



## Activation of Calcitonin Receptor in HEK-293T Cells Increases the Expression of $\beta$ -Catenin-target Genes

Azadmanesh H<sup>a</sup>, Arab Najafi SM<sup>a\*</sup>

- Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Sciences, University of Tehran, P.O. Box 14155-6455, Tehran-Iran.

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Azadmanesh H, Arab Najafi SM. Activation of Calcitonin Receptor in HEK-293T Cells Increases the Expression of  $\beta$ -Catenin-target Genes. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(3):107-116

<https://10.61186/JCT.14.2.166>

### KEYWORDS

Calcitonin receptor,  
 $\beta$ -Catenin protein,  
trimeric G proteins,  
G protein-coupled receptors

### ABSTRACT

**Aim:**  $\beta$ -Catenin is a known proto-oncoprotein which its upregulation is involved in tumorigenesis of several human cancers including colorectal cancer, melanoma, pancreatic, ovarian and many other human malignancies. It is believed that this protein is a very potential target for cancer prevention and therapy. Although  $\beta$ -Catenin was originally identified as a component of the canonical Wnt signaling, there are many reports that this protein can also be regulated by several other signaling pathways including those through receptor tyrosine kinases, PI3-kinases and heterotrimeric G-proteins. It is quite likely that regulation of  $\beta$ -Catenin by multiple signaling pathways is a result of the cross-talk among these pathways. We and others have already provided evidence that activation of almost all members of the  $G\alpha$  subunits of heterotrimeric G-proteins can regulate  $\beta$ -Catenin via different mechanisms. For example, by using several cell systems, we have shown that activation of the  $G\alpha_q$  class of  $G\alpha$  proteins leads to inhibition of GSK-3 $\beta$  and cellular accumulation of  $\beta$ -Catenin, suggesting that  $G\alpha_q$  signaling may somehow positively regulate the canonical Wnt signaling. We have also confirmed the positive role of  $G\alpha_q$  on  $\beta$ -Catenin-mediated signaling by using a couple of specific

\* Corresponding author. Tel.: +98-2161113648; Fax: +98-2166492992

E-mail address: smarabnajafi@ut.ac.ir

DOI: <https://10.61186/JCT.14.3.166>

Received: 6 Jul. 2023; Received in revised form: 24 Oct. 2023; Accepted: 4 Nov. 2023

Original Article

©Author



G $\alpha$ q blocking peptides. Receptors for G-proteins (G protein-coupled receptors, GPCRs) are the most diverse family of proteins in mammals which are involved in many critical cellular processes. Around one thousand different GPCRs are encoded by human genome and more than 30% of the approved therapeutic drugs, target these receptors. Calcitonin receptor (CTR) is a member of the GPCR family (B1 subfamily) which is shown to couple to G $\alpha$ q or G $\alpha$ s containing trimeric G proteins involved in primarily activation of phospholipase C $\beta$ 1 and adenylate cyclase respectively. The known ligand for Calcitonin receptor is a 32 amino acid peptide called Calcitonin which is produced by several tissues in the body including thyroid, prostate, and central nervous system. CTR-mediated signaling has very important biological roles in many tissues including bones in which this signaling pathway is involved in maturation of osteoclasts and bone homeostasis. Calcitonin receptor is a GPCR family member which functions through activation of Gs and Gq trimeric G proteins and therefore, in this study we have examined whether activation of this receptor has any effect on  $\beta$ -Catenin transcriptional activity by measuring the expression of several  $\beta$ -Catenin-target genes including a reporter *luciferase* gene harboring several  $\beta$ -Catenin/T-cell factor recognition elements.

**Material and Methods:** HEK293T cell culture and transfection with appropriate genetic constructs plus gene expression assays at the level of transcription including quantitative RT-PCR and real-time PCR have been used in this study.

**Results:** The results showed that cellular activation of Calcitonin receptor increases the expression of several  $\beta$ -Catenin-responsive genes. Expression of the reporter *luciferase*, *CCND1* (the Cyclin D1 encoding gene), *c-MYC*, and *FGF-20* (Fibroblast growth factor-20) was increased upon the expression of Calcitonin receptor in HEK293T cells or treatment of these cells with Calcitonin.

**Conclusion:** The Calcitonin receptor-mediated signaling may activate  $\beta$ -Catenin and (or) the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway. Further investigations are required to find out the exact mechanism of regulation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway by Calcitonin receptor-mediated signaling. Since  $\beta$ -Catenin is a potential oncogene in human cancers, Calcitonin receptor and its signaling partners can be considered for clinical studies.





## فعالیت گیرنده کلسیتونین (Calcitonin receptor) در سلول‌های HEK-293T باعث افزایش بیان ژن‌های هدف پروتئین $\beta$ -Catenin می‌شود

حدیثه آزادمنش، سید محمود عرب نجفی\*

-گروه علوم سلولی و مولکولی- دانشکده زیست‌شناسی- دانشکده‌گان علوم- دانشگاه تهران صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵ تهران- ایران.

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> پروتئین <math>\beta</math>-Catenin در سلول‌های حیوانی حداقل دارای دو عمل ویژه است. این پروتئین از یک طرف نقش مهمی در تشکیل و پایداری اتصالات سلول به سلول خصوصاً در بافت‌های پوششی (اپی‌تلیال) دارد و از طرف دیگر به‌عنوان عضوی از مسیر پیام‌رسانی متعارف Wnt در کنترل بیان عده‌ای از ژن‌های مهم سلولی عمل می‌کند. مسیره‌های پیام‌رسانی از طریق پروتئین‌های G سه زیرواحدی (trimeric G proteins) در تنظیم فعالیت پروتئین <math>\beta</math>-Catenin نقش مهمی دارند. گیرنده هورمون کلسیتونین (calcitonin receptor) یکی از این گیرنده‌ها است و در این پژوهش اثر بیان و فعالیت این گیرنده بر عملکرد ژنتیکی پروتئین <math>\beta</math>-Catenin مورد مطالعه قرار گرفته است. <b>مواد و روش‌ها:</b> در این مطالعه از آزمایشات کشت سلول‌های HEK-293T و ترانسفکشن آنها با روش فسفات کلسیم استفاده شد. اندازه‌گیری بیان ژنتیکی در سطح رونویسی توسط روش‌های Reverse Transcriptase-PCR کمی و real-time PCR انجام گردید. از ژن لوسیفراز تحت کنترل نواحی قابل شناسایی پروتئین <math>\beta</math>-Catenin به‌عنوان ژن گزارش‌گر و ژن‌های <i>CCND1</i> و <i>FGF20</i>، <i>c-MYC</i> به‌عنوان ژن‌های سلولی مورد هدف پروتئین <math>\beta</math>-Catenin استفاده شد. <b>نتایج:</b> نتایج این مطالعه نشان دادند که بیان گیرنده کلسیتونین در سلول‌های HEK-293T و نیز در معرض قرار دادن این سلول‌ها با هورمون کلسیتونین باعث افزایش بیان ژن گزارش‌گر لوسیفراز و نیز ژن‌های انتخابی بومی سلول که تحت کنترل پروتئین <math>\beta</math>-Catenin هستند می‌شود. <b>نتیجه‌گیری:</b> با توجه به نقش انکوژنیک <math>\beta</math>-Catenin در بسیاری از سرطان‌های انسانی می‌توان گیرنده کلسیتونین و مسیر پیام‌رسانی وابسته به آن را در مطالعات کلینیکی در نظر داشت.</p>	<p>گیرنده کلسیتونین پروتئین <math>\beta</math>-Catenin پروتئین‌های G سه زیرواحدی گیرنده‌های GPCR</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳</p>

