

طراحی ترکیبات کرومینی جدید با فعالیت ضد سرطانی و بررسی چگونگی میانکنش آنها با توبولین به روش داکینگ مولکولی

مصطفی جواهری مقدم^۱، حسن آریاپور^{۱*} و علی اکبر دهنوخلجی^۲

^۱ گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۱

چکیده

در حال حاضر روشهای *in silico* یکی از کم هزینه‌ترین و سریع‌ترین روشهای موجود جهت طراحی و کشف دارو در زمینه درمان محسوب می‌گردد. این مطالعه بر آن است تا با انجام طراحی محاسباتی دارو به روش داکینگ مولکولی ترکیباتی را معرفی کند که نقش مؤثری در مهار پلی‌میرزاسیون توبولین‌ها به عنوان عوامل اصلی تقسیم سلولی در تومورهای سرطانی دارند. بدین منظور ترکیبات کرومینی که توسط محققین مختلف خواص ضد سرطانی آنها مورد آزمایش قرار گرفته بودند، جمع‌آوری و بر اساس جایگاه اتصال آنها به توبولین، آنالوگهای جدیدی طراحی شدند. سپس، با استفاده از روش داکینگ مولکولی توسط نرم افزار آکادمیک AutoDock Vina ترکیبات قویتر شناسایی شدند و برهمکنشهای احتمالی این ترکیبات با جایگاه اتصال کلشی-سین در توبولین آنالیز شد. با توجه به اینکه ترکیبات طراحی شده با مقدار انرژی پایین‌تری نسبت به کلشی‌سین به ساختار پروتئین داک شدند، می‌توانند به عنوان ترکیبات بالقوه دارویی مورد ارزیابیهای بعدی قرار بگیرند.

واژه‌های کلیدی: توبولین، کرومین، داکینگ مولکولی، سرطان

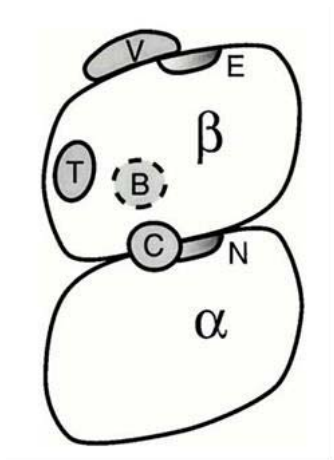
* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۱۴۴۲۷۱۷۳، پست الکترونیکی: arya pour@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از پرچالش‌ترین بیماری‌های است که بشر تاکنون با آن روبرو بوده و هنوز به عوامل درمانی مؤثر زیادی نیاز است تا با رشد خارج از کنترل تومورهای بدخیم بتوان مقابله کرد. ثابت شده است که ترکیبات ضد سرطانی طبیعی در بین داروهای ضد سرطانی جزء دسته درمانی موفق بوده‌اند (۲۸). عوامل متصل شونده به میکروتوبول به طور وسیعی در شیمی درمانی سرطان استفاده می‌شوند. این عوامل منجر به اختلال در ناپایداری دینامیک میکروتوبول‌ها در طی فرآیند پلی‌میرزاسیون و دپلی‌میرزاسیون می‌گردند. احتمالاً مهمترین نقشی که میکروتوبول‌ها در سلول ایفاء می‌کنند، شرکت در فرآیند میتوز و عملکرد صحیح دوکها می‌باشد. اختلال در فرآیند

تجمع میکروتوبول‌ها چه با مهار پلی‌میرزاسیون توبولین‌ها و چه با مهار دپلی‌میرزاسیون، منجر به افزایش شمار سلولهایی می‌شود که در مرحله متافاز متوقف می‌شوند. بنابراین هدفگیری توبولین‌ها به عنوان اجزاء اصلی میکروتوبول‌ها راهکار مهمی در کنترل سرطان است. تا کنون مشخص شده است که ترکیبات مختلف زیادی به میکروتوبول‌ها متصل می‌شوند. به لحاظ جایگاه اتصال این ترکیبات به چهار گروه تقسیم می‌گردند (شکل ۱) که عبارتند از: ۱- لیگاندهایی که به جایگاه تاکسول (T) اتصال می‌یابند، ۲- لیگاندهایی که به جایگاه وینبلاستین (V) اتصال می‌یابند، ۳- لیگاندهایی که به جایگاه بنزایمیدازول (B) اتصال می‌یابند و ۴- لیگاندهایی که به

HIV به طور زیادی تحت تأثیر یا بر پایه طراحی براساس ساختار و استراتژیهای غربالگری بوده است (۲۹).



شکل ۱- نمایشی از جایگاههای اتصال لیگاندهای مختلف بر روی هترودایمر $\alpha\beta$ -توبولین (۱۳).

کرومونها ترکیباتی هستند که در بسیاری از ارگانیسم‌های دریایی نظیر شاخه کورنتراتا، ماهیها، اسفنجها، نیامداران و جلبکهای بزرگ با خواص بیولوژیکی متنوع یافت می‌شوند (۱۹). ترکیبات کرومنی خواص سائیتوتاکسیک شدید و همین‌طور توانایی مهار پلی‌مریزاسیون توبولین‌ها را نشان می‌دهند. که مکانیسم اصلی عمل این دسته از ترکیبات القای آپوپتوز می‌باشد. این ترکیبات و همچنین مشتقات آن نمونه‌های بالینی بسیار خوبی برای درمان سرطان در انسانها هستند. به علاوه ثابت شده است که تعدادی از این ترکیبات را می‌توان به عنوان پیش‌دارو در نظر گرفت، که جزء عوامل شیمی درمانی برای هدف‌گیری رگهای توموری هستند و فعالیت ضد رگزایی دارند. جایگاه اتصال آنها نزدیک به محل اتصال کلشی‌سین است، و در سلولهای مقاوم به دارو نسبت به عوامل ضد میتوزی دیگر مثل تاکسانها و وینکاکاها فعال باقی می‌ماند، بنابراین می‌توانند در درمان سرطانهای مقاوم به دارو یک مزیت به حساب آیند (۲۳ و ۳۴).

تاکنون مشتقات زیادی از کرومونها استخراج یا طراحی و سنتز شده‌اند ولی هیچ‌گونه مطالعه شبیه‌سازی مولکولی در

جایگاه کلشی‌سین (C) اتصال می‌یابند. این ترکیبات میکروتوبول‌ها را ناپایدار می‌کنند و منجر به آپوپتوز سلولی می‌شوند (۱۱).

