زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 7، شماره 3، ویژه‌نامه 1395

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

سیده مریم طاهری[1]، حسن آریاپور[2*]

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

2- استادیار گروه زیست‌شناسی، گروه زیست شناسی، 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 درتحقیقات 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 میانکنش آنها با ساختار کریستالوگرافی-αβ 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 هترودایمری است که به صورت محلول در سیتوپلاسم سلول وجود دارد و از یک

زیر واحد آلفا-توبولین و یک زیر واحدبتا-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 هترودایمرها 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 به‌صورت پویا در تعادلی ناپایدار قرار دارند. هترودایمرهای 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[1]، می‌باشد [2].

میکروتوبول‌ها پلیمرهای پویایی هستند که بین فاز رشد و کاهش دائما درحال نوسانند. دینامیک میکروتوبول‌ها توسط هیدرولیز گوانوزین‌تری‌فسفات[2] تنظیم می‌شود [3]. این دینامیک ناپایدار میکروتوبول می‌تواند توسط عوامل شیمیایی متفاوتی به‌هم بریزد و باعث از دست رفتن قدرت تقسیم سلولی شود. عوامل ناپایدارکننده میکروتوبول‌ها از پلیمریزاسیون آنها جلوگیری می‌کنند. این ترکیبات با اتصال به هترودایمرهای توبولینی، پلیمریزاسیون آنها به میکروتوبول را مهار می‌کنند. از این گروه می‌توان به آلکالوئیدهای وینکا (وینکریستین، وینبلاستین، وینورلبین و ویندسین)، کلشی‌سین و کریپتوفیسین‌ها اشاره کرد. عوامل پایدارکننده میکروتوبول‌ها با اتصال به جایگاه اختصاصی‌شان در ساختار توبولین‌ها، از فروپاشی میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌نمایند. از این گروه می‌توان به تاکسول، دیسکودرمولید و لائولیمالاید، پلوروسایدA و اپوتلیون اشاره نمود [4].

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 [6،5]. مولکولار داکینگ یک روش محاسباتی است که تلاش می‌کند اتصال غیرکووالان ماکرومولکول‌ها یا در اغلب موارد اتصال مؤثر بین یک ماکرومولکول (رسپتور) 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 رسپتور 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[4]ای را برای هر حالت محاسبه نمایند [7].

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

1. MAPs (Microtubul Associated Proteins)
2. GTP
3. Nuclear Magnetic Resonance
4. Score

پلی‌کیتیدها، ترپن‌ها، 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 داده‌است [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 پروتوزوآ هستند. اثرات آنها بر روی بیماری‌های آسم، آلزایمر و شیزوفرنی نیز بررسی شده است، و بر سیستم اعصاب، ایمنی و قلب‌وعروق 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 میانکنش آنها با ساختار کریستالوگرافی αβ-توبولین، برای یافتن ترکیباتی با خواص ضد سرطانی قوی مورد بررسی قرار گرفت.

2- روش‌ها

2ـ1ـ آماده کردن و مدل‌سازی لوپ‌های پروتئین

فایل‌های کریستالوگرافی توبولین با کدهای 3UT5 و 4O4I و قدرت تفکیک‌های 2/73 و 2/4 انگستروم به‌ترتیب از بانک اطلاعات پروتئین[1] دانلود شدند. دایمرهای توبولین به همراه هتروملکول‌هایGDP، GTP و یون‌های فلزی Mg^{+2} از بقیه بخش‌های اضافی پروتئینی جدا شدند. اسیدآمینه‌ی 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.

2ـ2ـ 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 مجموعه ای 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 شراط فیزیولوژیکی آن حفظ، و بار خالص کل سیستم صفر گردد.

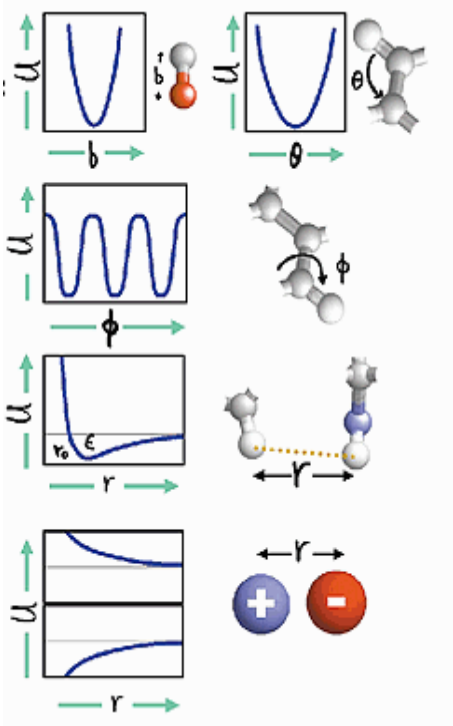
1. Protein Data Bank (PDB)

$$U = \sum_{All\ Bounds} \frac{1}{2}K_b(b-b_0)^2 + \sum_{All\ Angles} \frac{1}{2}K_\theta(\theta-\theta_0)^2$$

$$+ \sum_{All\ Torsion\ Angles} K_\Phi[1-\cos(n\Phi+\delta)]$$

$$+ \sum_{All\ nonbounded\ pairs} \varepsilon[(r_0/r)^{12} - 2(r_0/r)^6]$$

$$+ \sum_{All\ partial\ charges} 332 q_i q_j / r$$



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_θ: ثابت نیروی کشش زاویه‌ای، K_Φ: ثابت نیروی چرخش، ε: مقدار عمق چاله‌ی پتانسیل، b، b_0: طول کنونی باند، طول باند در حالت تعادل، θ، θ_0: زاویه کنونی، زاویه در حالت تعادل، δ: زاویه دهدرال، r، r_0: فاصله‌ی بین دو اتم، فاصله‌ای که در آن انرژی پتانسیل بین دو اتم به کمترین مقدار می‌رسد، q_i، q_j: بار جزئی اتم‌های i و j [20].

