به دست آید. آنالیزهای انجام شده روی کمپلکس‌های حاصل از شبیه‌سازی نشان داد که سطح میان‌کنش در کمپلکس پروتئین-گیرنده بسیار بیشتر از سطح میان‌کنش پپتید-گیرنده است. در واقع علت این امر را می‌توان به تعداد بیشتر اسیده‌های آمینه میان‌کنش‌دهنده پروتئین مسد با کمک‌گیرنده Lrp6 در مقایسه با پپتید نسبت داد. می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که سطح وسیع‌تر میان‌کنش‌دهنده پروتئین مسد نسبت به پپتید، منجر به پایداری بیشتر کمپلکس پروتئین و کمک‌گیرنده و در نهایت، توجیه‌کننده مهارکنندگی بالاتر پروتئین نسبت به پپتید باشد؛ خصوصاً که درصد

- and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(11):5136-41.
- 7- Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(1):36-41.
- 8- Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2006;15(3):701-7.
- 9- Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, Simard EP, Boscoe FP, Henley SJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*. 2014;120(9):1290-314.
- 10- Hsieh JC, Lee L, Zhang L, Wefer S, Brown K, DeRossi C, et al. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell*. 2003;112(3):355-67.
- 11- Lu W, Liu CC, Thottassery JV, Bu G, Li Y. Mesd is a universal inhibitor of Wnt coreceptors LRP5 and LRP6 and blocks Wnt/ β -catenin signaling in cancer cells. *Biochemistry*. 2010;49(22):4635-43.
- 12- Deshpande N, Address KJ, Bluhm WF, Merino-Ott JC, Townsend-Merino W, Zhang Q, et al. The RCSB protein data bank: A redesigned query system and relational database based on the mmCIF schema. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D233-7.
- 13- Vriend G. What if: A molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph*. 1990;8(1):52-6.
- 14- Haile JM. Molecular dynamics simulation: Elementary methods. New York: Wiley; 1992.
- 15- Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang RE, Duke RE, et al. Amber 10 user's manual [Internet]. California: University of California; 2008 [cited 2018 May 25]. Available from: http://glycam.org/legacy_courses/2010/8330/pdfs/Amber10i.pdf.
- 16- Liu CC, Pearson C, Bu G. Cooperative folding and ligand-binding properties of LRP6 β -propeller domains. *J Biol Chem*. 2009;284(22):15299-307.
- 17- Bourhis E, Tam C, Franke Y, Bazan JF, Ernst J, Hwang J, et al. Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *J Biol Chem*. 2010;285(12):9172-9.
- 18- Lin C, Lu W, Zhang W, Londoño-Joshi AI, Buchsbaum DJ, Bu G, et al. The C-terminal region Mesd peptide mimics full-length Mesd and acts as an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling in cancer cells. *PloS One*. 2013;8(2):e58102.
- 19- Köhler C, Lighthouse JK, Werther T, Andersen OM, Diehl A, Schmieder P, et al. The structure of MESD45-184 brings light into the mechanism of LDLR family folding. *Structure*. 2011;19(3):337-48.

نتیجه گیری

محل اتصال لیگاندهای مسد و پپتید روی کمک گیرنده دقیقاً یکسان نیست، در حالی که شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس های منتخب، از الگوی مشترک مکانیزم مهار، در پپتید و پروتئین، با تاکید بر کنترل حرکت بین دومینی حکایت دارد. همچنین، ناحیه درگیر در میان کنش هر کدام از لیگاندها، از لحاظ ساختاری نزدیک به ناحیه ای از کمک گیرنده است که دارای بیشترین انعطاف پذیری است. شبیه سازی میان کنش مولکولی پروتئین با کمک گیرنده، بیانگر نقش مهم ناحیه انتهای کربوکسیل در اتصال آن به LRP6 است.

تشکر و قدردانی: بر خود لازم می دانیم از دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس و به خصوص گروه بیوفیزیک این دانشکده برای یاری در تهیه و تدوین این مقاله تشکر نماییم.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مجید تقدیر (نویسنده اول)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ نجمه دهقان بنادکی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪).

منابع مالی: منابع مالی این تحقیق توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

منابع

- 1- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
- 2- Baarsma HA, Königshoff M, Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):66-83.
- 3- Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(1):45-51.
- 4- Herr P, Hausmann G, Basler K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med*. 2012;18(8):483-93.
- 5- Brown AM. Wnt signaling in breast cancer: Have we come full circle?. *Breast Cancer Res*. 2001;3(6):351-5.
- 6- Liu CC, Prior J, Piwnica-Worms D, Bu G. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype