

# شناسایی مهارکننده‌های جدید توبولین از منابع دریایی با استفاده از غربال‌گری مجازی مبتنی بر ساختار

سیده مریم طاهری<sup>1</sup>، حسن آریاپور<sup>2\*</sup>

1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان

2- استادیار گروه زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان

\* گرگان، صندوق پستی 155

hassan.aryapour@gmail.com

(دریافت مقاله: 94/3/25 پذیرش مقاله: 94/12/3)

**چکیده** - یکی از منابع ارزشمند دارویی، موجودات زنده دریایی می‌باشند. در دهه‌های اخیر، ارزش تجاری این موجودات و کاربرد ترکیبات استخراج شده از آنها در تحقیقات بیولوژیکی و توسعه دارویی، آنها را به عنوان یک منبع جدید و مهم برای داروهای ضدسرطانی مبدل ساخته است. میکروتوبول‌ها یکی از مهم‌ترین اهداف دارویی در سلول‌های سرطانی هستند و به‌طور گسترده‌ای مهارکننده‌های مربوط به آنها در حال توسعه می‌باشند. در این مطالعه ساختار سه بعدی بیش از سه هزار ترکیب مرتبط با منابع دریایی بهینه شدند، سپس میانگین آنها با ساختار کریستالوگرافی- $\alpha\beta$  توبولین برای جایگاه‌های اتصال کلشی‌سین و اپوتیلون با استفاده از روش غربال‌گری مجازی مبتنی بر ساختار (داکینگ) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات داکینگ نشان داد که بعضی از ترکیبات با انرژی تمایل اتصال بیشتری نسبت به مهارکننده‌های کلشی‌سین و اپوتیلون به ساختار پروتئین اتصال می‌شوند. ترکیبات MNP05655 و MNP14107 به ترتیب برای جایگاه‌های کلشی‌سین و اپوتیلون به عنوان قوی‌ترین مهارکننده‌ها شناخته شدند و می‌توانند کاندیدای مناسبی برای مهار توبولین باشند.

**کلیدواژگان:** توبولین، سرطان، داکینگ مولکولی، ترکیبات طبیعی دریایی.

## 1- مقدمه

در حال حاضر سرطان از بزرگترین بیماری‌های تهدیدکننده سلامت انسان‌ها به شمار می‌رود. سرطان بیماری است که مشخصه آن تغییر مکانیسم‌های کنترل کننده حاکم بر تکثیر و تمایز سلول می‌باشد. در حالت طبیعی سلول‌های بدن طی یک روند برنامه‌ریزی شده از بین می‌روند و سلول‌های جدید جایگزین آنها می‌شوند، گاهی اوقات این روند طبیعی از تنظیم خارج شده و

سلول‌ها در اثر تکثیر بی‌رویه تشکیل توده‌ای را می‌نمایند که می‌تواند سرطان باشد [1]. یکی از اهداف مهم دارویی در سلول‌های سرطانی میکروتوبول‌ها هستند. میکروتوبول‌ها از اجزای مهم اسکلت سلولی به شمار می‌روند و در بسیاری از فرایندهای مهم سلولی نظیر حرکت، تقسیم و تمایز، نقل و انتقالات و سیگنالینگ درون سلولی نقش دارند. توبولین هترودایمی است که به صورت محلول در سیتوپلاسم سلول وجود دارد و از یک

در دهه اخیر استفاده از روش‌های محاسباتی مولکولار-مدلینگ در یافتن درمان بیماری‌ها به خصوص سرطان، کمک زیادی به صرفه‌جویی هزینه‌ها، کاهش زمان و دستیابی سریع به ترکیبات جدید با خواص ضد سرطانی کرده است [5,6]. مولکولار داکینگ یک روش محاسباتی است که تلاش می‌کند اتصال غیرکووالان ماکرومولکول‌ها یا در اغلب موارد اتصال مؤثر بین یک ماکرومولکول (رستپور) و یک مولکول کوچک (لیگاند) را پیش‌بینی کند. فرآیند داکینگ مبتنی بر ساختارهایی است که معمولاً با استفاده از کریستالوگرافی اشعه‌ی X یا روش  $NMR^3$  و به ندرت مدل‌سازی همولوژی بدست می‌آیند و سپس به وسیله شبیه‌سازی مولکولار دینامیک پایدار می‌شوند. در نهایت هدف پیش‌بینی کونفورماسیون‌های مختلف اتصال لیگاند به رستپور می‌باشد. معتبرسازی نحوه اتصال مولکول‌های کوچک به پروتئین از اهمیت بسزایی برخوردار است، زیرا کمک زیادی به حذف نتایج کاذب و یافتن ترکیباتی با خواص دارویی از میان چندین هزار ترکیب در پایگاه‌های داده به روش غربال‌گری مجازی می‌نماید. الگوریتم مورد استفاده در داکینگ شامل تعیین جهت‌گیری، ساختار هندسی، صورت‌بندی و رتبه‌بندی ترکیب می‌باشد. رتبه‌بندی می‌تواند معیاری برای اندازه-گیری انرژی آزاد، انرژی تمایل اتصال یا نوعی معیار کیفی عددی باشد. الگوریتم‌های داکینگ به صورت خودکار سعی دارند ترکیب را در بهترین جهت‌گیری‌ها و صورت‌بندی‌ها در جایگاه فعال قرار دهند و در نهایت نمره<sup>4</sup> ای را برای هر حالت محاسبه نمایند [7].

موجودات دریایی یکی از منابع ارزشمند جهت استخراج ترکیبات دارویی می‌باشند که نسبتاً ناشناخته مانده‌اند. این موجودات به چهار گروه مهره‌داران، جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها طبقه‌بندی می‌شوند [8,9]. محصولات این ارگانسیم‌ها ترکیبات زیستی فعال هستند که در چهار دسته

زیر واحد آلفا-توبولین و یک زیر واحد بتا-توبولین تشکیل شده است. اخیراً شش نوع از ایزوفرم‌های آلفا-توبولین و هفت نوع از ایزوفرم‌های بتا-توبولین شناسایی شده‌اند. در طی فرایند پلیمریزاسیون ابتدا هتروداایمرها به یکدیگر می‌پیوندند، سپس این دایمرها در کنار هم قرار می‌گیرند و پروتوفیلامنت‌ها را می‌سازند. سیزده عدد از این پروتوفیلامنت‌ها در کنار هم به صورت یک استوانه تو خالی سازماندهی می‌شوند و ساختار اصلی میکروتوبول را می‌سازند. این پلیمرها به صورت پویا در تعادلی ناپایدار قرار دارند. هتروداایمرهای توبولینی آزاد به صورت مداوم از انتهای مثبت به ساختار میکروتوبول اضافه شده و یا از انتهای دیگر (انتهای منفی) آن جدا گشته و در محیط منتشر می‌شوند. این تعادل تحت کنترل عوامل مختلف از جمله پروتئین‌های مرتبط با میکروتوبول<sup>1</sup>، می‌باشد [2].

میکروتوبول‌ها پلیمرهای پویایی هستند که بین فاز رشد و کاهش دائماً در حال نوسانند. دینامیک میکروتوبول‌ها توسط هیدرولیز گوانوزین تری فسفات<sup>2</sup> تنظیم می‌شود [3]. این دینامیک ناپایدار میکروتوبول می‌تواند توسط عوامل شیمیایی متفاوتی به هم بریزد و باعث از دست رفتن قدرت تقسیم سلولی شود. عوامل ناپایدارکننده میکروتوبول‌ها از پلیمریزاسیون آنها جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات با اتصال به هتروداایمرهای توبولینی، پلیمریزاسیون آنها به میکروتوبول را مهار می‌کنند. از این گروه می‌توان به آلکالوئیدهای وینکا (وینکریستین، وینبلاستین، وینورلین و ویندسین)، کلشی‌سین و کریپتوفیسین‌ها اشاره کرد. عوامل پایدارکننده میکروتوبول‌ها با اتصال به جایگاه اختصاصی شان در ساختار توبولین‌ها، از فروپاشی میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌نمایند. از این گروه می‌توان به تاکسول، دیسکودرمولید و لائولیمالاید، پلوروساید A و اپوتلیون اشاره نمود [4].

3. Nuclear Magnetic Resonance

4. Score

1. MAPs (Microtubul Associated Proteins)

2. GTP

به ترتیب از بانک اطلاعات پروتئین<sup>1</sup> دانلود شدند. دایمرهای توبولین به همراه هترومولکولهای GDP، GTP و یونهای فلزی  $Mg^{+2}$  از بقیه بخش‌های اضافی پروتئینی جدا شدند. اسید آمینه‌ی شماره 1 و ریشه‌های آمینواسیدی 39 تا 45 و 441 تا 451 از زنجیره آلفا و 433 تا 445 از زنجیره بتا پروتئین 3UT5 و ریشه‌های آمینواسیدی 438 تا 451 از زیرواحد آلفا و ریشه‌های آمینواسیدی 429 تا 445 از زیرواحد بتای پروتئین 4O4I از دست رفته بودند که توسط نرم‌افزار Modeller 9.14 [14] بوسیله پرتکل DOPE مدل‌سازی و بازسازی شدند و با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ساختارهای پروتئینی بهینه‌سازی شدند.

## 2.2 شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین

به منظور بهینه‌سازی ساختار پروتئین، زنجیره‌های جانبی و اتم‌های هیدروژن موجود در ساختار پروتئین، هر کدام از پروتئین‌های 3UT5 و 4O4I به مدت 10 نانوثانیه با استفاده از میدان نیروی CHARMM27 شبیه‌سازی شدند. معادله‌ی کلی میدان CHARMM شامل مجموعه‌ای از عبارت‌ها و چندین پارامتر می‌باشد که در فرمول (1) آمده است. این میدان نیرو به دلیل دقت بالایی که در پیش‌بینی اتصال مولکول‌های کوچک به رسپتور دارد، انتخاب شد [17]. این میدان نیرو برای شبیه‌سازی پروتئین‌ها، DNA و RNA و کمپلکس‌های پروتئین و DNA از روش مکانیک مولکولی استفاده می‌کند. پارامترهای مربوط به لیگاندها توسط سرور SwissParam محاسبه شدند. سپس کمپلکس پروتئینی مورد نظر در جعبه‌ای تری‌کلینیک با فاصله 0/9 نانومتر از لبه جعبه قرار داده شد.

جعبه شبیه‌سازی از مولکول‌های آب به فرمت TIP3P پر گردید و یون‌های سدیم و کلر به غلظت 150 میلی مولار به سیستم اضافه شدند تا شرایط فیزیولوژیکی آن حفظ، و بار خالص کل سیستم صفر گردد.

پلی‌کتیدها، ترین‌ها، استروئیدها و پپتیدها قرار می‌گیرند. فعال و متنوع بودن این ترکیبات، زمینه‌ساز کاربرد آنها در تحقیقات بیولوژیک، توسعه و پیشرفت دارویی شده است. ارزش تجاری موجودات زنده دریایی آنها را به عنوان یک منبع جدید برای داروهای ضد سرطانی مورد توجه قرار داده است [10، 11]. در سال‌های اخیر تعداد قابل توجهی ترکیب دارویی از منابع دریایی کشف و ساخته شده است. بسیاری از این مولکول‌ها در مراحل ابتدایی بررسی‌های بالینی قرار دارند، اما برخی از آنها مانند Cytarabine و ET743 در حال حاضر به عنوان دارو مصرف می‌شوند. تاکنون ترکیبات دریایی بسیاری با فعالیت بیولوژیکی از میکروارگانیسم‌های دریایی، فیتوپلانکتون‌ها، جلبک سبز، قهوه‌ای، قرمز، اسفنج‌ها، نرم‌تنان، جانوران پوشش‌دار، خارپوستان، آبسواران و منگروها (شاه‌پسند) جدا شده‌اند. این ترکیبات دارای خواص ضد سرطان، ضد انعقاد، ضد قارچ، ضد مالاریا، ضد پلاکت، ضد باکتری، ضد التهاب، ضد توبرکلوزیس (سل)، ضد ویروس، ضد کرم و پروتوزوا هستند. اثرات آنها بر روی بیماری‌های آسم، آلزایمر و شیزوفرنی نیز بررسی شده است، و بر سیستم اعصاب، ایمنی و قلب و عروق مؤثر می‌باشند [12، 13]. در این تحقیق ساختار تعداد زیادی از ترکیبات استخراج شده از منابع زنده دریایی جمع‌آوری و رسم شده است و با بهره‌گیری از روش‌های غربال‌گری مجازی مبتنی بر ساختار توبولین مورد مطالعه قرار گرفتند، و میانکشن آنها با ساختار کریستالوگرافی  $\alpha\beta$ -توبولین، برای یافتن ترکیباتی با خواص ضد سرطانی قوی مورد بررسی قرار گرفت.

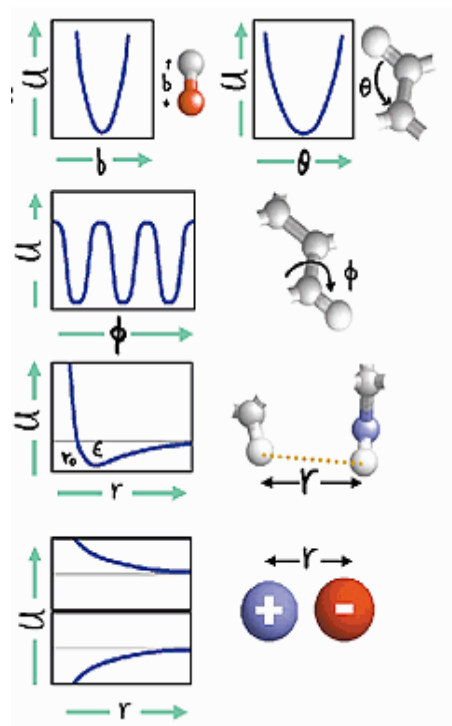
## 2- روش‌ها

### 2.1- آماده کردن و مدل‌سازی لوپ‌های پروتئین

فایل‌های کریستالوگرافی توبولین با کدهای 3UT5 و 4O4I و قدرت تفکیک‌های 2/73 و 2/4 انگستروم

1. Protein Data Bank (PDB)

$$\begin{aligned}
 U = & \sum_{All\ Bounds} \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{All\ Angles} \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{All\ Torsion\ Angles} K_\phi [1 - \cos(n\Phi + \delta)] \\
 & + \sum_{All\ nonbounded\ pairs} \epsilon [(r_0/r)^{12} - 2(r_0/r)^6] \\
 & + \sum_{All\ partial\ charges} \frac{332q_i q_j}{r}
 \end{aligned}$$



فرمول (1) معادله‌ی کلی میدان نیروی CHARMM. انرژی پتانسیل کل ( $U$ ) هر مولکول مجموع انرژی‌هایی است که به هر مولکول برای کشش پیوند، خمش زاویه پیوند، چرخش پیوند، تعاملات واندروالس و الکترواستاتیک اجازه می‌دهد. تعاملات غیرپیوندی واندروالس توسط معادله‌ی لئونارد-جونز محاسبه می‌گردد.  $K_b$ : ثابت نیروی کشش،  $K_\theta$ : ثابت نیروی کشش زاویه‌ای،  $K_\phi$ : ثابت نیروی چرخش،  $\epsilon$ : مقدار عمق چاله‌ی پتانسیل،  $b_0$ : طول کنونی باند، طول باند در حالت تعادل،  $\theta_0$ : زاویه کنونی، زاویه در حالت تعادل،  $\delta$ : زاویه دهدرال،  $r_0$ : فاصله‌ی بین دو اتم، فاصله‌ای که در آن انرژی پتانسیل بین دو اتم به کمترین مقدار می‌رسد،  $q_i$ : بار جزئی اتم‌های  $i$  و  $j$  [20].

برنامه‌ی Marvin Sketch از مجموعه‌ی ChemAxon [26] ترسیم گشتند، که مجموعاً 3516 ترکیب می‌باشند. سپس به لحاظ کمینه‌سازی انرژی، با استفاده از برنامه‌ی MolConveter از مجموعه ChemAxon [26] ساختار دوبعدی ترکیبات رسم شده به ساختارهایی سه‌بعدی تبدیل شد. در این تبدیل ترکیبات از نظر انرژی بهینه‌سازی گشتند. در نهایت بر اساس قانون پنج لیپینسکی [27] آنالوگ‌های شبه دارویی از سایر آنالوگ‌ها به‌وسیله‌ی برنامه Evaluator از مجموعه‌ی ChemAxon فیلتر شدند و فعال‌ترین ترکیبات از نظر فراهمی زیستی خوراکی انتخاب شدند.

کمینه‌سازی انرژی تا رسیدن مقدار انرژی به کمتر از 1000 کیلوژول بر مول و منفی شدن انرژی پتانسیل کل سیستم انجام گرفت. سیستم مورد نظر در دمای 310 درجه‌ی کلین و فشار یک اتمسفر به مدت 50 پیکوثانیه به تعادل رسید و در نهایت به مدت 10 نانوثانیه توسط برنامه Gromacs شبیه‌سازی گردید و نتایج حاصل شده مورد آنالیز قرار گرفت [19,18].

### 3.2- آماده‌سازی لیگاند

ابتدا ساختار ترکیبات مورد نظر (ترکیبات طبیعی دریایی) [25-21] از مقالات متعددی استخراج شدند و توسط

## 4.2- مطالعات داکینگ

فرایند داکینگ ترکیبات دریایی به جایگاه اتصال کلسی-سین و اپوتیلون در پروتئین‌های توبولین 3UT5 و 4O4I با استفاده از نرم‌افزار AutoDock Vina [28] انجام شد و تمامی محاسبات داکینگ با در نظر گرفتن پروتئین به صورت انعطاف‌ناپذیر و لیگاند به صورت انعطاف‌پذیر با استفاده از الگوریتم ژنتیک لامارکی انجام گرفت. مولکول‌های آب غیرپیوندی از ساختار کریستالوگرافی شده پروتئین موردنظر به همراه لیگاند (4O4I) به همراه اپوتیلون<sup>1</sup> و 3UT5 به همراه کلسی-سین<sup>2</sup> حذف شدند. در مرحله بعد هیدروژن‌های غیرقطبی در هم ادغام شدند و سپس بار جزئی<sup>3</sup> [15] به اتم‌های سنگین و هیدروژن‌های قطبی با استفاده از نرم‌افزار (ADT) [16] AutoDockTools اضافه گردید. جعبه شبکه<sup>4</sup> با ابعاد 36×36×36 و 32×32×32 به ترتیب در محدوده جایگاه اتصال اپوتیلون و کلسی-سین قرار داده شدند. فاصله گرید 1 انگستروم و سایر پارامترها به صورت پیش‌فرض تنظیم گردیدند. فایل خروجی Vina جهت آنالیز نتایج داکینگ وارد ADT شد و میانکشی‌های هیدروفوبیک کمپلکس‌های توبولین-لیگاند، تعداد پیوندهای هیدروژنی و طول پیوندها مورد بررسی قرار گرفت. از نرم‌افزار X-Score به منظور محاسبه انرژی تمایل اتصال کمپلکس‌های لیگاند-پروتئین حاصل از داکینگ و حذف حالت‌های داک شده کاذب<sup>5</sup> و رتبه‌بندی صحیح ترکیبات استفاده شد در این برنامه از میانگین سه تابع HPScore، HMScore و HSScore برای غربال‌گری لیگاندها استفاده می‌شود.

## 3- نتایج

### 3.1- بهینه‌سازی، مدل‌سازی و شبیه‌سازی پروتئین

ریشه‌های آمینواسیدی و لوپ‌های از دست رفته در فایل

1. Epothilone
2. Colchicine
3. Gastiger
4. Grid box
5. False positive

کریستالوگرافی پروتئین‌ها با توجه به توالی آمینواسیدی پروتئین بازسازی شدند. هر دو پروتئین 3UT5 و 4O4I دارای ریشه‌های آمینواسیدی از دست رفته در C-ترمینال هر دو زنجیره آلفا و بتا خود می‌باشد. علاوه بر این پروتئین 3UT5 دارای یک لوپ از دست رفته و یک اسیدآمینه متیونین در انتهای N زنجیره آلفا می‌باشد (شکل 1). به کمک نرم‌افزار Modeller لوپ و ریشه‌های آمینواسیدی از دست رفته مدل‌سازی شدند. امتیازات محاسبه شده برای هر کدام از بخش‌های ساخته شده در جدول 1 ذکر شده است. مقادیر RMSD حاصل از شبیه‌سازی برای پروتئین‌های 3UT5 و 4O4I به ترتیب 0/34 و 0/29 انگستروم به دست آمد (شکل 2). در نهایت پروتئین تصحیح شده، قبل و بعد از شبیه‌سازی با برنامه گرومکس به لحاظ کنفورماسیون و جهت‌یابی با پروتئین‌های اصلی دریافت شده از پایگاه داده پروتئین، مقایسه شدند (شکل 3).

### 2.3- محاسبات داکینگ و لیگاندهای منتخب

از کل 3516 ترکیب مورد مطالعه، تنها 507 ترکیب بر اساس قانون پنج لیپینسکی باقی ماندند. ترکیبات ناموافق با قانون پنج لیپینسکی (DonorH، MolWeight، LogP، AcceptorH) فیلتر و از مجموعه لیگاندها حذف شدند.

جدول 1 مقادیر حاصل از توابع امتیازدهی نرم‌افزار Modeller

Proteins	Missing Residue & Loops	GA341	ZDOPE*
3UT5	Chain a: 1& 39-45&441-451	1	-1.78
	chain b: 433-445	1	-2.04
4O4I	Chain a: 438-451	1	-2.10
	Chain b: 429-445	1	-2.09

\* Normalized Discrete Optimized Protein Energy (DOPE)

## الف

3UT5.pdb chain A 1 MRE[CISIHV]GQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFN  
 3UT5.pdb chain A 51 TFFSETGAGKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAA  
 3UT5.pdb chain A 101 NNYARGHYTIGKEIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHSGGGGTGSGFT  
 3UT5.pdb chain A 151 SLLMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDC  
 3UT5.pdb chain A 201 AFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGALNV  
 3UT5.pdb chain A 251 DLTEFQTNLVPYPRIHFP[LATYAPV]ISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPAN  
 3UT5.pdb chain A 301 QMVKCDPRHGKYMACECLLYRGD[VV]PKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTG  
 3UT5.pdb chain A 351 F[KVGIN]YQPPTVVPGGDLAKVQ[RAVCMLSNT]TAIAEAWARLDHKFDLMYA  
 3UT5.pdb chain A 401 KRAF[VHWYVGE]GME[EGEFSEAREDMAALEKDYE]EVGVDSV[EGEGEEEEEE]  
 3UT5.pdb chain A 451 Y

3UT5.pdb chain A 1; 451 ( 1 &amp; 39-45 &amp; 441-451 gap residue )

3UT5.pdb chain B 1 MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISEDHGI DPTGSYHGSD[DLQLER]INVY  
 3UT5.pdb chain B 51 YNEATGNKYVPRAILVDLEPGTMDSVRS[GPFGQIFRPDNFVF]GQSGAGNN  
 3UT5.pdb chain B 101 WAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDC[LQGFQLTHS]LGGGTGSGMGTL  
 3UT5.pdb chain B 151 LISKIREEYPDR[IMNTFSVM]PSPKVS[DTVV]EPYNATLSVHQLVENTD[ET]Y  
 3UT5.pdb chain B 201 SIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLV[SATMSGVTTCLRF]PGQLNADL  
 3UT5.pdb chain B 251 RKLAVNMVFPRLHFF[MPGFA]PLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFD[SKN]MM  
 3UT5.pdb chain B 301 AACDPRHGRYLTVAIFRGRMSMKEVDEQMLNIQKNKSSYFVEWIPNNVK  
 3UT5.pdb chain B 351 TAVCDIPRGLKMSSTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF[LHWYTG  
 3UT5.pdb chain B 401 EGMD[EMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQ]DATADE[QGEFEEEEGEDEA]

3UT5.pdb chain B 1; 445 ( 433-445 gap residue )

Helices/strands depicted in gold/green  
Gap residue depicted in red box

## ب

404I.pdb chain A 1 MRE[CISIHV]GQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFN  
 404I.pdb chain A 51 TFFSETGAGKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAA  
 404I.pdb chain A 101 NNYARGHYTIGKEIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHSGGGGTGSGFT  
 404I.pdb chain A 151 SLLMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDC  
 404I.pdb chain A 201 AFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGALNV  
 404I.pdb chain A 251 DLTEFQTNLVPYPRIHFP[LATYAPV]ISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPAN  
 404I.pdb chain A 301 QMVKCDPRHGKYMACECLLYRGD[VV]PKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTG  
 404I.pdb chain A 351 F[KVGIN]YQPPTVVPGGDLAKVQ[RAVCMLSNT]TAIAEAWARLDHKFDLMYA  
 404I.pdb chain A 401 KRAF[VHWYVGE]GME[EGEFSEAREDMAALEKDYE]EVGVDSV[EGEGEEEEEE]  
 404I.pdb chain A 451 Y