آپوپتوز فرآیندی است که طی آن ارگانیسم می‌تواند تعداد سلولهایش را کنترل و سلولهایی را که غیرضروریند و تهدیدی احتمالی برای بقای آن به حساب می‌آید را محدود کند. تعادل مناسب بین آپوپتوز و مهار آپوپتوز در حفظ همئوستازی و مورفولوژی اندام اهمیت دارد. از آنجایی که خیلی از سلولهای سرطانی مهار غیرطبیعی آپوپتوز را نشان می‌دهند، این مسئله اهمیت ویژه‌ای در جستجو و طراحی القاء‌کننده‌های آپوپتوز به عنوان عوامل بالقوه ضد سرطانی پیدا می‌کند (۲۳).

با در نظر گرفتن این مطلب که طراحی دارو کاری است چند بعدی، لذا روش قدیمی نشستن و خیره شدن به ساختارهای شیمیایی روی کاغذ برای سنتز و غربالگری طیف گسترده‌ای از ترکیبات نا امید کننده است. همچنین مشکلات مربوط به مدیریت داده‌ها با حجیم تر شدن آنها افزایش می‌یابد. دارو علاوه بر فعالیت مناسب باید فراهمی زیستی خوراکی بالا، سمیت پایین، قابلیت ثبت علمی و نیمه عمر کافی در جریان خون داشته باشد. هزینه تولید یک ترکیب دارویی موضوع مهمی است، که برای داروهای انسانی کمتر، برای داروهای دامپزشکی بیشتر و برای ترکیبات شیمیایی کشاورزی بسیار اهمیت دارد. برنامه‌های رایانه‌ای برای تحلیلهای چند بعدی، بهینه‌سازی و انتخاب ترکیبات پیشرو ایجاد شده‌اند (۴۱).

روش محاسباتی طراحی دارو بر اساس ساختار، که در آن مولکولهای کوچک درون ساختار ماکرومولکولهای هدف "داک" می‌شوند و به اتصال آنها در جایگاه مورد نظرامتياز داده می‌شود به طور گسترده‌ای در تعیین نحوه برخورد، یافتن و بهینه‌سازی ترکیبات رهبر کاربرد دارد. در واقع تاکنون توسعه شماری از داروها نظیر مهار کننده پروتئاز

اتهما، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با به کارگیری میدان نیروی CHARMM27 (۸) استفاده گردید. پارامترهای کوآنزیمها توسط سرور SwissParam (۴۲) محاسبه شدند. کمپلکس پروتئین-کوآنزیم در جعبه مکعبی با حفظ شرایط PBC و فاصله ۱nm با لبه جعبه در تمام جهات درون محلول آبی با فرمت TIP3P قرار گرفت. با جایگزینی یون Na^+ بار کلی سیستم خنثی و نوع میانکنشهای الکترواستاتیک PME تعیین گردید. کمینه‌سازی اولیه انرژی برای عاری کردن سیستم از برهمکنشهای پراثری و برخوردی حاصل از ممانعت‌های فضایی تا رسیدن به مقدار انرژی ۱۰۰۰kJ/mol برای مدت زمان ۵۰ پیکو ثانیه انجام شد. طول تمام پیوندها توسط الگوریتم LINCS (۲۰) محدود شدند. سپس سیستم مورد نظر به ترتیب در دما ۳۱۰ کلوین و فشار ثابت ۱ بار به مدت ۵۰ پیکو ثانیه به تعادل رسید. در نهایت محاسبات دینامیک مولکولی به مدت ۵ نانو ثانیه به وسیله سرور تحت وب GROMACS که بخشی از تورین WeNMR می‌باشد، انجام گرفت (۳۷) و (۳۹). نتایج حاصل از شبیه‌سازی توسط برنامه Grace مورد ارزیابی قرار گرفت (۳).

آماده‌سازی لیگاند: ابتدا تمامی ساختارهای ترکیبات کرومینی از مقالاتی که تا سال ۲۰۱۱ منتشر شده بودند استخراج، با استفاده از برنامه کاربردی MarvinSketch ترسیم و همین‌طور با کمک برنامه کاربردی MolConverter از مجموعه ChemAxon (۴) بهینه‌سازی و به ساختار سه بعدی تبدیل شدند، که مجموعاً حاوی ۱۸۹ ترکیب شامل ۱۲۵ ترکیب از کارهای Kemnitzer و همکاران (۹، ۲۲-۲۷)، ۸ ترکیب از کار Pinney و همکاران (۳۴)، ۹ ترکیب از کار Batista و همکاران (۷)، ۴ ترکیب از کار Endo و همکاران (۱۴)، ۴ ترکیب از کار Conti و همکاران (۱۲)، ۱۵ ترکیب از کار Mun و همکاران (۳۱) و نهایتاً ۲۴ ترکیب از کار Cheng و همکاران (۱۰) می‌باشد. با در نظر گرفتن این ترکیبات و کانفورماسیون آمینو اسیدهای موجود در جایگاه کشی‌سین

ارتباط با میانکنش این ترکیبات با هترودیمر توبولین صورت نگرفته است بنابراین در این تحقیق تصمیم گرفته شد تا یک سری مطالعات داکینگ و شبیه‌سازی مولکولی بر روی تعدادی کرومن منتخب اجرا گردد با این هدف که فهم بهتری نسبت به چگونگی اتصال این دسته از ترکیبات درون توبولین به دست آید. نتایج به دست آمده می‌تواند در ادامه روند طراحی و سنتز ترکیبات مؤثرتر، مفید واقع شود.

مواد و روشها

آماده‌سازی پروتئین: ساختار کریستالوگرافی شده توبولین به همراه کلشی‌سین با قدرت تفکیک ۲/۳ آنگستروم از بانک اطلاعات پروتئین داندلود گردید (PDB ID: 3UT5). دایمر α و β توبولین به همراه هترومولکولهای GDP، GTP و Mg از بقیه بخشهای اضافی استخراج شدند. لویها و رزیدوهای از دست رفته در فایل کریستالوگرافی که شامل لوپ‌های ۳۸-۴۶ و ۴۴۰-۴۵۱ از زیرواحد α -توبولین و ۴۴۲-۴۵۵ از زیرواحد β -توبولین هستند، توسط برنامه Modeller9.11 (۱۵) به روش چند الگویی بازسازی شدند، این نواحی از دست رفته پروتئین 3UT5 در الگوهای پروتئینی استفاده شده نظیر 1FFX، 2XRP و 4I4T دارای ساختار رندوم کوپل بودند. در نهایت سکانس و ساختار سه بعدی پروتئین کریستالوگرافی شده با سکانس و ساختار سه بعدی پروتئین مدل سازی شده و همین‌طور شبیه‌سازی شده، توسط برنامه UCSF Chimera (۳۳) تطبیق داده شدند. کلشی‌سین و تمامی هترواتهما به غیر از کوآنزیمها و کوفاکتورها از دایمر توبولین حذف شدند سپس با استفاده از برنامه AutoDockTools (۳۵)، بعد از معین کردن بار Gasteiger (۱۷)، اتمهای هیدروژن قطبی، به توبولین اضافه شدند.

بهینه‌سازی پروتئین همولوژی شده به روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: برای بهبود جهت‌گیری زنجیره‌های جانبی، متعادل‌سازی پروتئین و همچنین آرایش صحیح

گرید با ابعاد ۲۹×۲۹×۲۹ نقطه ساخته و در محدوده جایگاه اتصال کلشی‌سین قرار داده شد. فاصله گرید ۱۰۰۰ Å و سایر پارامترها به صورت پیش‌فرض در نظر گرفته شدند. پس از انجام داکینگ بهترین کانفورماسیون با پایین‌ترین میزان انرژی اتصال، به عنوان نتیجه انتخاب شد. در نهایت مؤثرترین ترکیبات انتخاب و میانکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبی کمپلکس توبولین-لیگاند و طول پیوندهای هیدروژنی به وسیله نرم افزار UCSF Chimera و LigPlot آنالیز گردید (۳۸).

۱۰۰ آنالوگ جدید طراحی شدند و با استفاده از برنامه کاربردی Evaluator از مجموعه ChemAxon (۴) بر اساس اصل پنجم لیبینسکی (۳۰) آنالوگ‌های نامناسب از سایر آنالوگ‌ها طراحی شده، فیلتر شدند.

داکینگ مولکولی: فرآیند داکینگ لیگاندها به جایگاه اتصال کلشی‌سین در پروتئین توبولین با استفاده از نرم‌افزار AutoDock Vina انجام گرفت (۳۶). تمامی محاسبات داکینگ با استفاده از الگوریتم بهینه‌کننده جستجوی محلی تکرار شونده با در نظر گرفتن پروتئین به صورت انعطاف-ناپذیر و لیگاند به صورت انعطاف‌پذیر انجام شد. جعبه

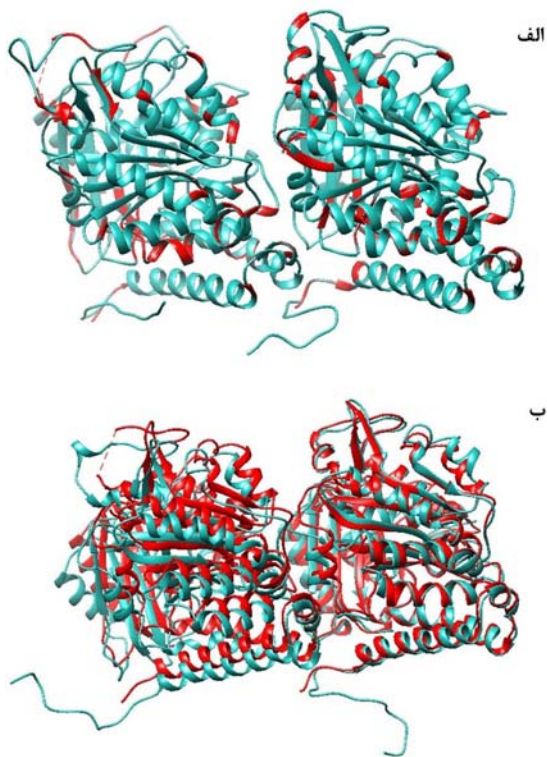


شکل ۲- انطباق سکانس‌های کریستالوگرافی و مدل سازی شده پروتئین 3UT5 که با استفاده از نرم‌افزار UCSF Chimera صورت گرفت. رنگ آمیزی سکانسها بر اساس ساختار دو بعدی پروتئین صورت گرفت. نواحی سبز مربوط به صفحات بتا، آبی مارپیچهای آلفا و قرمز مربوط به رندوم کویلها می-باشد. نواحی که دارای رزیدوهای گمشده‌اند به صورت نقطه چین به نمایش درآمدند.

نتایج

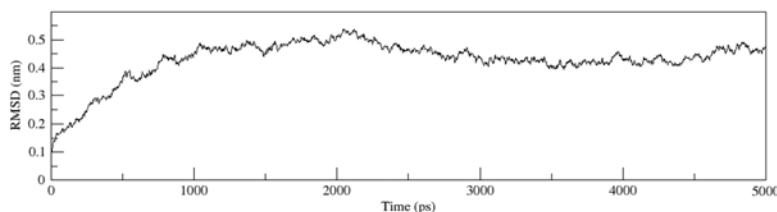
B برابر با ۹۷ درصد مشاهده شد. در این تطبیق رزیدوهای گمشده در کریستالوگرافی به صورت خط چین نشان داده شده است. همچنین فایل کریستالوگرافی شده 3UT5 نسبت به سکانس اصلی توبولین دارای رزیدوهای گمشده شامل یک لوپ در زنجیره آلفا و دو لوپ در C ترمینالهای هر دو زنجیره بود، که با کمک برنامه Modeller بازسازی و

پروتئین: سکانسهای هر دو پروتئین کریستالوگرافی و مدل سازی شده نیز با کمک نرم افزار UCSF Chimera بر روی هم منطبق و بر مبنای ساختار دو بعدی رنگ آمیزی و شاخص یکسانی آنها سنجیده شد (شکل ۲)، میزان یکسانی برای زنجیره‌های A برابر با ۹۶ درصد و برای زنجیره‌های



شکل ۳- الف - ساختار پروتئینهای کریستالوگرافی و مدل سازی شده قبل از شبیه‌سازی که بر روی هم منطبق شده اند. ب- ساختار پروتئینهای کریستالوگرافی و مدل سازی شده بعد از شبیه‌سازی که بر روی هم منطبق شده‌اند. ساختار کریستالوگرافی با رنگ قرمز و ساختار مدل سازی شده با رنگ آبی مشخص شده‌اند.

برای این منظور کلسی‌سین مجدداً به درون جایگاه خود داک گردید و RMSD آن با ساختار اولیه به کمک نرم-افزار Molsoft ICM-Browser (۵) برآورد شد (شکل ۴). مقدار RMSD کلسی‌سین داک شده و کریستاله ۰/۶ آنگسترم بود که نشان می‌دهد پارامترهای لحاظ شده در داکینگ، در مورد این قبیل لیگاندها و جایگاه مذکور دقت مناسبی دارند.

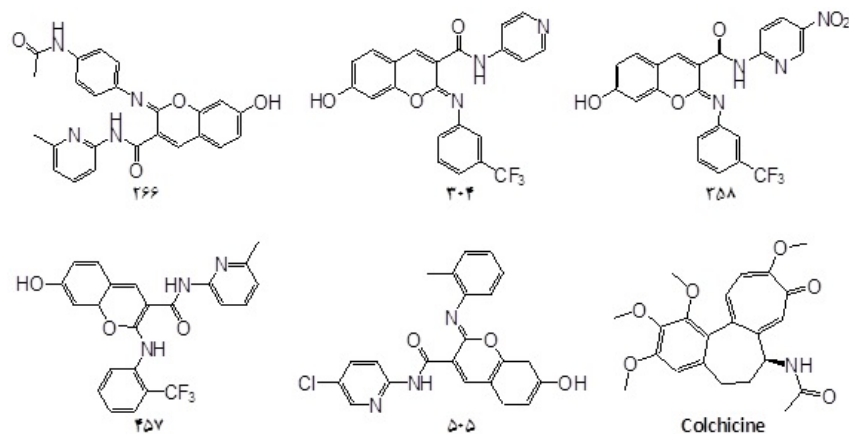


شکل ۴- RMSD حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین مدل سازی شده در مدت زمان ۵ پیکو ثانیه

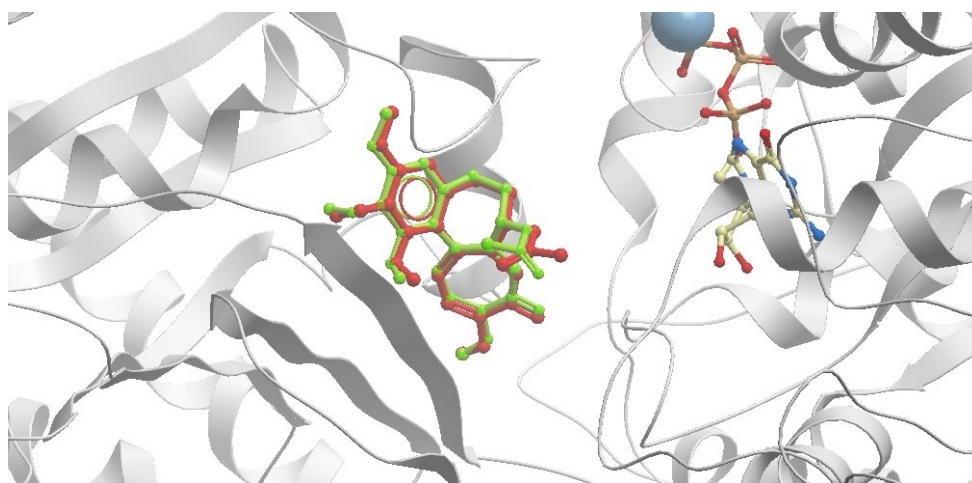
همولوژی شدند، سپس پروتئین مدل سازی شده توسط برنامه GROMACS به مدت ۵ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شد. ساختار سه بعدی پروتئین کریستالوگرافی با ساختار پروتئین مدل سازی شده (شکل ۳، الف) و پروتئین شبیه‌سازی شده (شکل ۳، ب) مقایسه شد. مقدار RMSD حاصل از شبیه‌سازی ۰/۵ آنگسترم می‌باشد. آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین 3UT5 مدل سازی شده نشان داد که پروتئین مورد نظر بعد از حدود یک نانو ثانیه به تعادل رسیده است (شکل ۴).

داکینگ: تمام محاسبات داکینگ توسط برنامه Vina صورت گرفت که طی آن ۱۰۰ ترکیب تازه طراحی شده همراه با کلسی‌سین به عنوان نمونه کنترل مثبت به درون ساختار پروتئین داک شدند. انرژی تمایل ترکیبات به پروتئین هدف به صورت kcal/mol محاسبه شد، هرچه مقدار انرژی کمتر باشد تمایل لیگاند به جایگاه اتصال بیشتر می‌باشد و برعکس. این میزان برای کلسی‌سین برابر با $-۷/۶$ (kcal/mol) برآورد شد. از بین ترکیبات طراحی شده نیز ۵ ترکیب پایین‌ترین میزان انرژی را از خود نشان دادند. مقادیر انرژی تمایل این ترکیبات به پروتئین هدف در جدول ۱ ارائه شده است. ساختار این ترکیبات نیز در شکل ۵ نشان داده شده است.

جهت معتبر سازی نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات طراحی شده از مولکول کلسی‌سین موجود در ساختار کریستاله پروتئین 3UT5 استفاده گردید. صحت نتایج، از مقایسه حالت پیش‌بینی شده لیگاند کلسی‌سین نسبت به حالت کریستاله آن و اندازه‌گیری مقدار RMSD تأیید شد.



شکل ۵- ساختار کلشی‌سین و ترکیبات منتخب حاصل از امتیازدهی داکینگ



شکل ۶- مقایسه ساختار پیش‌بینی شده و واقعی کلشی‌سین. ساختار داک شده با رنگ سبز و ساختار کریستاله با رنگ قرمز مشخص شده است.

ارزیابی قرار گرفت. رزیدوهای کلیدی کاتالیتیک در واکنش با کلشی‌سین شامل Val1۸۱ درگیر در پیوند هیدروژنی و Met2۵۹, Ile3۱۸, Lys2۵۴, Leu2۵۵, Asn2۵۸, Lys3۵۲, Ala2۵۰ به همراه ۱۰ رزیدوی دیگر درگیر در واکنش‌های غیر پیوندی هستند (شکل‌های ۷ و ۸). رزیدوهای کاتالیتیک درگیر با ترکیب ۳۵۸ عبارتند از Gln1۱ با دو پیوند هیدروژنی به گروه نیترو و همچنین رزیدوهای Tyr2۲۴, Val1۸۱, Ile3۱۸, Leu2۵۵, Lys3۵۲, Asn2۵۸, Met2۵۹ با برهمکنش‌های غیر پیوندی (شکل‌های ۷ و ۸). برای ترکیب ۳۰۴ برهمکنش‌های Asn2۵۸, Met2۵۹, Lys3۵۲ با هسته کرومن و Asn2۴۹, Lys2۵۴, Ser1۷۸, Leu2۵۵, Ile3۱۸ با گروه‌های (trifluoromethyl)benzene و (pyridin-

جدول ۱- مقادیر انرژی اتصال ترکیبات طراحی شده مؤثرتر از کلشی-

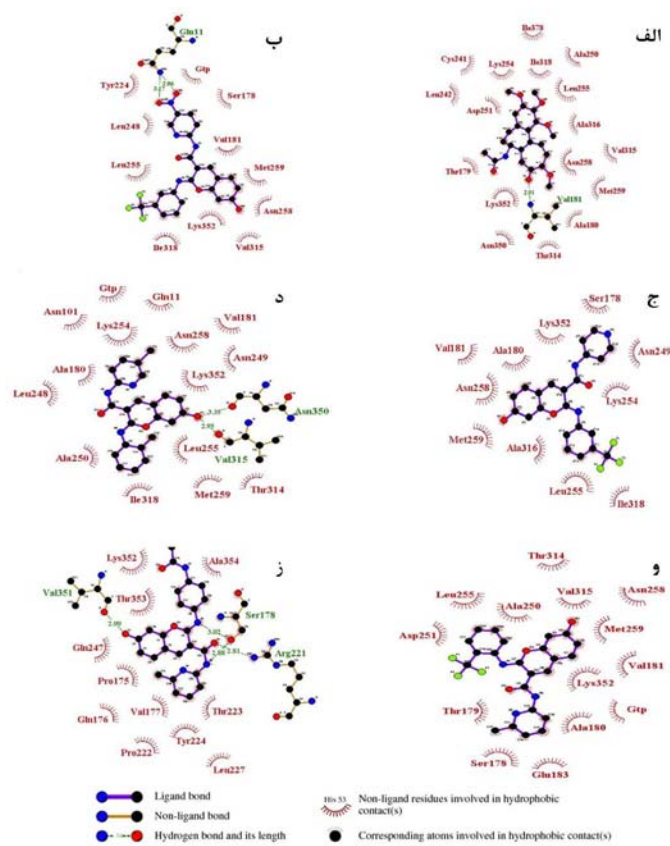
سین	
شماره ترکیب	انرژی اتصال (kcal/mol)
۳۵۸	-۱۰/۴
۳۰۴	-۹/۷
۵۰۵	-۹/۵
۴۵۷	-۹/۵
۲۶۶	-۱۰
کلشی‌سین*	-۷/۶

* نمونه کنترل

پس از داکینگ نحوه میانگشش ۵ ترکیب مؤثرتر به همراه کلشی‌سین توسط برنامه UCSF Chimera و LigPlot مورد

Lue255 درگیر واکنش اند (شکل‌های ۷ و ۸). در ترکیب ۲۶۶ پیوندهای هیدروژنی احتمالی رزیدوهای Arg221، Ser178، Val351 تنها توسط نرم افزار LigPlot تأیید و همین طور برهمکنشهای غیر پیوندی رزیدوهای Tyr224، Thr353، Pro175، Pro222، Pro175، Lys352، Thr353 شدند (شکل‌های ۷ و ۸). اتمهای درگیر در پیوند هیدروژنی لیگاندهای ۲۶۶، ۳۵۸ و ۵۰۵ با آمینواسیدهای جایگاه اتصال در جدول ۲ ارائه شده است.

4-yl)acetamide مشاهده شد (شکل‌های ۷ و ۸). در ترکیب ۵۰۵ برهمکنشهای غیر پیوندی رزیدوهای Lys254، Lys352، Leu255، Val181، Asn249، Asn258، Lys352، Met259، Ile318 و پیوندهای هیدروژنی احتمالی رزیدوهای Val315 و Asn350 با OH متصل به حلقه کرومنی تشکیل شدند نرم افزار UCSF Chimera این پیوندهای هیدروژنی را تأیید نکرد (شکل‌های ۷ و ۸). در ترکیب ۴۵۷ رزیدوهای Ala250، Asn258، Met259، Glu183، Ser178، Ala180، Lys352، Val315

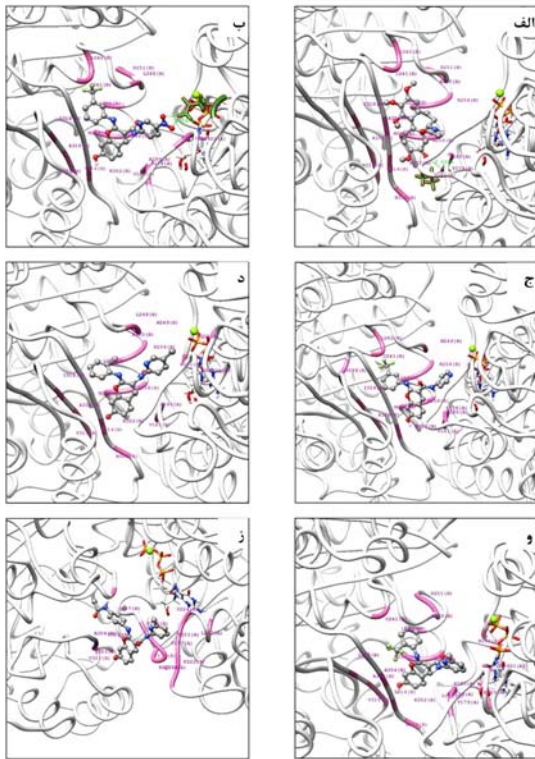


شکل ۷- برهمکنشهای احتمالی ترکیبات با جایگاه اتصال کلسی سین در پروتئین توپولین توسط LigPlot: (الف) کلسی سین، (ب) ترکیب ۳۵۸، (ج) ترکیب ۳۰۴، (د) ترکیب ۵۰۵ (و) ترکیب ۴۵۷ (ز) ترکیب ۲۶۶. در LigPlot پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز و رزیدوهای درگیر در برهمکنشهای غیر پیوندی با رنگ قرمز و همین طور اتم‌های کربن با رنگ مشکی، اکسیژن با رنگ قرمز، نیتروژن با رنگ آبی، و فلور با رنگ سبز به نمایش گذاشته شده است. برای نمایش دادن لیگاندها از مدل گوی و میله استفاده شد.

بحث

برای کشف و توسعه داروها محسوب می‌شوند. مطالعات بر روی پکتین سیب نشان داد که این ترکیب قادر به القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان پروستات Du145 می‌باشد

متابولیت‌های طبیعی سهم عمده‌ای از داروهای ضد سرطانی را به خود اختصاص داده‌اند، این ترکیبات عرضه مناسبی



شکل ۸- برهمکنش‌های احتمالی ترکیبات با جایگاه اتصال پروتئین توسط UCSF Chimera: (الف) کلشی‌سین (ب) ترکیب ۳۵۸ (ج) ترکیب ۳۰۴ (د) ترکیب ۵۰۵ (و) ترکیب ۴۵۷ (ز) ترکیب ۲۶۶. در UCSF Chimera لیگاندها به صورت مدل گوی و میله و اتمهای کربن با رنگ خاکستری، نیتروژن آبی، اکسیژن قرمز، فلئور سبز، ساختار پروتئین با رنگ سفید و رزیدوهای درگیر در پیوند هیدروژنی سبز و مابقی رزیدوهای درگیر در برهمکنش با رنگ صورتی مشخص شده‌اند، مابقی تنظیمات مربوط به رنگ‌بندی همانند برنامه LigPlot صورت گرفته است.