### ۱- مقدمه

پروتئین  $\beta$ -Catenin یکی از شناخته شده‌ترین پروتوانکوژن‌های سلولی است که فعالیت غیر طبیعی آن در طیف بزرگی از سرطان‌های انسانی مانند سرطان روده بزرگ-ملانوما-سرطان پانکراس و سرطان تخمدان دیده شده است (۱-۳). به‌همین دلیل پروتئین  $\beta$ -Catenin یکی از اهداف بالقوه مولکولی به‌منظور پیشگیری و درمان عده‌ای از سرطان‌های انسانی شناخته شده

است (۴-۱). اگر چه پروتئین  $\beta$ -Catenin ابتدا به‌عنوان یک عضو مرکزی مسیر پیام رسانی Wnt معرفی شد با این حال مطالعات متعددی نشان داده‌اند که این پروتئین می‌تواند توسط چندین مسیر پیام رسانی از جمله مسیرهای پیام رسانی از طریق گیرنده‌های تیروزین کیناز و گیرنده‌های پروتئین‌های G (GPCR, G protein-coupled receptors) تحت کنترل قرار بگیرد (۴-۶). این موضوع نیز بسیار محتمل است که کنترل فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin توسط این مسیرهای پیام رسانی حاصل ارتباط تنگاتنگ و شبکه‌ای این مسیرهای پیام رسانی باشد. نتایج آزمایشگاه ما و نیز نتایج به‌دست آمده توسط گروه‌های دیگر پژوهشی نشان داده‌اند که فعالیت اعضای مختلف خانواده زیر واحد آلفای پروتئین‌های G می‌توانند بیان و فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin را از طریق ساز و کارهای مختلف تحت تاثیر قرار دهند (۵، ۱۲-۷). برای مثال مطالعات ما با استفاده از چندین مدل سلولی نشان داده‌اند که مسیر پیام رسانی از طریق زیر واحد  $G\alpha_q$  می‌تواند فعالیت آنزیم  $GSK-3\beta$  را کاهش داده و بنابراین باعث افزایش پایداری پروتئین  $\beta$ -Catenin در سلول شود (۵، ۷). این موضوع این فرضیه را مطرح کرد که مسیر پیام‌رسانی  $G\alpha_q$  می‌تواند به‌طور مثبتی فعالیت مسیر پیام رسانی متعارف Wnt را تحت تاثیر قرار دهد.

گیرنده‌های پروتئین‌های G (GPCR) خانواده بسیار بزرگی از گیرنده‌های سطح سلولی هستند که حدود هزار عدد از این نوع گیرنده‌ها توسط ژنوم انسان و سایر پستانداران کد می‌شوند (۱۳، ۱۴). اکثر این گیرنده‌ها دارای ساختار فضایی شبیه به‌هم بوده و دارای هفت ناحیه آب‌گریز داخل غشایی هستند. مسیرهای پیام‌رسانی از طریق این گیرنده‌ها تقریباً در کنترل تمام فعالیت‌های سلولی از جمله حواس پنج‌گانه شرکت می‌کنند و تخمین زده می‌شود که بیش از ۳۰ درصد داروهای مورد استفاده در پزشکی و کلینیک این گیرنده‌ها را هدف قرار می‌دهند (۱۳، ۱۴). تنظیم بیان و فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin توسط پروتئین‌های G و گیرنده‌های مربوط به آن‌ها این سوال جالب را مطرح می‌کند که آیا به‌جای هدف قرار دادن مستقیم پروتئین  $\beta$ -Catenin در سلول‌های سرطانی آیا می‌توان از داروها و ترکیباتی که گیرنده‌های پروتئین‌های G را تحت تاثیر قرار می‌دهند استفاده نمود.

گیرنده کلسیتونین یکی از اعضای خانواده گیرنده‌های GPCR می‌باشد (زیر خانواده B1) که از طریق زیرواحد های آلفا از نوع q و s پیام‌های خود را به سلول منتقل می‌کند (۱۵). این زیر واحدهای آلفا به‌ترتیب از فعال کننده آنزیم‌های فسفولیپاز C و آدنیلات سیکلاز هستند (۱۵). لیگاند گیرنده کلسیتونین یک پپتید ۳۲ اسید آمینه ای به‌نام کلسیتونین است که توسط عده ای از بافت‌های بدن مانند تیروئید پروستات و سیستم عصبی مرکزی تولید می‌شود (۱۶، ۱۷). مسیر پیام رسانی از طریق گیرنده کلسیتونین اعمال زیستی مهمی را در بسیاری از بافت‌ها کنترل می‌کند. برای مثال در بافت استخوان این مسیر پیام رسانی در بلوغ سلول‌های استئوکلاست و هومئوستازی بافت استخوان نقش مهمی دارد (۱۶، ۱۷).

نظر به این‌که نتایج مطالعات قبلی ما حاکی از نقش مثبت فعالیت زیر واحدهای آلفای s و q در فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin است سوال این مطالعه این است که آیا بیان و فعالیت گیرنده کلسیتونین تاثیری بر فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin دارد یا خیر.

## ۲- مواد و روش‌ها

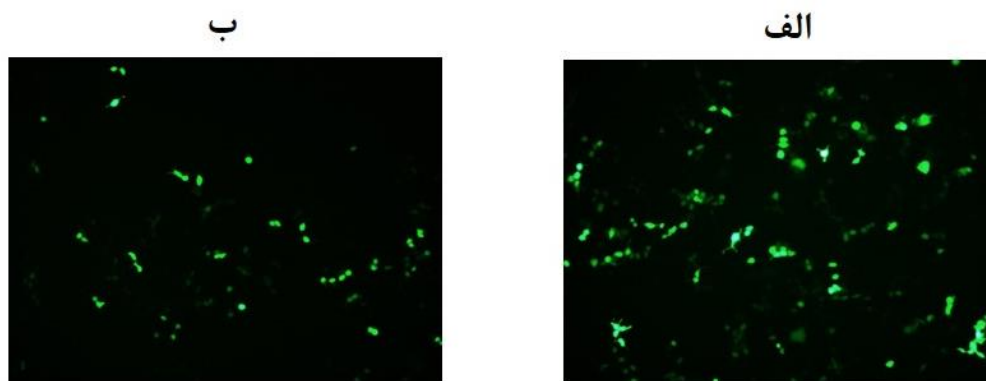
**پلاسمید های مورد استفاده در این مطالعه:** cDNA ژن کد کننده پروتئین گیرنده کلسیتونین (CTR) در پلاسمید  $pCS2^+$  کلون شده بود. پلاسمید pCMV حاوی ژن کدکننده پروتئین GFP و پلاسمید ژن گزارشگر لوسیفراز (*luciferase*) حاوی نواحی پرموتری قابل شناسایی پروتئین  $\beta$ -Catenin هدایابی از آزمایشگاه دکتر Peter Klein از دانشگاه پنسیلوانیا آمریکا بود. در پلاسمید گزارشگر-ژن لوسیفراز (*firefly luciferase*) تحت کنترل بخشی از ناحیه تنظیمی کمپلکس پروتئینی حاوی  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Catenin/TCF-LEF) است. این پلاسمید یکی از شناخته شده‌ترین سازه‌های ژنتیکی است که برای ارزیابی