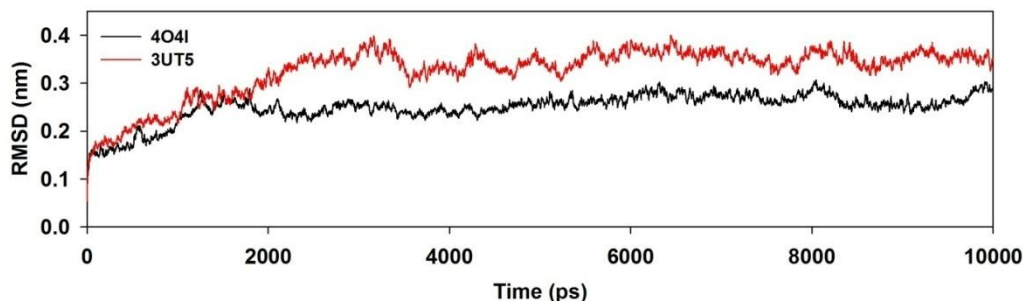
404I.pdb chain A 1; 451 ( 438-451 gap residue )

404I.pdb chain B 1 MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISEDHGI DPTGSYHGSD[DLQLER]INVY  
 404I.pdb chain B 51 YNEATGNKYVPRAILVDLEPGTMDSVRS[GPFGQIFRPDNFVF]GQSGAGNN  
 404I.pdb chain B 101 WAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDC[LQGFQLTHS]LGGGTGSGMGTL  
 404I.pdb chain B 151 LISKIREEYPDR[IMNTFSVM]PSPKVS[DTVV]EPYNATLSVHQLVENTD[ET]Y  
 404I.pdb chain B 201 CIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLV[SATMSGVTTCLRF]PGQLNADL  
 404I.pdb chain B 251 RKLAVNMVFPRLHFF[MPGFA]PLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFD[SKN]MM  
 404I.pdb chain B 301 AACDPRHGRYLTVAIFRGRMSMKEVDEQMLNVQKNKSSYFVEWIPNNVK  
 404I.pdb chain B 351 TAVCDIPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF[LHWYTG  
 404I.pdb chain B 401 EGMD[EMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQ]DATADE[QGEFEEEEGEDEA]

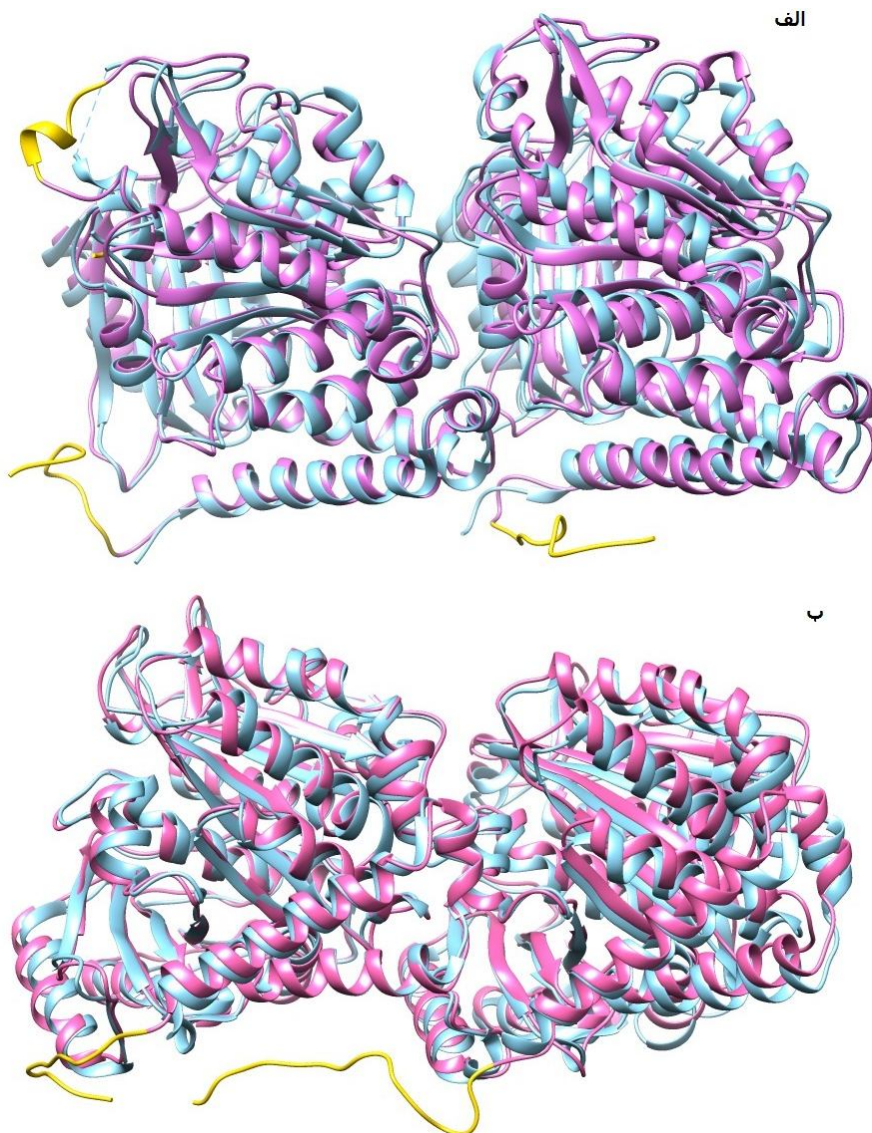
404I.pdb chain B 1; 445 ( 429-445 gap residue )

Helices/strands depicted in gold/green  
Gap residue depicted in red box

شکل 1 الف - توالی مربوط به زیرواحدهای الفا و بتا پروتئین 3UT5. ب - توالی مربوط به زیر واحدهای الفا و بتا پروتئین 404I. بخش - های مارپیچ آلفا، صفحات بتا و نواحی از دست رفته به ترتیب به رنگ طلایی، سبز و قرمز نشان داده شده‌اند.



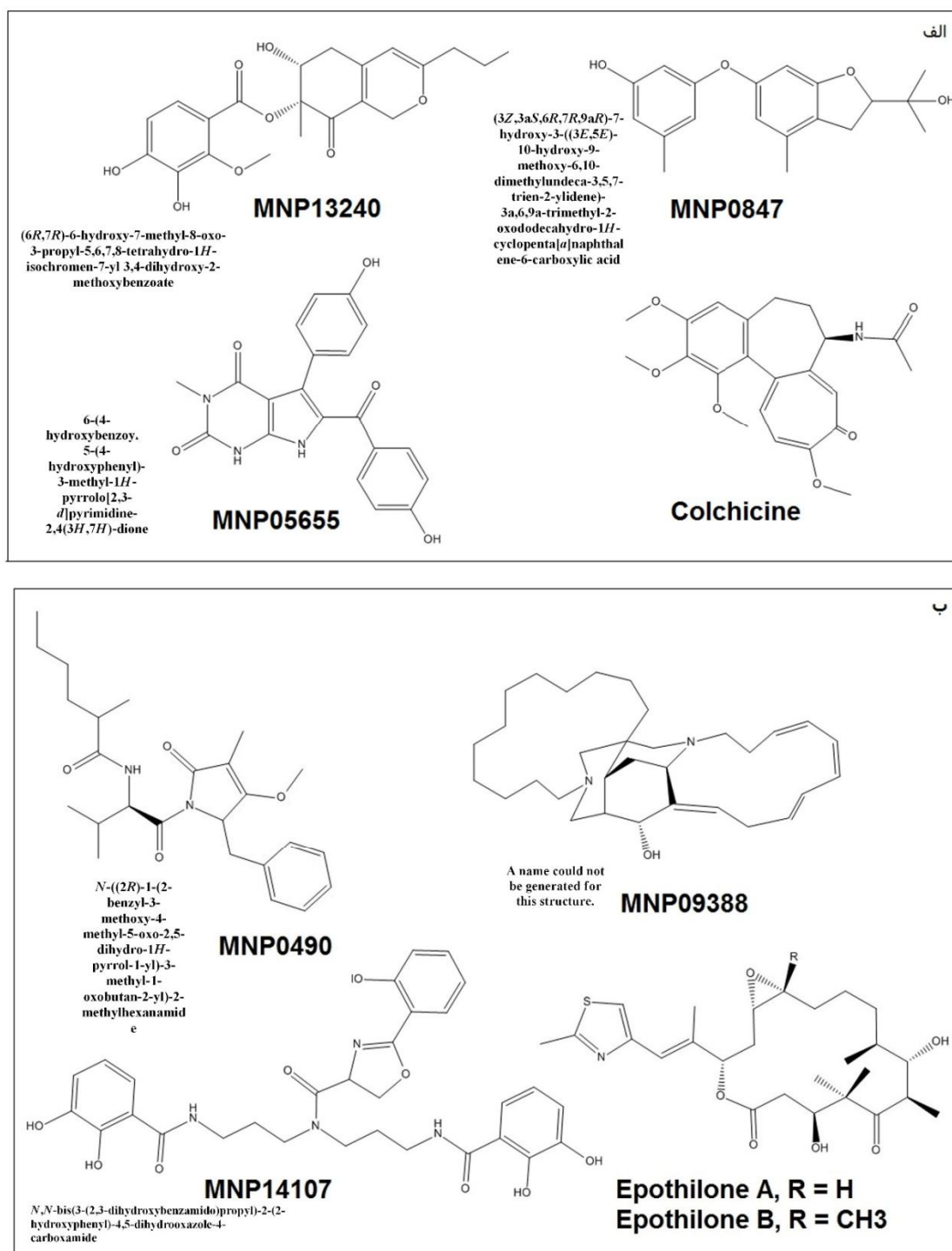
شکل 2 RMSD حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی پروتئین مدل سازی شده در 10 نانوثانیه. نمودار RMSD پروتئین 3UT5 به رنگ قرمز و نمودار RMSD پروتئین 4O4I به رنگ سیاه نمایش داده شده است.