اهمیت توبولینها در میتوز و تقسیم سلولی باعث شده است تا مهار پویایی توبولینها به عنوان هدفی در طراحی داروهای ضد سرطانی قرار بگیرد (۲۱). ترکیباتی نظیر کرومنا و کامبری‌تاستاتینها که در جایگاه کلشی‌سین و یا نزدیک به آن داک می‌شوند باعث مهار فرآیند پلی-میرزاسیون میکروتوبولها می‌شوند (۲۳)، لذا توسعه و طراحی چنین ترکیباتی بعنوان ترکیباتی بالقوه ضدسرطانی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است.

(۲). همچنین طبق مطالعات پارساشرشت و همکاران تیمار متابولیت‌های حاصل از باکتری *Lactobacillus rhamnosus* GG در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر/ میلی‌لیتر بر روی رده سلولهای سرطانی CacoII به ترتیب موجب مهار ۶۰/۸، ۷۲/۵ و ۸۲/۱ درصدی این سلولها شد (۱).

با این وجود طراحی و توسعه داروها فرآیندی بسیار پرهزینه، زمان‌بر و همچنین نیازمند ارزیابیهای آزمایشگاهی فراوانی برای رسیدن دارو به بازار می‌باشد، از این رو گسترش روشهایی که بتوان طی آن میلیونها ترکیب را در بازه زمانی کوتاه‌تر و با هزینه کمتر غربال نمود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. امروزه روشهای *in silico* به عنوان یکی از کم هزینه‌ترین و سریع‌ترین راهکارها برای رسیدن به ترکیبات رهبر و یا دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶).

مطالعات *in silico* توسط Bai و همکاران منجر به شناسایی ۳۰۶ مهارکننده از میان ۵۰۰۰۰ ترکیب برای غیر فعال کردن سم ریسین شد. ارزیابیهای بیوشیمیایی و سلولی بر روی ترکیبات غربال شده نشان داد که دو مهارکننده دارای اثر محافظتی قوی بر روی سلولهای Vero در برابر سم ریسین می‌باشند (۶). اختلال در فعالیت پروتئین Tip60 به عنوان یکی از عوامل مهم در مسیرهای سیگنالینگ سلولی، باعث بروز بیماریهای نظیر سرطان و زوال مغزی می‌گردد. روش غربالگری مجازی که در این مطالعات به کار گرفته شده است باعث شناسایی چهار مهارکننده برای پروتئین Tip60 از میان ترکیبات گردآوری شده از پایگاه اطلاعاتی ChemBridge شد. ارزیابیهای بعدی صورت گرفته بر روی این مهارکننده‌ها در شرایط *in vitro* نتایج حاصل از *in silico* را تأیید کرد (۴۰).

بنابر گزارش Endo و همکارانش، مشتقات ۳-کربوکسی-آمید کرومنا مهارکننده آلدو کتو ردوکتاز (AKR) هستند (۱۴). از سوی دیگر نتایج حاصل از مطالعات Cheng و همکاران نشان داد که این ترکیبات مهارکننده فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF α) نیز می‌باشند (۱۰).

جدول ۲- پیوند های هیدروژنی درگیر در کمپلکس ترکیبات با توبولین

فاصله (Å)	آمینو اسید	اتم لیگاند	پیوند هیدروژنی	لیگاند
۲/۹۶	Gln۱۱:NE	O ₂	۱	۳۵۸
۳/۱۷	Gln۱۱:NE	O ₃	۲	
۲/۹۵	Val۳۱۵:O	O ₃	۱	۵۰۵
۳/۳۵	Asn۳۵۰:O	O ₃	۲	
۲/۸۱	Arg۲۲۱:NH۱	O ₄	۱	۲۶۶
۲/۸۸	SER۱۷۸:OG	N ₂	۲	
۳/۰۲	SER۱۷۸:OG	N ₃	۳	
۲/۹۹	Val۳۵۱:O	O ₁	۴	

پروتئین مدل سازی شده با Modeller توسط GROMACS شبیه‌سازی مولکولی شد. مقدار RMSD بین پروتئین کریستاله و شبیه سازی شده ۰/۵ آنگستروم می‌باشد که کمتر از دو می‌باشد و نشان دهنده مدل سازی و پارامترسازی صحیح فرآیند شبیه‌سازی می‌باشد. علاوه بر این معتبر سازی مطالعات داکینگ نیز با اندازه‌گیری RMSD کشی سین داک شده با کریستاله انجام شد که مقدار آن ۰/۶ آنگستروم به دست آمد. معمولاً میزان $2\text{\AA} < \text{RMSD}$ برای گزارش تقارن بین دو مولکول مناسب است. این موضوع نشان می‌دهد فرآیند داکینگ به درستی جایگاه کلشی سین را پیش‌بینی کرده است. انرژی اتصال برای بهترین مدل کلشی سین $9/6 \text{ kcal/mol}$ - به دست آمد.

مطالعات داکینگ توسط AutoDock Vina (یکی از پرکاربردترین نرم‌افزارهای داکینگ که در سال ۲۰۰۹ منتشر شد) صورت گرفت. Vina نسل جدیدی از AutoDock محسوب می‌شود، به خدمت گرفتن تابع امتیازدهی تجربی در مقابل تابع نیمه تجربی AutoDock و همین طور استفاده از الگوریتم بهینه کننده جستجوی محلی تکرار شونده در مقایسه با الگوریتم ژنتیکی لامارک باعث افزایش سرعت و دقت داکینگ شده است (۱۸). هر چند که شارژ محاسبه شده با ADT براساس روش Gasteiger-Marsili (۱۷) می‌باشد، اما باید توجه داشت که Vina برای

نتایج حاصل از مطالعات Furst و همکاران نشان داد که مشتقات سیکلوپروپیلی کمبری تاستاتین از طریق حلقه فنولی و آنیلین به ترتیب با آمینواسیدهای Thr۱۷۹ و Ser۱۷۸ درگیر پیوند هیدروژنی شده و موجب مهار پلی-مریزاسیون توبولینها می‌شوند (۱۶). در حالی که نتایج حاصل از مشاهدات این تحقیق نشان داد که اسیدآمینو Ser۱۷۸ فقط با ترکیب ۲۶۶ درگیر پیوند هیدروژنی می‌گردد و با ترکیبات ۳۰۴، ۳۵۸ و ۴۵۷ درگیر برهمکنشهای غیرپیوندی می‌شود. علاوه بر این، برهمکنشهای غیرپیوندی بین اسیدآمینو Thr۱۷۹ و ترکیبات ۴۵۷ و کلشی سین مشاهده گردید.