فعالیت رونویسی پروتئین  $\beta$ -Catenin مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸). از پلاسمید pCMV غیر نوترکیب به‌عنوان پلاسمید کنترل به‌منظور یکسان سازی مقادیر پلاسمید در آزمایشات ترانسفکشن استفاده شد. کلسیتونین مورد استفاده در این مطالعه از نوع کلسیتونین سالمون بود و توسط شرکت داروسازی ابوریحان تهیه شده بود (شماره ثبت دارو: ۱۲۲۸۱۰۳۳۲۲).

**تکثیر و تخلیص پلاسمید:** مراحل ورود پلاسمید به درون سلول‌های باکتری (transformation) و تهیه سلول‌های شایسته (competent cells) به‌منظور تکثیر پلاسمیدها با استفاده از روش‌های استاندارد زیست‌شناسی مولکولی صورت گرفت (۱۹). از باکتری اشرشیا کولی (*E. coli*) سویه *DH5a* بدین منظور استفاده شد. استخراج پلاسمید از باکتری‌های *E. coli* سویه *DH5a* که ترانسفورم شده بودند با استفاده از کیت استخراج پلاسمید BioFact (کره جنوبی) با استفاده از روش توضیح داده شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. غلظت و خلوص پلاسمید توسط روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

**کشت و ترانسفکشن سلول‌های HEK293T** این سلول‌ها در شرایط استاندارد کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن ( $CO_2$ ) در محیط DMEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (Fetal Bovine Serum, FBS) و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) رشد داده شدند. بعد از رسیدن به ۶۰ درصد تراکم سلولی محیط سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد و دو ساعت بعد سلول‌ها با مقادیر مناسب از پلاسمیدهای مورد استفاده ترانسفکت شدند. یک روش استاندارد فسفات کلسیم برای ترانسفکشن سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۷). ۶ ساعت بعد از ترانسفکشن محیط سلول‌ها تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد سلول‌ها برداشت شدند. رسوب سلولی یا همان زمان مورد استفاده قرار گرفت و یا در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مورد استفاده نگهداری شد. کارایی ترانسفکشن سلول‌ها با استفاده از ترانسفکشن آن‌ها توسط پلاسمید کدکننده پروتئین (Green Fluorescent Protein) GFP و استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد ارزیابی گرفت (شکل ۱).

#### (ارزیابی ترانسفکشن سلول‌های HEK293T)



شکل ۱: ترانسفکشن سلول‌های HEK293T با پلاسمید رمزگذار GFP. سلول‌ها طبق روش توضیح داده شده در قسمت "مواد و روش‌ها" با پلاسمید رمزگذار GFP ترانسفکت شدند و بعد از ۴۸ ساعت توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. در شکل‌های "الف" و "ب" سلول‌ها به‌ترتیب با ۱ µg و ۳۰۰ ng از پلاسمید GFP ترانسفکت شده‌اند. به‌کار گرفتن مقدار ۱ µg پلاسمید در یک خانه از ظروف کشت سلول ۶ خانه‌ای با ۷۰ درصد تراکم سلولی بطور تقریبی منجر به ترانسفکشن ۵۰ درصد از سلول‌ها شد (بزرگنمایی  $\times 200$ ).

**استخراج RNA سلولی و آزمایشات Real-time PCR** سلولها ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن توسط محلول Trypsin/EDTA برداشت شدند. این محلول شامل ۵۳ صدم میلی مولار EDTA و ۵ صدم درصد تریپسین در بافر PBS (phosphate-buffered saline) تهیه شد. سلولها بعد از برداشت دو بار توسط بافر PBS سرد شستشو داده شدند. سپس RNA تام سلولی توسط کیت RNX-plus (سیناژن. تهران-ایران) طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت و خلوص RNA توسط دستگاه اسپکترومتر نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ساخت cDNA از کیت شرکت Bio Fact (کره جنوبی) استفاده شد. این کیت شامل محلول 2X RT Pre-Mix است که حاوی تمامی مواد لازم برای ساخت cDNA غیر از پرایمر random hexamer می باشد. تمامی مراحل ساخت cDNA روی ظرف یخ در دمای ۴-۰ درجه سانتی گراد انجام شد. ۵ میکرولیتر از نمونه RNA را با ۱۰ میکرولیتر از محلول سنتز cDNA مخلوط کرده و سپس ۱ میکرولیتر پرایمر random hexamer به آن افزوده و حجم مواد با استفاده از آب تیمار شده با DEPC (diethylpyrocarbonate) به ۱۵ میکرولیتر رسید. با افزودن مقدار مناسب بافر PCR و ۰/۴ میکرومولار از پرایمرهای پیش رو و پس رو در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر ساخت cDNA انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ مشخص شده اند. روش انجام RT-PCR کمی قبلا توضیح داده شده است (۷). آزمایشات Real-time PCR با استفاده از روش استاندارد سایبرگرین انجام گرفتند (مستر میکس RealQ Plus 2x Master Mix Green ساخت شرکت امپلیکون دانمارک خریداری شده از شرکت زیست فناوری پیشگام. تهران-ایران). در این آزمایشات پس از محاسبه مقادیر Ct برای ژنهای هدف و کنترل داخلی، برای پردازش اطلاعات از نرم افزار REST استفاده شد. مراحل PCR برای ۶ ژن نامبرده در جدول ۱ یکسان بوده و شامل یک مرحله پیش دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۱ دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه ۲ اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه و ۳ گسترش (پلیمریزاسیون) در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه بود.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای آزمایشات Real-time PCR. F: پرایمر پیش رو. R: پرایمر پس رو.

نام ژن	NCBI Gene ID	توالی پرایمر (از ۵' به ۳')	طول محصول واکنش
<b>GAPDH</b>	2597	F: AAG GTG AAG GTC GGA GTC AAC R: GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A	۱۰۲
<b>CyclinD1</b>	595	F: GAG GGT TGT GCT ACA GAT GA R: CGC CTC CTT TGT GTT AAT GC	۱۱۱
<b>FGF20</b>	26281	F: GGG ACT GGT CAGTAT TAG AGG T R: CTC TTG GAG TTC CGT CTT TGT T	۲۱۵
<b>c-Myc</b>	4609	F: GGC TCC TGG CAA AAG GTC A R: AGT TGT GCT GAT GTG TGG AGA	۱۱۳
<b>Luciferase</b>	160793	F: CTC ATA GAA CTG CCT GCG TG R: GGC GAA GAA GGA GAA TAG GG	۲۵۶
<b>CTR</b>	799	F: CCA ACA ATA GAG CCC AAG CC R: CAG CCA TCC ATC CCA GGT G	۱۴۷

### ۳- آنالیز آماری داده ها

نمودارها با استفاده از نرم افزار Prism تهیه شدند. معنی داری نتایج با روش One Way Anova و آزمایش Dunnett's multiple comparison محاسبه شد.

## ۴- نتایج

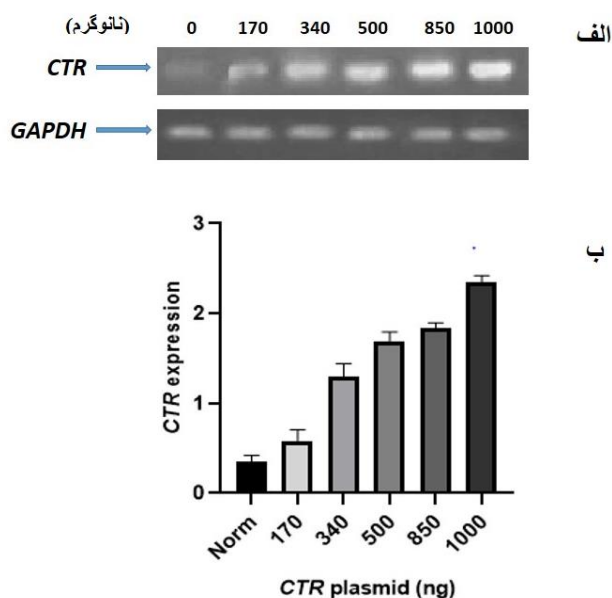
## ارزیابی ترنسفکشن سلول‌های HEK293

به منظور بررسی قابلیت ترنسفکشن سلول‌های HEK293T، از پلاسمید رمز گذار پروتئین (Green Fluorescent) GFP (Protein) استفاده شد. این پروتئین خاصیت فلورسنت دارد و بنابراین بیان آن در سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با آسانی قابل ارزیابی است. نتایج این آزمایشات در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده این بود که سلول‌های HEK293T با روش فسفات کلسیم بخوبی ترنسفکت می‌شوند.

## بیان ژن CTR در سلول‌های HEK293T

برای بررسی بیان ژن CTR (رمز گذار گیرنده کلسیتونین) در سلول‌های HEK293T این سلول‌ها در ظروف ۱۲ خانه ای توسط مقادیر ۱۷۰، ۳۴۰، ۵۰۰، ۸۵۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید حاوی ژن CTR ترنسفکت شدند و بعد از ۴۸ ساعت RNA تام سلول‌ها استخراج شد و با استفاده از روش RT-PCR کمی مقدار بیان ژن CTR مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، از سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور خالی (غیر نو ترکیب) برای بررسی بیان بومی ژن CTR در سلول‌های HEK293T استفاده شد. همچنین برای کنترل مثبت PCR و کمی سازی نتایج از ژن GAPDH استفاده شد. محصولات PCR بعد از سوار شدن روی ژل آگارز توسط نرم افزار Image J و Prism8 مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). نتایج نشان داد که سلول‌های HEK293T ژن CTR را به طور بومی بیان می‌کنند. ترنسفکشن سلول‌ها با مقادیر افزایشی پلاسمید CTR منجر به افزایش تدریجی بیان این ژن در سلول‌ها شد (شکل ۲).

(بیان گیرنده کلسیتونین در سلول‌های HEK293T)



شکل ۲: بیان ژن CTR در سلول‌های HEK293T. سلول‌ها با مقادیر ۱۷۰، ۳۴۰، ۵۰۰، ۸۵۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید رمز گذار ژن CTR ترانسفکت شده و بعد از ۴۸ ساعت مورد آزمایش RT-PCR کمی قرار گرفتند. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل و به منظور کمی سازی نتایج استفاده شد. بعد از سوار کردن حجم یکسانی از محصولات PCR در ژل آگارز (الف) نتایج به دست آمده توسط روش توضیح داده شده در بخش "مواد و روش‌ها" کمی شدند که به صورت نمودار در شکل نشان داده شده است (ب). نمودار نشان داده شده متوسط دو آزمایش متفاوت است. سلول‌های کنترل (Norm) با ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید غیر نو ترکیب ترنسفکت شده‌اند.

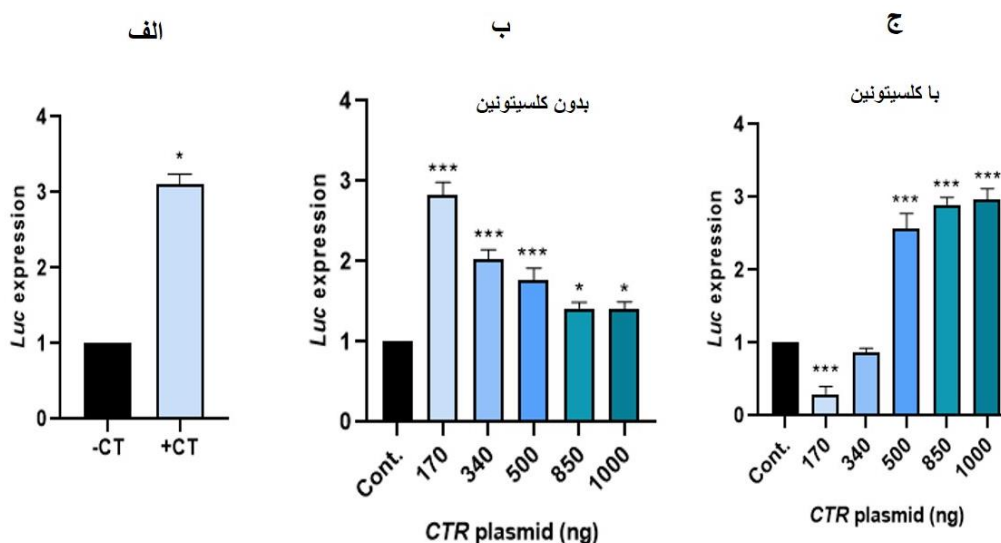
### تأثیر بیان گیرنده کلسیتونین بر فعالیت رونویسی پروتئین $\beta$ -Catenin

به منظور مطالعه نقش فعالیت گیرنده کلسیتونین بر عملکرد رونویسی پروتئین  $\beta$ -Catenin ابتدا از پلاسمید Topflash استفاده شد (۱۸). سلول‌ها بعد از ترنسفکشن با پلاسمید Topflash تنها در معرض هورمون کلسیتونین استخراج شده از سالمون (۰/۵ U/ml) قرار گرفته و سپس بیان ژن لوسیفراز توسط آزمایشات real-time PCR مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۳ الف). تیمار سلول‌های HEK293T ترانسفکت شده با پلاسمید Topflash با هورمون کلسیتونین منجر به افزایش تقریبی سه برابری در بیان ژن لوسیفراز شد (شکل ۳ الف).

در مرحله بعد سلول‌های HEK293T با پلاسمید رمز گذار گیرنده کلسیتونین (پلاسمید CTR) ترانسفکت شدند تا اثرات بیان اگزوژنیک گیرنده کلسیتونین بر عملکرد رونویسی پروتئین  $\beta$ -Catenin مورد مطالعه قرار گرفته باشد (شکل ۳ ب و ج). ابتدا سلول‌ها تنها با پلاسمید رمز گذار گیرنده کلسیتونین (پلاسمید CTR) ترانسفکت شدند و در مرحله بعد سلول‌ها علاوه بر ترانسفکت شدن با پلاسمید رمز گذار گیرنده کلسیتونین در معرض هورمون کلسیتونین نیز قرار گرفتند. بعلاوه در دسترس نبودن مواد و تجهیزات لازم برای ارزیابی فعالیت آنزیمی پروتئین لوسیفراز از آزمایشات real-time PCR به منظور ارزیابی بیان این ژن استفاده شد. سلول‌ها با پنج (۵) مقدار افزایشی از پلاسمید رمز گذار ژن کلسیتونین (CTR) ترانسفکت شدند. نتایج نشان دادند که در سلول‌های HEK293T کنترل (سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید غیر نوترکیب)، پروتئین  $\beta$ -Catenin موجود در سلول، می‌تواند با فاکتور TCF/Lef کمپلکس تشکیل داده و ژن لوسیفراز را فعال کند و در نتیجه بیان پایه ای از ژن لوسیفراز در این سلول‌ها قابل تشخیص بود. گرچه در سلول‌های ترانسفکت شده با مقادیر مختلف پلاسمید حاوی ژن CTR (۱۷۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم)، بیان ژن *Luciferase* نسبت به سلول‌های کنترل افزایش نشان می‌داد (که نشان دهنده نقش مثبت بیان این گیرنده در فعالیت رونویسی و هسته ای پروتئین  $\beta$ -Catenin است) با اینحال مشاهده جالب در این آزمایشات این بود که افزایش تدریجی بیان گیرنده کلسیتونین (در عدم حضور هورمون کلسیتونین) با کاهش تدریجی بیان ژن *Luciferase* همراه بود (شکل ۳ ب). یکی از دلایل احتمالی این مشاهده می‌تواند این باشد که افزایش غیر طبیعی بیان گیرنده کلسیتونین در سلول با تشکیل تجمعات پروتئینی این گیرنده (protein aggregation) و در نتیجه کاهش فعالیت عمومی این گیرنده در سلول همراه است.

در سری دوم این آزمایشات، سلول‌های HEK293T علاوه بر ترانسفکت شدن با مقادیر افزایشی پلاسمید CTR به مدت ۵ ساعت در معرض هورمون کلسیتونین (۰/۵ U/ml) نیز قرار گرفتند. به‌عنوان کنترل از سلول‌هایی استفاده شد که تنها با پلاسمید Topflash ترانسفکت شده و با هورمون کلسیتونین تیمار شده بودند. این سری از آزمایشات نتایج جالبی را نشان دادند. سلول‌های HEK293T که مقدار ۱۷۰ ng از ژن CTR را دریافت کردند در مقایسه با سلول‌های کنترل، کاهش قابل توجهی را در بیان ژن *Luciferase* نشان دادند اما در سلول‌هایی که بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید CTR ترانسفکت شده بودند بیان ژن *Luciferase* نسبت به سلول‌های کنترل افزایش قابل ملاحظه ای (تا ۳ برابر) نشان داد (شکل ۳ ج).

(اثر فعالیت گیرنده کلسیتونین بر عملکرد پروتئین  $\beta$ -Catenin با سنجش بیان ژن گزارشگر لوسیفراز)



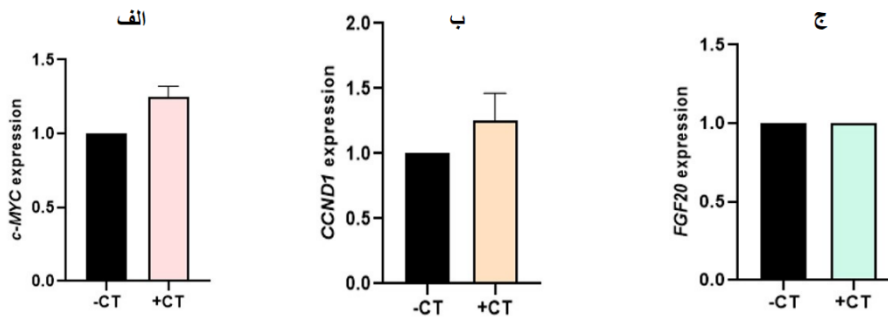
شکل ۳: نتایج آزمایشات real time-PCR به منظور بررسی بیان ژن *Luciferase* در سلول‌های HEK293T ترانسفکت شده با پلاسمید ژن *CTR*. الف) سلول‌ها با پلاسمید حاوی ژن گزارشگر لوسیفراز (*Topflash*) ترانسفکت شدند و بعد از ۴۸ ساعت برداشت شده و طبق روش توضیح داده شده در قسمت "مواد و روش‌ها" بیان ژن لوسیفراز توسط آزمایشات real-time PCR مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (CT-). سلول‌های CT+ ۵ ساعت قبل از برداشت در معرض هورمون کلسیتونین ( $0/5 \mu\text{M}$ ) نیز قرار گرفته‌اند. ب) سلول‌ها علاوه بر پلاسمید *Topflash* با مقادیر افزایشی از پلاسمید رمز گذار ژن کلسیتونین (*CTR*) نیز ترانسفکت شدند و بعد از ۴۸ ساعت برداشت شده و توسط آزمایشات real-time PCR به منظور اندازه‌گیری بیان ژن لوسیفراز (*luc*) مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های کنترل (*Cont*) علاوه بر پلاسمید *Topflash* با ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید غیر نوترکیب ترانسفکت شده‌اند. ج) سلول‌ها همانند شکل "ب" ترانسفکت شده‌اند با این تفاوت که ۵ ساعت قبل از برداشت تحت تیمار با هورمون کلسیتونین نیز قرار گرفته‌اند ( $p \leq 0.001$ ، \*\*\* سطح معنی‌داری هر ستون نسبت به ستون کنترل سنجیده شده است).

### تأثیر بیان گیرنده کلسیتونین بر فعالیت رونویسی پروتئین $\beta$ -Catenin در بیان ژن‌های *c-MYC* و *FGF20* و *CCND1*

در مرحله بعد به منظور ارزیابی تأثیر فعالیت گیرنده کلسیتونین بر عملکرد رونویسی پروتئین  $\beta$ -Catenin از اندازه‌گیری بیان چند ژن هدف بومی این پروتئین استفاده شد. تا به حال عده‌ای از این ژن‌ها شناسایی شده‌اند که اکثر آن‌ها نقش بسیار کلیدی در کنترل فرآیندهای متفاوت سلولی دارند. از میان ژن‌های هدف مسیر پیام‌رسانی *Wnt*/ $\beta$ -Catenin ژن‌های *c-MYC*، *FGF20* و *CCND1* انتخاب شدند (۲۰-۲۲). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بیان هر سه این ژن‌ها می‌تواند به صورت مستقیم توسط مسیر پیام‌رسانی *Wnt*/ $\beta$ -Catenin کنترل شود (۱-۴).