شکل 3 انطباق ساختار سه بعدی دایمر توبولین کریستالوگرافی و مدل سازی شده بعد از شبیه سازی. الف. ساختار کریستالوگرافی پروتئین 3UT5 با رنگ آبی و ساختار پروتئین شبیه سازی شده آن با رنگ بنفش نشان داده شده است. ب. ساختار کریستالوگرافی پروتئین 4O4I با رنگ آبی و پروتئین شبیه سازی شده آن با رنگ صورتی نشان داده شده است. ریشه های آمینو اسیدی و لوپ های مدل سازی شده نیز به رنگ زرد نمایش داده شده اند.

4041 داک گردیدند. ترکیبات قویتر شناسایی و پس از تأیید با XScore انتخاب شدند (شکل 4) و (جدول 2).

تمامی محاسبات داکینگ توسط برنامه AutoDock Vina انجام پذیرفت که طی آن 507 ترکیب بهینه، به جایگاه کلشی سین و اپوتیلون به ترتیب در پروتئین‌های 3UT5 و



شکل 4 ساختار کلشی سین، اپوتیلون و ترکیبات منتخب حاصل از توابع امتیازدهی داکینگ



(جدول 2). میزان تمایل برای کلتشی سین و اپوتیلون به جایگاه خودشان به عنوان لیگاندهای کنترل مثبت به ترتیب 8- و 7/5- کیلوکالری بر مول محاسبه گردید. البته لازم به ذکر است که نرم افزار AutoDock Vina به اندازه 2 کیلوکالری بر مول انحراف استاندارد دارد. مقدار RMSD برای کلتشی سین و اپوتیلون داک شده به ترتیب 0/33 و 1/44 انگستروم محاسبه شد.

### 3-3- آنالیز نحوه میانکنش کمپلکس های پروتئین- لیگاند

پس از انجام عملیات داکینگ، و شبیه سازی مجدد این کمپلکس ها، نحوه میانکنش سه ترکیب مؤثر با پروتئین مربوطه توسط برنامه های UCSF Chimera [29] و LigPlot [30] مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول 3). تصاویر سه بعدی و دوبعدی حاصل از این برنامه ها در شکل های 5 و 6 نشان داده شده است.

جدول 2 مقادیر حاصل از انرژی تمایل اتصال، تابع نمره دهی ترکیبات منتخب و RMSD لیگاندهای مرجع

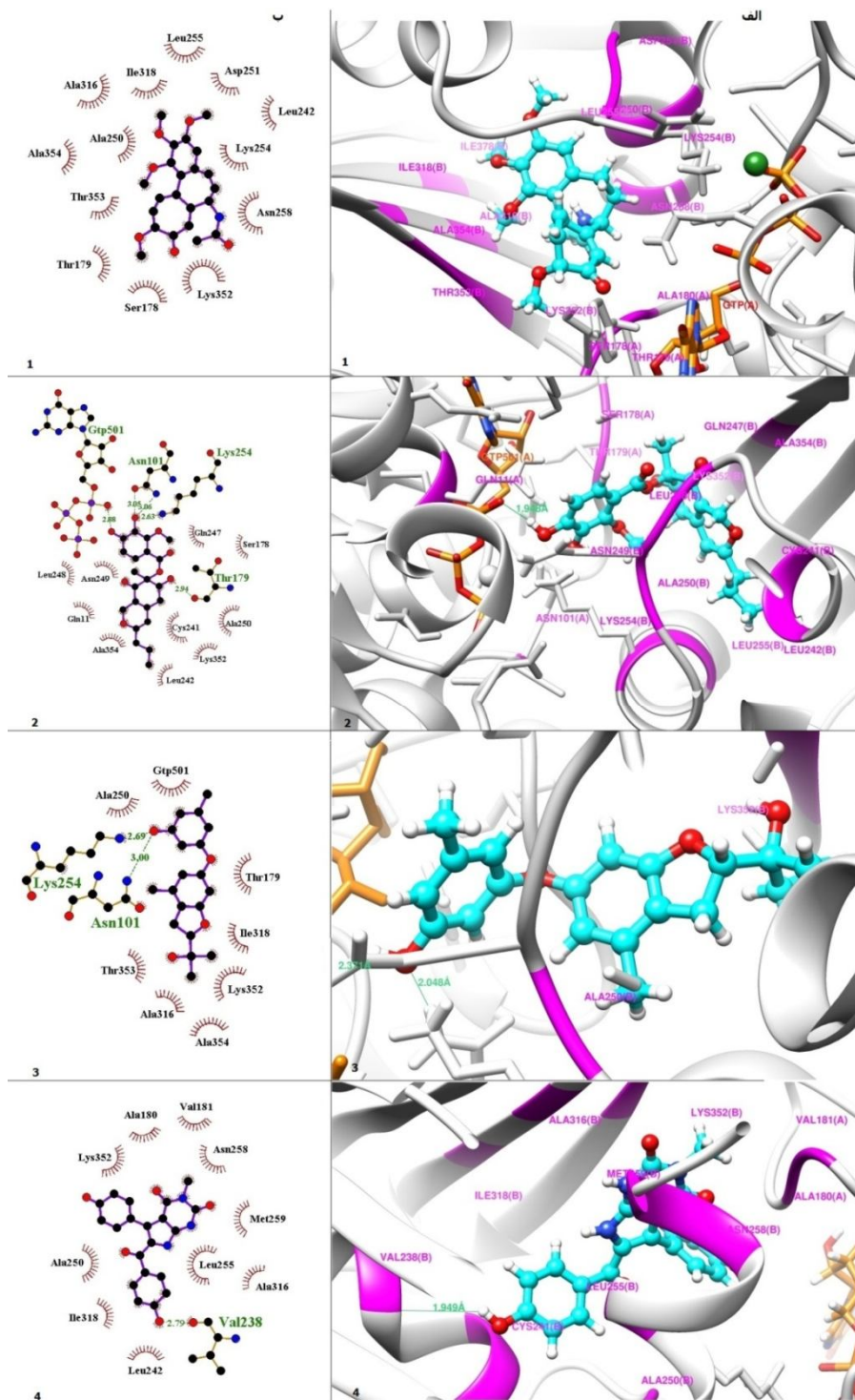
Compounds	Vina(Kcal/mol)	X-Score	RMSD(Å)
جایگاه کلتشی سین			
MNP05655	-10	6/56	-
MNP13240	-8/8	6/46	-
MNP0847	-9/1	6/44	-
Colchicine	-8	5/88	0/33
جایگاه اپوتیلون			
MNP14107	-9/8	7/37	-
MNP9388	-8/7	6/96	-
MNP0490	-7/7	6/41	-
Epothilone	-7/5	6/35	1/44

برای معتبر کردن نتایج حاصل از داک با نرم افزار Vina، لیگاندهای کلتشی سین و اپوتیلون به جایگاه خود در 3UT5 و 4O4I به ترتیب داک شدند و مقادیر RMSD برای آنها نسبت به لیگاندهای کریستاله محاسبه شد

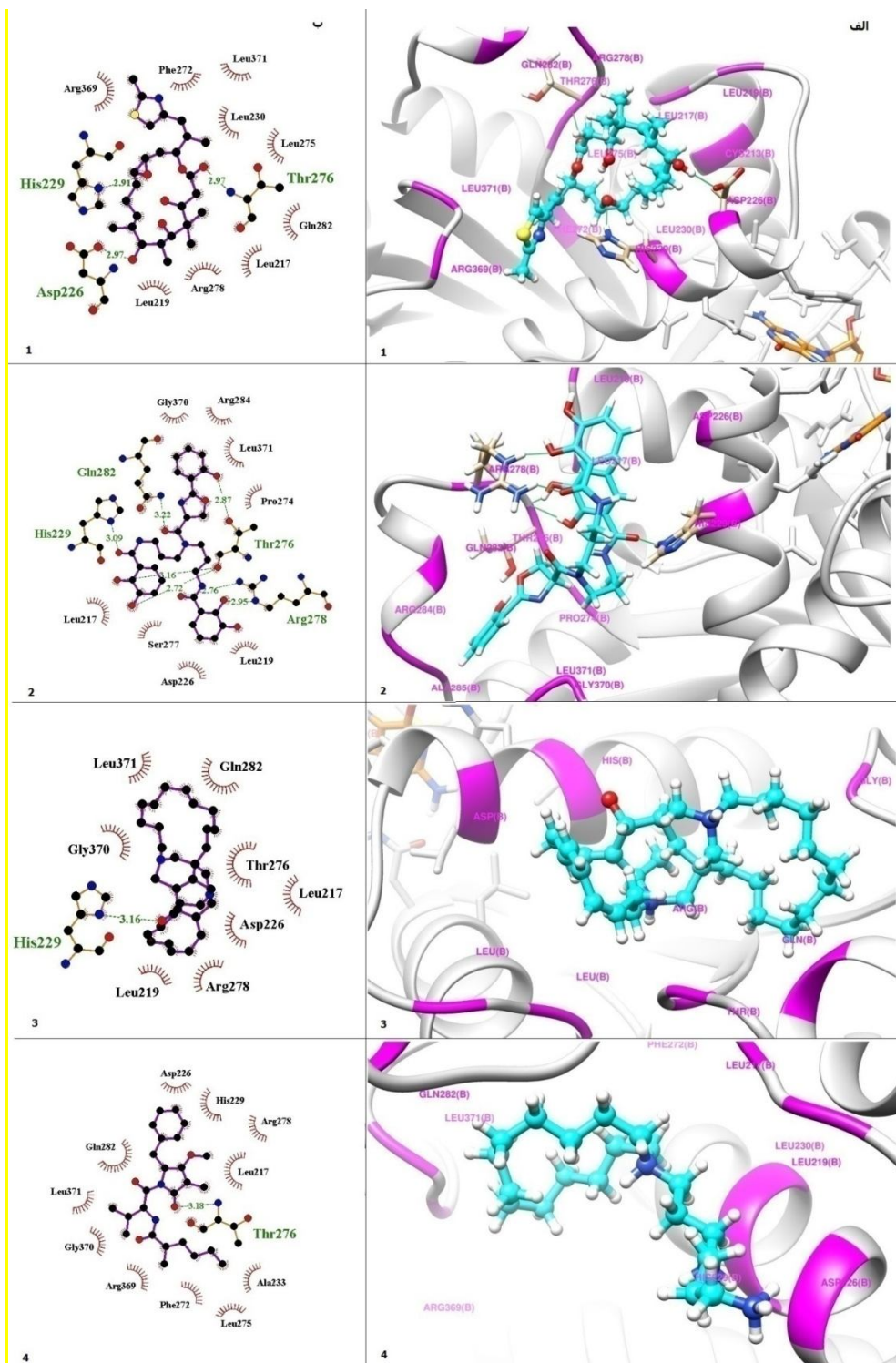
جدول 3 آنالیز اسیدهای آمینه درگیر در پیوندهای هیدروژنی و میانکنش های هیدروفوبیک با ترکیبات داک شده به جایگاه اتصال

Compounds	UCSF Chimera		LigPlot+	
	H-bonds	HI*	H-bonds	HI*
MNP05655	V238b	Chain b: V238,C241,L242,A250, L255,N258,M259,A316,I318,K352 Chain a: V181,A180	V238b	Chain b: L242,A250,L255,N258, M259,A316,I318, K352 Chain a: V181,A180
MNP13240	GTP	Chain b: L254,C241,L242,K352, Q247,A250,N249,L248, A354,L255 Chain a: N101,T179,Q11,GTP	N101a,K254b, T179b	Chain b: L254,C241,L242,K352, Q247,A250,N249,L248, K254,A354,K352 Chain a: S178,N101,T179
MNP0847	N101a,GTP	Chain b: K250,K254,A316,I318, K352,T353,A354 Chain a: Q11,N101,GTP	N101a,K254b, GTP	Chain b: K250,K254,A316,I318, K352,T353,A354 Chain a: GTP
MNP14107	H229b,R278b, T276b	Chain b: H229b,Q282,L217,L219, D226,P274,L275,T276, R278,R284,A285,G370,L371	H229b,Q282b, T276b	Chain b: L217,L219,D226,H229, P274, T276,S277,Q282, R284,A285,G370,L371
MNP9388	---	Chain b: L217,L219,D226,H229, T276,R278,Q282, G370,L371	H229b	Chain b: L217,L219,D226,H229, T276,R278,Q282,G370, L371
MNP0490	T276b	Chain b: L217, D226, H229,L230, A233,F272,L275,T276, S277, R278,Q282,R369,G370,L371	T276b	Chain b: L217,D226,H229,A233, F272,L275,R278,Q282, R369,G370,L371

\*Hydrophobic Interactions



شکل 5 برهمکنش‌های احتمالی ترکیبات منتخب با جایگاه اتصال کلتشی سین در پروتئین 3UT5. الف - تصاویر سه‌بعدی مدل گوی و میله حاصل از برنامه UCSF Chimera - ب - تصاویر دوبعدی مدل گوی و میله حاصل از برنامه LigPlot. (1) کلتشی سین، 2. ترکیب MNP13240، 3. ترکیب MNP0847، 4. ترکیب MNP05655). در تصاویر حاصل از LigPlot، پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز نقطه‌چین، برهمکنش‌های غیرپیوندی با رنگ خاکی، اتم‌های درگیر در برهمکنش‌های هیدروفوب با رنگ مشکی منشعب، اتمهای کربن با رنگ مشکی، اکسیژن با رنگ قرمز، نیتروژن با رنگ آبی، و فلور با رنگ سبز نشان داده شده‌است. در UCSF Chimera، در ساختار لیگاند اتم‌های کربن با رنگ فیروزه‌ای، نیتروژن با رنگ آبی، اکسیژن با رنگ قرمز، فلئور با رنگ سبز، ساختار پروتئین با رنگ خاکستری و ریشه‌های آمینواسیدی درگیر در پیوند هیدروژنی و هیدروفوب با رنگ صورتی، پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز به نمایش گذاشته شده است.



**شکل 6** برهمکنش‌های احتمالی ترکیبات منتخب با جایگاه اتصال اپوتیلون در پروتئین 4O4I. الف. تصاویر سه‌بعدی حاصل از برنامه UCSF Chimera. ب. تصاویر دوبعدی حاصل از برنامه LigPlot. (1. اپوتیلون، 2. ترکیب MNP14107، 3. ترکیب MNP09388، 4. ترکیب MNP04288). در ساختار لیگاند پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز نقطه‌چین، برهمکنش‌های غیرپیوندی با رنگ خاکی، اتم‌های درگیر در برهمکنش‌های هیدروفوب با رنگ مشکی منشعب، اتم‌های کربن با رنگ مشکی، اکسیژن با رنگ قرمز، نیتروژن با رنگ آبی، و فلور با رنگ سبز نشان داده شده‌است. در UCSF Chimera در ساختار لیگاند اتم‌های کربن با رنگ فیروزه‌ای، نیتروژن با رنگ آبی، اکسیژن با رنگ قرمز، فلور با رنگ سبز، ساختار پروتئین با رنگ خاکستری و ریشه‌های آمینواسیدی درگیر در پیوند هیدروژنی و هیدروفوب با رنگ صورتی، پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز به نمایش گذاشته شده است.

## 4- بحث

مختلفی با شکست مواجه می‌شوند. حتی برخی از پروژه‌ها به دلیل اینکه نمی‌توانند روش‌های سنجش مناسب یا مدل حیوانی مناسب را برای انجام آزمایش‌های مربوط به بررسی عملکرد ترکیبات مورد نظر پیدا کنند، هرگز آغاز نمی‌شوند. استفاده از علم بیوانفورماتیک این امکان را فراهم ساخته تا این قبیل پروژه‌ها که با شکست مواجه شده بودند، با به‌کارگیری روش‌های *in silico* امکان‌پذیر شوند [33].