همچنین مطالعات Blanch و همکاران بر روی آنالوگهای کمبری تاستاتین و مشتقات تری‌آزول نشان داد که اسیدآمینوهای Val۱۸۱، Cys۲۴۱ و Asn۲۵۸ با این ترکیبات درگیر پیوند هیدروژنی می‌شوند (۳۲). در صورتی که نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات ارائه شده در این مطالعه، برهمکنشهای غیر پیوندی با اسیدآمینوهای Val۱۸۱ و Asn۲۵۸ را نشان می‌دهد. همچنین پیوند هیدروژنی اسیدآمینو Val۱۸۱ و برهمکنشهای غیر پیوندی اسیدآمینوهای Cys۲۴۱ و Asn۲۵۸ با کلشی سین مشاهده شد.

(جدول ۱) و میزان انرژی پیوند هیدروژنی که حدوداً معادل $1-3 \text{ Kcal/mol}$ می‌باشد، و همین‌طور در مقایسه با ترکیب 304 می‌توان گفت پیوند هیدروژنی استخلاف NO_2 در موقعیت ۵ گروه $(\text{pyridin-2-ylamino})\text{-methanone}$ نقش مهمی در افزایش امتیاز این ترکیب داشته است. بررسی اطلاعات حاصل از نحوه برهمکنش ترکیبات توسط هر دو نرم‌افزار تأیید می‌کند که رزیدوی $\text{Lys}352$ واقع در زنجیره β در تمام برهمکنش‌های غیر پیوندی حضور داشته است و می‌تواند به عنوان یک رزیدوی کلیدی در این جایگاه مورد ارزیابی‌های بیشتر قرار گیرد.

بر اساس گزارش Kemnitzer و همکاران ترکیبات کرومینی به جایگاه کلشی‌سین متصل می‌شوند (۲۳)، اما اتصال این ترکیبات به توبولین تا کنون شبیه‌سازی نشده و نحوه اتصال آنها برآورد نشده است. به نظر می‌رسد که ترکیبات طراحی شده بیشتر از طریق میانکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبیک با رزیدوهای موجود در جایگاه اتصال ارتباط برقرار می‌کنند. آنالوگ‌های ارائه شده در این تحقیق می‌توانند به عنوان ترکیبات رهبر در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

محاسبات خود به هیچ‌شارژی نیاز ندارد و شارژ را بر اساس تابع درونی خود تغییر می‌دهد (۳۶). ترکیبات طراحی شده به جایگاه کلشی‌سین توسط برنامه Vina داک و بر اساس انرژی اتصال رتبه‌بندی شدند. بهترین مد هر یک از چهار ترکیب ارائه شده در جدول ۱ نسبت به بقیه ترکیبات و همین‌طور نسبت به کلشی‌سین دارای پایین‌ترین میزان انرژی تمایل بودند. بنابراین تمایل آنها به این جایگاه بهتر بوده و نسبت به بقیه ترکیبات اختصاصی‌تر عمل می‌کنند.

برای درک بهتر جایگاه اتصال و همین‌طور نحوه اتصال لیگاندها به این جایگاه برهمکنش‌های احتمالی میان ترکیبات و توبولین توسط نرم‌افزار LigPlot برآورد شد و به صورت دو بعدی به نمایش درآمد (شکل ۷). پیوند هیدروژنی در اتصال ترکیبات ۲۶۶، ۵۰۵ و ۳۵۸ و برهمکنش‌های غیر پیوندی در دو ترکیب ۳۰۴ و ۴۵۷ نقش مهمی ایفا می‌کند.

برای تأیید این گزارش‌ها از نرم‌افزار Chimera استفاده و در ارزیابی این نرم‌افزار پیوند هیدروژنی فقط در مورد ترکیب ۳۵۸ مشاهده شد، با توجه به میزان انرژی اتصال این لیگاندها

منابع

۲- دشت بزرگی، سارا. سپهری، حوری. گلبایی، بهرام. دلفی، لادن. جان زمین، احسان (۱۳۹۲). بررسی اثر مشتقات پکتینی در القای مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۱۸۶-۱۹۹: (۲) ۲۶

۱- پارسا سرشت، لادن. فاضلی، محمد رضا. صمدی، نسرين. جمالی‌فر، حسین. عیدی، اکرم. محمودی اصل‌زاده، حمیده (۱۳۹۱). تاثیر متابولیت‌های *Lactobacillus rhamnosus* GG بر روی رده سلول سرطانی CacoII. مجله زیست‌شناسی ایران. ۴۸۴-۴۹۲: (۴) ۲۵

3- <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>

4- <http://www.chemaxon.com>.

5- Abagyan R, Totrov M, Kuznetsov D.(1994) ICM—a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of computational chemistry*, 15(5):488-506.

6- Bai Y, Watt B, Wahome PG, Mantis NJ, Robertus JD.(2010) Identification of new classes of ricin toxin inhibitors by virtual screening. *Toxicol* :

official journal of the International Society on Toxinology, 56(4):526-534.

7- Batista JM, Jr., Lopes AA, Ambrosio DL, Regasini LO, Kato MJ, Bolzani Vda S, Cicarelli RM, Furlan M.(2008) Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypansomal agents. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31(3):538-540.

8- Bjelkmar Pr, Larsson P, Cuendet MA, Hess B, Lindahl E.(2010) Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps,