ابتدا سلول‌های HEK293T تنها با هورمون کلسیتونین تیمار شدند و تأثیر این تیمار بر بیان ژن‌های *c-MYC*، *FGF20* و *CCND1* مورد آزمایش قرار گرفت (شکل ۴).

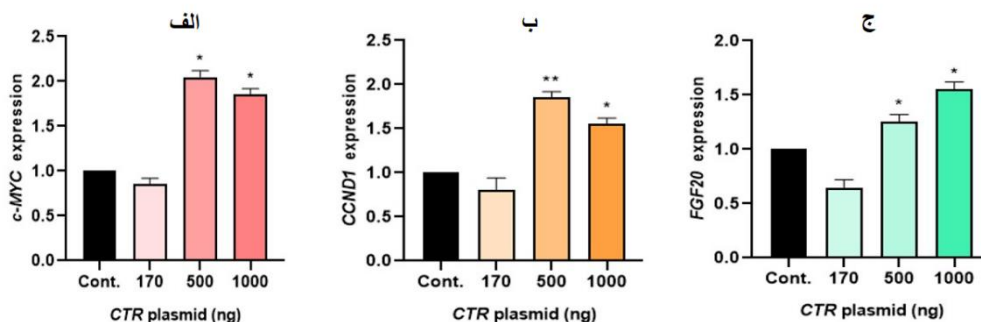
(اثر هورمون کلسیتونین بر بیان سه ژن هدف پروتئین  $\beta$ -Catenin)



شکل ۴: نتایج آزمایشات Real time-PCR به منظور مقایسه بیان ژن های *c-Myc*، *CCND1* و *FGF20* (الف تا ج) در سلول های HEK293T تیمار شده (CT+) و تیمار نشده با هورمون کلسیتونین (CT-).

تحت این تیمار بیان ژن های *c-MYC* و *CCND1* تنها اندکی (حدود ۲۰ درصد) افزایش یافت در حالی که بیان ژن *FGF20* تغییری نشان نداد. این افزایش ناچیز می تواند مربوط به حضور مقادیر کم و فیزیولوژیک مسیر پیام رسانی گیرنده کلسیتونین در سلول های HEK293T باشد. سپس این سلول ها توسط مقادیر ۱۷۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید ژن *CTR*، ترنسفکت شدند و قبل از برداشت به مدت ۵ ساعت توسط هورمون کلسیتونین نیز تیمار شدند (۰/۵/ml محیط کشت). به عنوان کنترل در این آزمایش از سلول های HEK293T ترنسفکت شده با وکتور خالی (غیر نوترکیب) و تیمار شده با هورمون کلسیتونین استفاده شد. در نهایت پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، آزمایشات Real time-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن انجام شد. نتایج این آزمایشات در شکل ۵ نشان داده شده است. ترنسفکشن سلول ها با مقدار ۱۷۰ نانوگرم از پلاسمید ژن *CTR* باعث عدم تغییر و یا کاهش مختصر (بدون معنی از نظر آماری) در بیان ژن های *c-MYC*، *FGF20* و *CCND1* شد ولی افزودن میزان پلاسمید (۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم) باعث افزایش قابل ملاحظه در بیان این ژن ها شد که نشان دهنده آن است که مسیر پیام رسانی از طریق گیرنده کلسیتونین قادر به افزایش فعالیت بیان ژنتیکی پروتئین  $\beta$ -Catenin است (شکل ۵).

(اثر فعالیت گیرنده کلسیتونین بر بیان سه ژن هدف پروتئین  $\beta$ -Catenin)



شکل ۵: نتایج آزمایشات Real time-PCR به منظور مقایسه بیان ژن های *c-Myc*، *CCND1* و *FGF20* (الف تا ج) در سلول های HEK293T ترنسفکت شده با سه مقدار افزایشی از پلاسمید رمز گذار ژن گیرنده کلسیتونین (*CTR*). سلول های فوق قبل از برداشت به مدت ۵ ساعت با هورمون کلسیتونین نیز تیمار شده اند (۰/۵/ml). سلول های کنترل (Cont) با ۱۰۰۰ نانوگرم از پلاسمید غیر نوترکیب ترنسفکت شده اند (p ≤ 0.05، \*، p ≤ 0.01، \*\* سطح معنی داری هر ستون نسبت به ستون کنترل سنجیده شده است).

## ۴- بحث

در این مطالعه ارتباط فعالیت گیرنده کلسیتونین با عملکرد پروتئین  $\beta$ -Catenin به‌عنوان یک عامل تنظیم کننده بیان ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین  $\beta$ -Catenin یک عامل کلیدی در تنظیم مسیر پیام رسانی متعارف Wnt signaling محسوب می‌شود. این مسیر پیام‌رسانی در بسیاری از فعالیت‌های سلولی مانند رشد، تکثیر و تمایز نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند (۱-۴). پروتئین  $\beta$ -Catenin فعال شده توسط این مسیر پیام‌رسانی، موجب بیان ژن‌های درگیر در رشد و تکثیر سلولی می‌شود و بنابراین عدم تنظیم فعالیت این پروتئین می‌تواند به بروز عده‌ای از بیماری‌ها خصوصاً بعضی از بیماری‌های سرطان منجر شود (۱-۴). در این مطالعه از میان ژن‌های سلولی و مورد هدف مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -Catenin ژن‌های *c-MYC*، *FGF20* و *CCND1* انتخاب شدند (۲۰-۲۲). ژن *c-MYC* یکی از پروتوآنکوژن‌های مهم سلولی است و فاکتور رونویسی *c-MYC* را کد می‌کند که این فاکتور در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای مختلف سلولی مانند رشد سلول، سنتز DNA و مرگ سلول نقش مهمی دارد (۲۱). ژن *FGF20* پروتئین *FGF20* را بیان می‌کند که یکی از اعضای خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGF) می‌باشد که این فاکتورها در تکثیر و بقای سلولی نقش مهمی دارند (۲۲). ژن *CCND1* پروتئین *CyclinD1* را کد می‌کند که این پروتئین در کنترل عبور چرخه سلولی از مرحله G1 به مرحله S نقش بسیار مهمی دارد (۲۰).

گیرنده کلسیتونین عضوی از خانواده گیرنده‌های GPCR (G protein-coupled receptor) بوده و با اتصال هورمون کلسیتونین به آن، مسیرهای پیام‌رسانی را از طریق پروتئین‌های *Gaq* و *Gas* در سلول فعال می‌کند (۱۵). پروتئین‌های *Gaq* و *Gas* به ترتیب از فعال کننده‌های آنزیم‌های فسفولیپاز C و آدنیلات سیکلاز محسوب می‌شوند. عدم تنظیم مسیر پیام‌رسانی کلسیتونین نیز در انواعی از بیماری‌های مختلف مانند پوکی استخوان، پازه و انواع سرطان‌ها مشاهده شده است (۱۶، ۱۷).