طبق مطالعات Khanfar و همکاران، چندین ترکیب استخراج شده از اسفنج *hemimyscale arabica* در دریای سرخ، دارای غلظت مهاری در محدوده‌ی 4 تا 20 میکرومولار بر رده سلولی سرطان پروستات PC-3M در شرایط *in vitro* می‌باشند. مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که ترکیب فوق به آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز  $3\beta$  کبدی (GSK-3 $\beta$ ) متصل شده و مانع فعالیت آن می‌شود. افزایش سطح گلیکوژن کبدی در شرایط *in vivo* این موضوع را تأیید کرد. سوبسترای دیگر این آنزیم در سلول، تائو پروتئین (پروتئین متصل شونده به میکروتوبول) می‌باشد. آنزیم GSK-3 $\beta$ ، تائو فسفریلاز کیناز نیز نامیده می‌شود، فسفریلاسون غیرطبیعی ریشه‌های آمینواسیدی 396 و Ser199 این پروتئین منجر به از هم گسیختگی فیلامنت‌ها می‌شود که می‌تواند پیامی برای شروع درهم ریختن سیستم سیتواسکلتون نوروها باشد [34].

ترکیبات طبیعی مشتق شده از ارگانسیم‌های دریایی طیف گسترده‌ای از اثرات ضد توموری را از خود نشان داده‌اند، که سبب جلب توجه بسیاری از محققان به توسعه این ترکیبات شده است. ساختارهای شیمیایی منحصربه‌فرد ترکیبات با منشاء دریایی، مکانیسم‌های متفاوتی را در القای آپاپتوز بر رده‌های مختلف سلول‌های توموری باعث شده است [31]. تاکنون مطالعات انجام شده منجر به کشف داروهای بسیاری از منابع زنده دریایی گشته که در حال حاضر توسط شرکت‌های تجاری تحت آزمایش‌های بالینی قرار دارند. در جدول 4 برخی از این نمونه داروها که در تداخل با شبکه میکروتوبولی می‌باشند، نشان داده شده است [33,32].

با تمام تلاش‌های صورت گرفته برای جداسازی داروهای جدید از منابع دریایی، به دلیل موانع موجود بر سر راه تولید انبوه این داروها، از جمله محدودیت ذخایر موجودات دریایی، دشوار بودن کشت و تکثیر این موجودات و جداسازی مواد دارویی از آنان، تولید بسیاری از این ترکیبات دارویی همچنان در مقیاس آزمایشگاهی باقی مانده است. با این حال با توجه به روند رو به رشد علوم مرتبط با شیمی دارویی، داروهای دریایی دورنمایی بسیار درخشان دارد. توسعه‌ی تحقیقات علمی در این زمینه منجر به ایجاد و گسترش شیوه‌های درمانی کارآمدتر خواهد شد. بیشتر پروژه‌های طراحی دارو به دلایل

جدول 4 برخی از عوامل دریایی تداخل‌کننده با میکروتوبول که در فازهای مختلف بالینی جهت درمان سرطان می‌باشند

Compound	Source	Chemical class	Company	Disease area	Status
Dolastatin-10	Sea slug	Peptide	NCI/Knoll	Cancer	Phase II
ILX651	Sea slug	Peptide	Ilex Onco.	Cancer	Phase I
Cemadotin	Sea slug	Peptide	Knoll	Cancer	Phase II
Discodermolide	Sponge	Polyketide	Novartis	Cancer	Phase I
HTI286	Sponge	Tripeptide	Wyeth	Cancer	Phase I
E7389	Sponge	Macrolide	Eisai Inc.	antitumor	Phase III
E7974	Sponge	Tripeptide	Eisai Inc.	antitumor	Phase I
LY355703, CRYPTO 52	Cyanobacterium	Cryptophycin	-----	antitumor	Preclinical

بیشتری (تمایل کمتری) نسبت به لیگاندهای مرجع در جایگاه اتصال متصل می‌شوند، نتایج حاصل از برنامه X-Score نیز این موضوع را تأیید می‌نماید. آنالیز بیشتر نتایج داکینگ حاصل از لیگاندهای مرجع نشان داد که برای کلشی‌سین ریشه‌های آمینواسیدی Ser178، Thr179، Ala180 از زنجیره آلفا و Cys241، Leu255، Ala316، Ile318، Lys352، Ala354 از زنجیره بتا درگیر در پیوند غیرکووالان می‌باشند. مطالعات داکینگ انجام شده توسط Coluccia و همکاران بر روی پروتئین نشان داد که کلشی‌سین بیشتر با ریشه‌های آمینواسیدی Met259، Lys353، Leu248، Cys240، Leu255، Ala355 از زنجیره بتا و Asn100 و Val180 از زنجیره آلفا درگیر پیوندهای غیرکووالان می‌باشد [36].

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ترکیب MNP13240 با ریشه‌های آمینواسیدی Cys241، Leu248، Lys352، Leu255، Leu354، Asn101 و MNP05655 از طریق ریشه‌های آمینواسیدی Cys241، Leu248، Lys352، Ala180 و Met259 با 3UT5 برهمکنش غیرکووالان می‌دهند. ترکیب MNP0847 از طریق ریشه‌های آمینواسیدی Cys241، Leu248، Lys352، Ala354، Asn101، Ile318، Ala316 درگیر برهمکنش‌های هیدروفوبیک می‌شود.

Giannakakou و همکاران ریشه‌های آمینواسیدی درگیر در برهمکنش پروتئین 1TUB با اپوتیلون را بدین شرح گزارش کردند. Leu273، Leu215، Leu228، Phe270 و Arg282 (Gln282) فرم جهش یافته Arg282 است که پیوند هیدروژنی می‌دهد) از زنجیره بتا درگیر برهمکنش غیرکووالان و Thr274 (Ile274) فرم جهش یافته Thr274 است که سبب برهمکنش قوی‌تر اپوتیلون با توبولین می‌شود) درگیر پیوند هیدروژنی با لیگاند می‌باشند [37]. Ayoub و همکاران محاسبات غربالگری مجازی بر روی

مقایسه پروتئین‌های 3UT5 و 4O4I مدل‌سازی شده و شبیه‌سازی شده با پروتئین‌های کریستاله مرتبط، نشان داد که پروتئین‌های مدل‌سازی شده دارای ساختار سه‌بعدی منطقی می‌باشند، مقدار RMSD برای پروتئین‌های شبیه‌سازی شده 3UT5 و 4O4I با پروتئین کریستاله‌ای آنها به ترتیب 0/34 و 0/29 انگستروم محاسبه گشت. علاوه بر این معتبرسازی مطالعات داکینگ نیز با اندازه‌گیری RMSD بین اپوتیلون و کلشی‌سین داک شده با فرم کریستاله آنها انجام گرفت که مقادیر آن به ترتیب 1/44 و 0/33 انگستروم شد. مقادیر محاسبه شده RMSD در این پژوهش کمتر از 2 انگستروم می‌باشد که خود نشان‌دهنده-ی انجام درست فرایند داکینگ و پیش‌بینی صحیح جایگاه اتصال لیگاندهای مرجع توسط برنامه Vina می‌باشد و پارامترهای لحاظ شده در داک لیگاندها مناسب هستند.

برای بررسی دقیق میانکنش کمپلکس‌های لیگاند-پروتئینی استفاده از روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی حائز اهمیت می‌باشد. معمولاً نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به داده‌های آزمایشگاهی بسیار نزدیک می‌باشند. در واقع صحت نتایج داکینگ به طور مستقیم به کیفیت ساختار کریستالوگرافی جایگاه فعال پروتئین وابسته است. لذا در این مطالعه ابتدا نتایج حاصل از مطالعات داکینگ تا رسیدن کمپلکس‌های لیگاند-پروتئینی به حالت تعادل شبیه‌سازی شدند. سپس میانکنش‌های بین لیگاند با پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

توابع امتیازدهی در برنامه Vina بر اساس داده‌های تجربی می‌باشد، و از الگوریتم بهینه‌کننده‌ی جستجوی محلی تکرارشونده استفاده می‌نماید که باعث افزایش سرعت و دقت داکینگ نسبت به الگوریتم ژنتیک و الگوریتم ژنتیکی لامارکین می‌گردد [35].