- virtual interaction sites, and water models. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(2):459-466.
- 9- Cai SX, Drewe J, Kemnitzer W.(2009) Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as potent apoptosis inducers using a cell- and caspase-based Anti-cancer Screening Apoptosis Program (ASAP): SAR studies and the identification of novel vascular disrupting agents. *Anticancer Agents Med Chem*, 9(4):437-456.
- 10- Cheng JF, Ishikawa A, Ono Y, Arrhenius T, Nadzan A.(2003) Novel chromene derivatives as TNF-alpha inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(21):3643-3645.
- 11- Coluccia A, Sabbadin D, Brancale A.(2011) Molecular modelling studies on Arylthioindoles as potent inhibitors of tubulin polymerization. *European journal of medicinal chemistry*, 46(8):3519-3525.
- 12- Conti C, Desideri N.(2009) Synthesis and antirhinovirus activity of new 3-benzyl chromene and chroman derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(10):3720-3727.
- 13- Downing KH.(2000) Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 16:89-111.
- 14- Endo S, Matsunaga T, Kuwata K, Zhao HT, El-Kabbani O, Kitade Y, Hara A.(2010) Chromene-3-carboxamide derivatives discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour maker, AKR1B1. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(7):2485-2490.
- 15- Fiser A, Do RKG, Šali A.(2000) Modeling of loops in protein structures. *Protein science*, 9(9):1753-1773.
- 16- Furst R, Zupko I, Berenyi A, Ecker GF, Rinner U.(2009) Synthesis and antitumor-evaluation of cyclopropyl-containing combretastatin analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(24):6948-6951.
- 17- Gasteiger J, Marsili M.(1978) A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron letters*, 19(34):3181-3184.
- 18- Handoko SD, Ouyang X, Su CT, Kwok CK, Ong YS.(2012) QuickVina: accelerating AutoDock Vina using gradient-based heuristics for global optimization. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics / IEEE, ACM*, 9(5):1266-1272.
- 19- Heo SJ, Kim KN, Yoon WJ, Oh C, Choi YU, Affan A, Lee YJ, Lee HS, Kang DH.(2011) Chromene induces apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(9):1998-2004.
- 20- Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG.(1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*, 18(12):1463-1472.
- 21- Jordan MA, Wilson L.(2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews Cancer*, 4(4):253-265.
- 22- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Crogan-Grundy C, Labreque D, Bubenick M, Attardo G, Denis R, Lamothe S *et al.*(2008) Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high throughput screening assay. 4. Structure-activity relationships of N-alkyl substituted pyrrole fused at the 7,8-positions. *Journal of medicinal chemistry*, 51(3):417-423.
- 23- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Wang Y, Zhao J, Jia S, Herich J, Labreque D, Storer R *et al.*(2004) Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 1. Structure-activity relationships of the 4-aryl group. *Journal of medicinal chemistry*, 47(25):6299-6310.
- 24- Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C, Xu L, Lamothe S, Gourdeau H, Denis R *et al.*(2007) Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 3. Structure-activity relationships of fused rings at the 7,8-positions. *Journal of medicinal chemistry*, 50(12):2858-2864.
- 25- Kemnitzer W, Jiang S, Wang Y, Kasibhatla S, Crogan-Grundy C, Bubenik M, Labreque D, Denis R, Lamothe S, Attardo G *et al.*(2008) Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay. Part 5: modifications of the 2- and 3-positions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(2):603-607.
- 26- Kemnitzer W, Jiang S, Zhang H, Kasibhatla S, Crogan-Grundy C, Blais C, Attardo G, Denis R, Lamothe S, Gourdeau H *et al.*(2008) Discovery of 4-aryl-2-oxo-2H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay.

- Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(20):5571-5575.
- 27- Kemnitzer W, Kasibhatla S, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Jia S, Xu L, Crogan-Grundy C, Denis R, Barriault N *et al.*(2005) Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 2. Structure-activity relationships of the 7- and 5-, 6-, 8-positions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(21):4745-4751.
- 28- Khan I, Nisar M, Ahmad M, Shah H, Iqbal Z, Saeed M, Halimi SM, Kaleem WA, Qayum M, Aman A *et al.*(2011) Molecular simulations of Taxawallin I inside classical taxol binding site of beta-tubulin. *Fitoterapia*, 82(2):276-281.
- 29- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J.(200) (†Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11):935-949.
- 30- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ.(1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1):3-25.
- 31- Mun J, Jabbar AA, Devi NS, Liu Y, Van Meir EG, Goodman MM.(2012) Structure-activity relationship of 2,2-dimethyl-2H-chromene based arylsulfonamide analogs of 3,4-dimethoxy-N-[(2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)methyl]-N-phenylbenzenesulfonamide, a novel small molecule hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) pathway inhibitor and anti-cancer agent. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(14):4590-4597.
- 32- Mur Blanch N, Chabot GG, Quentin L, Scherman D, Bourg S, Dauzonne D.(2012) In vitro and in vivo biological evaluation of new 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles as cis-constrained analogs of combretastatin A4. *European journal of medicinal chemistry*, 54:22-32,
- 33- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.(2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13):1605-1612.
- 34- Pinney KG, Arthasary P, Shirali A, Edvardsen K, Chaplin DJ: (2008) Translator, Chromene-containing compounds with anti-tubulin and vascular targeting activity ,
- 35- Sanner MF.(1999) Python: a programming language for software integration and development. *Journal of molecular graphics & modelling*, 17(1):57-61.
- 36- Trott O, Olson AJ.(2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2):455-461.
- 37- van Dijk M, Wassenaar TA, Bonvin AM.(2012) A flexible, Grid-enabled web portal for GROMACS molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical theory and Computation*, 8(10):3463-3472.
- 38- Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM.(1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering*, 8(2):127-134.
- 39- Wassenaar TA, van Dijk M, Loureiro-Ferreira N, van der Schot G, de Vries SJ, Schmitz C, van der Zwan J, Boelens R, Giachetti A, Ferella L.(2012) WeNMR: structural biology on the grid. *Journal of Grid Computing*, 10(4):743-767.
- 40- Wu J, Wang J, Li M, Yang Y, Wang B, Zheng YG.(2011) Small molecule inhibitors of histone acetyltransferase Tip60. *Bioorganic chemistry*, 39(1):53-58.
- 41- Young DC, (2009) Computational drug design: A guide for computational and medicinal chemists, 344
- 42- Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O.(2011) SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of computational chemistry*, 32(11):2359-2368.

Designing new chromene compounds with anticancer activity and studying their interaction with tubulin by molecular docking method

Javaheri Moghadam M.¹, Aryapour H.¹ and Dehno Khalaji A.²

¹Biology Dept, Faculty of Basic Science, Golestan University, Gorgan

²Chemistry Dept, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan

Abstract

Currently, in silico methods considered as one of the least expensive and fastest ways for drug design and discovery in the field of therapy. In the present study, we were interested to introduce compounds, which have an important role in inhibiting tubulins polymerization as the main factor of cell division in cancerous cells using computational drug design, especially molecular docking method. For this purpose, chromene compounds, which their anticancer properties had been tested by several researchers, were gathered and based on their binding site of tubulin, new analogs were designed. Then, by using AutoDock Vina software, stronger compounds which had the lowest affinity energy, were identified and their possible interaction with the colchicine binding site analyzed by LigPlot and UCSF Chimera. Given that newly designed compounds docked to the protein structure with lower affinity energy than colchicine as the control sample, they could be the subject of further assessment as the potential pharmaceutical compounds.

Key words: Tubulin, Chromene, Molecular Docking, Cancer