مطالعات قبلی ما و دانشمندان دیگر نشان داده است که عده‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی از طریق G-پروتئین‌های سه زیر واحدی (heterotrimeric G-proteins) در کنترل بیان و عملکرد پروتئین  $\beta$ -Catenin نقش مهمی دارند (۷-۱۲). نظر به این که گیرنده کلسیتونین نیز یک GPCR است و منجر به فعالیت پروتئین‌های G می‌شود در این مطالعه ارتباط فعالیت گیرنده کلسیتونین (CTR) بر عملکرد پروتئین  $\beta$ -Catenin مورد مطالعه قرار گرفت. در شروع بررسی رونویسی تعدادی از ژن‌های هدف پروتئین  $\beta$ -Catenin شامل ژن‌های *c-Myc*، *CCND1* و *FGF20* پیشنهاد شد اما به دلیل اینکه بیان ژن‌های انتخاب شده تنها تحت تاثیر مسیر متعارف Wnt signaling نیستند و تعدادی از مسیرهای پیام‌رسانی دیگر نیز در تنظیم بیان آن‌ها نقش دارند، ابتدا به منظور بررسی مستقیم اثر پروتئین  $\beta$ -Catenin در تنظیم بیان ژنتیکی از ژن گزارشگر *Luciferase* استفاده شد. پروموتور استفاده شده دارای ۳ توالی اختصاصی برای اتصال فاکتور رونویسی TCF/LEF است و بنابراین پروتئین  $\beta$ -Catenin با اتصال به این فاکتورها می‌تواند به پروموتور ژن *Luciferase* متصل شده و موجب بیان آن در سلول شود (۱۸). نتایج به دست آمده از تاثیر بیان گیرنده کلسیتونین بر فعالیت ژنتیکی پروتئین  $\beta$ -Catenin الگوی یکسانی به دنبال داشتند و بیانگر این بودند که مسیر پیام‌رسانی گیرنده کلسیتونین به نوعی باعث تحریک فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin می‌شود.

نتایج این مطالعه همچنین نشان دادند که سلول‌های HEK293T به‌طور بومی دارای گیرنده کلسیتونین هستند و این گیرنده را تا غلظت فیزیولوژیک بیان می‌کنند. این یافته باعث آن شد که بتوان این سلول‌ها را بدون ترانسفکشن بیشتر با پلاسمید کد کننده گیرنده کلسیتونین تحت تاثیر هورمون کلسیتونین قرار داد و تاثیر این تیمار را بر بیان ژن‌های هدف پروتئین  $\beta$ -Catenin

مورد مطالعه قرار داد. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است تیمار سلول‌ها با هورمون کلسیتونین تا سه برابر بیان ژن گزارش گر لوسیفراز را افزایش داد. بیان ژن‌های بومی خیلی تحت تاثیر تیمار با کلسیتونین قرار نگرفتند به طوری که بیان ژن‌های *c-Myc* و *CCND1* تنها ۲۰٪ افزایش یافت و بیان ژن *FGF20* تغییری نشان نداد. نظر به این که به احتمال زیاد بیان چنین ژن‌های مهمی در سلول تحت کنترل دقیقی هستند تنها تیمار سلول‌های HEK293T با هورمون کلسیتونین آن چنان سیگنال پر قدرتی در سلول ایجاد نمی‌کند که بیان این ژن‌های مهم به میزان قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر قرار بگیرند. تجربیات قبلی ما نشان داده اند که از میان ژن‌های *c-Myc*، *CCND1* و *FGF20* بیان ژن *FGF20* با مقاومت بیشتری تحت تاثیر سیگنال‌های محرک تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۷).

همانطور که در بالا ذکر شد الگوی بیان ژنتیکی ژن گزارشگر لوسیفراز و ژن‌های بومی تحت کنترل مجموعه پروتئینی  $\beta$ -Catenin/TCF/LEF در اثر فعالیت گیرنده کلسیتونین بسیار به یکدیگر شباهت داشت که این نکته مثبتی در حمایت از مناسب بودن ژن‌های مورد استفاده در مطالعه فوق است. مشاهده جالبی که در نتایج نشان داده شده در شکل ۳ وجود دارد این است که تحریک بیان ژنتیکی ژن *Luciferase* در طی افزایش بیان گیرنده کلسیتونین در حضور و عدم حضور هورمون کلسیتونین با یکدیگر متفاوت بود. در عدم حضور هورمون کلسیتونین هنگامی که از ۱۷۰ نانوگرم پلاسمید برای ترنسفکشن استفاده شد، میزان بیان ژن *Luciferase* به مقدار زیاد و معنی داری نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت (تا ۳ برابر) و افزایش بیشتر مقدار پلاسمید برخلاف انتظار نه فقط میزان بیان لوسیفراز را افزایش نداد بلکه باعث کاهش بیان این ژن نیز شد (مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم پلاسمید کلسیتونین تنها باعث افزایش بیان لوسیفراز تا ۵۰ درصد شد). این احتمال وجود دارد که افزایش مقدار پلاسمید گیرنده کلسیتونین و افزایش بیان این پروتئین منجر به تشکیل تجمعات پروتئینی (aggregate) شده باشد که در مجموع باعث کاهش فعالیت این گیرنده در سلول می‌شود. به علاوه این امکان نیز وجود دارد که با افزایش مسیر پیام رسانی مرتبط با گیرنده کلسیتونین، تنظیم‌کننده‌های منفی این مسیر وارد عمل می‌شوند و در نتیجه فعالیت این مسیر پیام رسانی را کاهش می‌دهند.

در ادامه آزمایشات real time-PCR سلول‌ها طبق شرایط بالا با پلاسمیدهای گفته شده ترنسفکت شدند و به علاوه توسط هورمون کلسیتونین سالمون به مدت ۵ ساعت نیز تیمار شدند (۵ u/ml در محیط کشت). به عنوان کنترل در این آزمایش‌ها از سلول‌هایی استفاده شد که توسط وکتور غیر نو ترکیب و پلاسمید ژن *Luciferase* ترنسفکت شده و همچنین به مدت ۵ ساعت با هورمون کلسیتونین تیمار شده بودند. نتایج نشان داد که هنگامی که مقدار ۱۷۰ نانوگرم از پلاسمید گیرنده کلسیتونین برای ترنسفکت استفاده شد و سلول‌ها در معرض هورمون کلسیتونین نیز قرار گرفتند، مقدار بیان ژن *Luciferase* نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت گرچه این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود. در صورت واقعی بودن این کاهش یک احتمال برای این مشاهده می‌تواند این باشد که گیرنده کلسیتونین اگزوزن بیان شده در سلول‌ها در مقایسه با گیرنده کلسیتونین بومی سلول فعالیت ضعیف تری دارد و در نتیجه گیرنده‌های اضافی بیان شده بخش مهمی از هورمون کلسیتونین را درگیر کرده و از دسترسی هورمون به گیرنده‌های بومی سلول جلوگیری می‌کنند و در نتیجه مانع از عملکرد و فعالیت آن‌ها می‌شوند و در نتیجه بیان ژن *Luciferase* در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل کاهش می‌یابد. با افزایش مقدار پلاسمید گیرنده کلسیتونین (۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم)، مقدار بیان ژن *Luciferase* نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. در این حالت احتمالاً مجموع فعالیت گیرنده‌های اگزوزن از فعالیت گیرنده‌های بومی پیشی می‌گیرد. این که وجود هورمون کلسیتونین باعث می‌شود تا تجمعات احتمالی مولکول‌های گیرنده (aggregation) رخ ندهد نیز موضوعی است که جای تامل دارد.