انرژی تمایل اتصال برای بهترین حالت‌های اپوتیلون و کلشی‌سین به ترتیب 7/5- و 8- کیلوکالری بر مول بدست آمد. این در حالی است که سایر لیگاندها با انرژی

404I به وضوح دیده می‌شوند. اسیدهای آمینه Lys352, Ala316, Ile318, Leu255, Lys254, Leu248, Cys241 از پروتئین 3UT5 و اسیدهای آمینه Leu217, Asp226, Leu275, Arg369, Leu371 از پروتئین 404I در برهمکنش‌های غیرکووالان بیشترین حضور را دارند. تصاویر سه‌بعدی حاصله از برنامه UCSF Chimera برهمکنش این ریشه‌های آمینواسیدی را تأیید می‌کند. اسیدآمینه‌های Cys241, Leu248, Lys352 و Leu217 از زنجیره بتا را به ترتیب می‌توان برای جایگاه‌های کلشی‌سین و اپوتیلون به عنوان ریشه‌های آمینواسیدی کلیدی معرفی کرد.

## 5- منابع

- [1] Ayoub, A.T., M. Klobukowski, and J. Tuszynski, *Similarity-based virtual screening for microtubule stabilizers reveals novel antimetabolic scaffold*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2013. **44**: pp. 188-196.
- [2] Attard, G., et al., *Update on tubulin-binding agents*. Pathol Biol (Paris), 2006. **54**(2): pp. 72-84.
- [3] Yajima, H., et al., *Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy*. The Journal of cell biology, 2012. **198**(3): pp. 315-322.
- [4] Richard A. Stanton, K.M.G., 2 James H. Nettles, 3 and Ritu Aneja1, *Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective*. Wiley Online Library, 2011: pp. 443-481.
- [5] Mahboobi, A., A. Sellmer, and T. Beckers, *Development of tubulin inhibitors as antimetabolic agents for cancer therapy*. Bioactive Natural Products 2006. **33**: pp. 719-750.
- [6] Sallam, A.A., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of dibromotyrosine analogues inspired by marine natural products as inhibitors of human prostate cancer*

عوامل پایدارکننده توبولین 1TVK انجام دادند. نتایج حاصل از داکینگ مجدد اپوتیلون A ریشه‌های آمینواسیدی Thr274, His227 و Arg276 را درگیر در پیوند هیدروژنی نشان داد، و لیگاند جدیدی را معرفی کردند که در جایگاه اپوتیلون قرار می‌گیرد، و ریشه‌های آمینواسیدی Thr274, Arg282, Arg318, Ala231 و Asp26 را برای این لیگاند، درگیر در پیوند هیدروژنی گزارش کردند [1].

در مطالعات داکینگ ما بر روی برهمکنش بین ترکیبات (اپوتیلون در داک مجدد) با پروتئین توبولین در جایگاه اتصال اپوتیلون، معمول‌ترین ریشه‌های آمینواسیدی درگیر در برهمکنش‌ها باقیمانده‌های Leu217, Leu275, Phe279, Thr276, Arg278, Arg369, Leu371, His229, Asp226 و Gln282 بودند که در بین آنها Thr276, His229 و Arg278 بیش‌ترین حضور را در برقراری پیوند هیدروژنی دارند.

با انجام عملیات داکینگ مشخص شد تعدادی از ترکیبات طبیعی دریایی، انرژی تمایل اتصال پایین‌تری نسبت به کلشی‌سین و اپوتیلون داشته‌اند. نسبت به لیگاندهای کنترل مثبت، برای قرارگیری در جایگاه اتصال اختصاصی‌تر عمل نموده‌اند. پایین‌تر بودن میزان این انرژی بدین معناست که تمایل لیگاند برای اتصال به جایگاه بیشتر می‌باشد. ترکیبات منتخب به جایگاهشان بر روی توبولین داک شدند و بر اساس انرژی تمایل اتصال و امتیاز حاصل از توابع نمره‌دهی X-Score رتبه‌بندی شدند (جدول 1).

برای استنباط راحت‌تر و درک بهتر جایگاه اتصال لیگاند بر روی پروتئین، قرارگیری لیگاندها در این جایگاه و نحوه میانکنش این لیگاندها با توبولین، از نرم‌افزار LigPlot استفاده شد که تصویر دوبعدی از این میانکنش‌ها را به نمایش گذاشت. در این تصاویر پیوند هیدروژنی اسید آمینه Thr179 برای پروتئین 3UT5 و اسیدهای آمینه Thr276, Arg278, Gln282 و His229 برای پروتئین

- language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 1999. **17**(1): pp. 57-61.
- [17] Price, D.J. and C.L. Brooks, *Modern protein force fields behave comparably in molecular dynamics simulations*. *Journal of computational chemistry*, 2002. **23**(11): pp. 1045-1057.
- [18] Bjelkmar, P., et al., *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*, 2010. **6**(2): pp. 459-466.
- [19] van Dijk, M., T.A. Wassenaar, and A.M. Bonvin, *A flexible, grid-enabled web portal for GROMACS molecular dynamics simulations*. *Journal of Chemical theory and Computation*, 2012. **8**(10): pp. 3463-3472.
- [20] Altmann, K.H., et al., *The chemistry and biology of epothilones—the wheel keeps turning*. *ChemMedChem*, 2007. **2**(4): pp. 396-423.
- [21] Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Natural product reports*, 2008. **25**(1): pp. 35-94.
- [22] Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Natural product reports*, 2009. **26**(2): pp. 170.
- [23] Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Natural product reports*, 2013. **30**(2): pp. 237-323.
- [24] Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Natural product reports*, 2014. **31**(2): pp. 160-258.
- [25] Blunt, J.W., et al., *Review: Marine natural products*. *Natural Product Reports*, 2005.
- [26] Available from: <http://www.chemaxon.com>.
- [27] Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Advanced drug delivery reviews*, 1997. **23**(1): pp. 3-25.
- [28] Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. *J Comput proliferation, invasion, and migration*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2010. **18**(21): pp. 7446-7457.
- [7] Schneider, G. and H.-J. Böhm, *Virtual screening and fast automated docking methods*. *Drug Discovery Today*, 2002. **7**(1): pp. 64-70.
- [8] Folmer, F., et al. *The inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by marine natural products*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **78**(6): pp. 592-606.
- [9] Gul, W. and M.T. Hamann, *Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases*. *Life Sciences*, 2005. **78**(5): pp. 442-453.
- [10] Erwin, P.M., S. López-Legentil, and P.W. Schuhmann, *The pharmaceutical value of marine biodiversity for anti-cancer drug discovery*. *Ecological Economics*, 2010. **70**(2): pp. 445-451.
- [11] Mayer, A.M. and K.R. Gustafson, *Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(18): pp. 2676-704.
- [12] Blunt, J.W., et al., *Review: marine natural products*. 2011.
- [13] Mayer, A.M., et al., *Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007. **145**(4): pp. 553-581.
- [14] Fiser, A., R.K.G. Do, and A. Šali, *Modeling of loops in protein structures*. *Protein science*, 2000. **9**(9): pp. 1753-1773.
- [15] Gasteiger, J. and M. Marsili, *A new model for calculating atomic charges in molecules*. *Tetrahedron Letters*, 1978. **19**(34): pp. 3181-3184.
- [16] Sanner, M.F., *Python: a programming*

- drugs, 2010. **8**(10): pp. 2702-2720.
- [34] Khanfar, M.A., et al., *The marine natural-derived inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta phenylmethylene hydantoin: In vitro and in vivo activities and pharmacophore modeling*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(16): pp. 6032-9.
- [35] Morris, G.M., et al., *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. Journal of computational chemistry, 1998. **19**(14): pp. 1639-1662.
- [36] Coluccia, A., D. Sabbadin, and A. Brancale, *Molecular modelling studies on Arylthioindoles as potent inhibitors of tubulin polymerization*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(8): pp. 3519-25.
- [37] Giannakakou, P., et al., *A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(6): pp. 2904-2909.
- Chem, 2010. **31**(2): pp. 455-61.
- [29] Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis*. Journal of computational chemistry, 2004. **25**(13): pp. 1605-1612.
- [30] Wallace, A.C., R.A. Laskowski, and J.M. Thornton, *LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions*. Protein engineering, 1995. **8**(2): pp. 127-134.
- [31] von Schwarzenberg, K. and A.M. Vollmar, *Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: Marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy*. Cancer Letters, 2013. **332**(2): pp. 295-303.
- [32] Haefner, B., *Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates*. Drug Discovery Today, 2003. **8**(12): pp. 536-544.
- [33] Bhatnagar, I. and S.-K. Kim, *Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies*. Marine