نتایج قبلی ما نشان داده‌اند که مسیرهای پیام‌رسانی از طریق G-پروتئین‌های سه زیر واحدی (trimeric G-proteins) خصوصاً از خانواده‌های Gq و Gs نقش مهمی در کنترل مسیر پیام‌رسانی  $\beta$ -catenin/Wnt دارند (۱، ۴ و ۷). گیرنده کلسیتونین یکی از اعضای خانواده بزرگ گیرنده‌های GPCR است که از طریق Gq و Gs پیام‌های خود را به سلول ارسال می‌کند و بنابراین نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با نتایج قبلی ما و پژوهشگران دیگر همخوانی دارد (۱، ۴، ۷ و ۱۵).

ارتباط مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -Catenin با عده‌ای از سرطان‌های انسانی خصوصاً سرطان بافت کلورکتال به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است و این مسیر پیام‌رسانی یکی از اهداف بالقوه در پیشگیری و درمان سرطان در نظر گرفته شده است و در حال حاضر ترکیبات متعددی معرفی شده‌اند که در مقیاس آزمایشگاهی و کلینیک به‌منظور کنترل این مسیر پیام‌رسانی در سرطان‌های انسانی در حال پژوهش هستند (۱-۴). کنترل فعالیت رونویسی پروتئین  $\beta$ -Catenin توسط گیرنده کلسیتونین راه دیگری را برای بررسی ترکیبات جدید به‌منظور کنترل فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin در سرطان‌های انسانی باز می‌کند. نقش مسیرهای پیام‌رسانی از طریق عده‌ای از گیرنده‌های GPCR در کنترل بیان و عملکرد پروتئین  $\beta$ -Catenin مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲) و نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که باید نام گیرنده کلسیتونین را نیز به این مجموعه افزود. لازم به ذکر است که گیرنده‌های GPCR از مهم‌ترین اهداف دارویی به‌منظور پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف محسوب می‌شوند و گزارشات متعددی بیان می‌کنند که حدود ۳۰ درصد از داروهای در حال استفاده در پزشکی برای هدف قرار دادن این گیرنده‌ها طراحی و ساخته شده‌اند (۱۳، ۱۴).

## ۵- نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که فعال شدن گیرنده کلسیتونین باعث افزایش فعالیت پروتئین  $\beta$ -Catenin می‌شود.  $\beta$ -Catenin در هسته سلول همراه با فاکتورهای رونویسی از خانواده TCF/LEF در تنظیم بیان تعدادی از ژن‌های مهم سلولی در سطح رونویسی فعالیت می‌کند. نظر به عملکرد غیر طبیعی پروتئین  $\beta$ -Catenin در انواع مختلفی از سرطان‌های انسانی می‌توان کنترل کننده‌های گیرنده کلسیتونین را در مطالعات کلینیکی بیماری‌های سرطان مورد توجه قرار داد.

## ۶- تشکر و قدردانی

بخشی از این پژوهش توسط معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه تهران مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

## ۷- منابع

1. Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127(3):469-80.
2. Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149(6):1192-205.
3. Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 2017; 169(6):985-99.
4. Najafi SMA. The canonical Wnt signaling (Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway): A potential target for cancer prevention and therapy. *Iranian Biomedical Journal* 2020; 24(5):264-75.
5. Najafi SMA. Activators of G proteins inhibit GSK-3 $\beta$  and stabilize  $\beta$ -catenin in *Xenopus* oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 382(2):365-9.
6. Krejci P, Aklian A, Kaucka M, Sevcikova E, Prochazkova J, Masek JK, et al. Receptor tyrosine kinases activate canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct  $\beta$ -Catenin phosphorylation. *PLoS One* 2012; 7(4):e35826.

7. Salmanian S, Najafi SMA, Rafipour M, Arjomand MR, Shahheydari H, Ansari S, et al. Regulation of GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -Catenin by G $\alpha$ q in HEK293T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 395(4):577-82.
8. Katanaev VL, Ponzielli R, Sémériva M, Tomlinson A. Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* 2005; 120(1):111-22.
9. Koval A, Purvanov V, Egger-Adam D, Katanaev VL. Yellow submarine of the Wnt/Frizzled signaling: Submerging from the G protein harbor to the targets. *Biochemical Pharmacology* 2011; 82(10):1311-9.
10. Egger-Adam D, Katanaev VL. Trimeric G protein-dependent signaling by Frizzled receptors in animal development. *Frontiers in Bioscience* 2008; 13:4740-55.
11. Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ. Frizzled receptors signal through G-proteins. *Cellular Signalling* 2013; 25(6):1468-75.
12. Shevtsov SP, Haq S, Force T. Activation of  $\beta$ -catenin signaling pathways by classical G-protein-coupled receptors: mechanisms and consequences in cycling and non-cycling cells. *Cell Cycle* 2006; 5(20):2295-300.
13. Bar-Shavit R, Maoz M, Kancharla A, Nag JK, Agranovich D, Grisaru-Granovsky S, et al. G protein-coupled receptors in cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17(8):1320.
14. Insel PA, Sriram K, Wiley SZ, Wilderman A, Katakia T, McCann T, et al. GPCRomics: GPCR expression in cancer cells and tumors identifies new, potential biomarkers and therapeutic targets. *Frontiers in Pharmacology* 2018; 9:431.
15. Chabre O, Conklin BR, Lin HY, Lodish HF, Wilson E, Ives HE, et al. A recombinant calcitonin receptor independently stimulates 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate and Ca<sup>2+</sup>/inositol phosphate signaling pathways. *Molecular Endocrinology* 1992; 6(4):551-6.
16. Masi L, Brandi ML. Calcitonin and calcitonin receptors. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2007; 4(2):117.
17. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology* 2000; 81(6):405-22.
18. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 1997; 275(5307):1787-90.
19. Azadmanesh H. Study the role of Calcitonin receptor (CTR) activation on  $\beta$ -catenin expression and function in HEK-293T cells. A thesis submitted to the graduate office in partial fulfillment of the requirements for degree of Master of Science in Cell and Molecular Biology. School of Biology, College of Sciences, University of Tehran. Summer of 2019.
20. Tetsu O, McCormick F.  $\beta$ -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398(6726):422-26.
21. He T-C, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281(5382): 1509-1512.
22. Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of  $\beta$ -catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO Journal* 2005; 24(1):73-84.