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 کلوین 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 [18،19].

2ـ3ـ آماده‌سازی لیگاند

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

2ـ4ـ مطالعات داکینگ

فرایند داکینگ ترکیبات دریایی به جایگاه اتصال کلشی-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[1] و 3UT5 به همراه کلشی‌سین[2]) حذف شدند. در مرحله بعد هیدروژن‌های غیرقطبی درهم ادغام شدند و سپس بار جزئی[3] [15] به اتم‌های سنگین و هیدروژن‌های قطبی با استفاده از نرم‌افزار AutoDockTools[16] (ADT) اضافه گردید. جعبه شبکه[4] با ابعاد 36×36×36 و 32×32×32 به ترتیب در محدوده جایگاه اتصال اپوتیلون و کلشی‌سین 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 میانکنش‌های هیدروفوبیک کمپلکس‌های توبولین-لیگاند، تعداد پیوندهای هیدروژنی و طول پیوندها مورد بررسی قرار گرفت. از نرم‌افزار X-Score به منظور محاسبه‌ی انرژی تمایل اتصال کمپلکس‌های لیگاند-پروتئین حاصل از داکینگ و حذف حالت‌های داک شده کاذب[5] و رتبه‌بندی صحیح ترکیبات استفاده شد در این برنامه از میانگین سه تابع HPScore، HMScore و HSScore برای غربال‌گری لیگاندها استفاده می‌شود.

3ـ نتایج

3ـ1ـ بهینه‌سازی، مدل‌سازی و شبیه‌سازی پروتئین

ریشه‌های آمینواسیدی و لوپ‌های از دست رفته در فایل 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 ازدست 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 هرکدام 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).

3ـ2ـ 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 (LogP، MolWeight، DonorH، AcceptorH) فیلتر و از مجموعه لیگاندها حذف شدند.

جدول 1 مقادیر حاصل از توابع امتیازدهی نرم‌افزار Modeller برای پروتئین‌های مدل‌سازی شده

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)

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

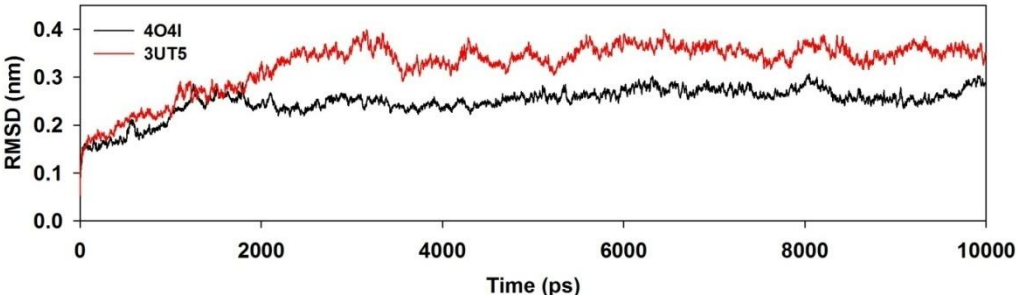
الف

```
3UT5.pdb chain A   1 MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFN
3UT5.pdb chain A  51 TFFSETGAGKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAA
3UT5.pdb chain A 101 NNYARGHYTIGKEIIDLVLDRIRKLADQCTGLQGFLVFHSFGGGTGSGFT
3UT5.pdb chain A 151 SLLMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDC
3UT5.pdb chain A 201 AFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGALNV
3UT5.pdb chain A 251 DLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
3UT5.pdb chain A 301 QMVKCDPRHGKYMACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTG
3UT5.pdb chain A 351 FKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLMYA
3UT5.pdb chain A 401 KRAFVHWYVGEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEGEE
3UT5.pdb chain A 451 Y
3UT5.pdb  chain A 1; 451 ( 1 & 39-45 & 441-451 gap residue )
3UT5.pdb chain B   1 MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGDSDLQLERINVY
3UT5.pdb chain B  51 YNEATGNKYVPRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNN
3UT5.pdb chain B 101 WAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTL
3UT5.pdb chain B 151 LISKIREEYPDRIMNTFSVMPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETY
3UT5.pdb chain B 201 SIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADL
3UT5.pdb chain B 251 RKLAVNMVPFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDSKNMM
3UT5.pdb chain B 301 AACDPRHGRYLTVATIFRGRMSMKEVDEQMLNIQNKNSSYFVEWIPNNVK
3UT5.pdb chain B 351 TAVCDIPPRGLKMSSTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTG
3UT5.pdb chain B 401 EGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA
3UT5.pdb  chan B 1; 445 ( 433-445 gap residue )
Helices/strands depicted in gold/greer
Gap residue depicted in red box
```

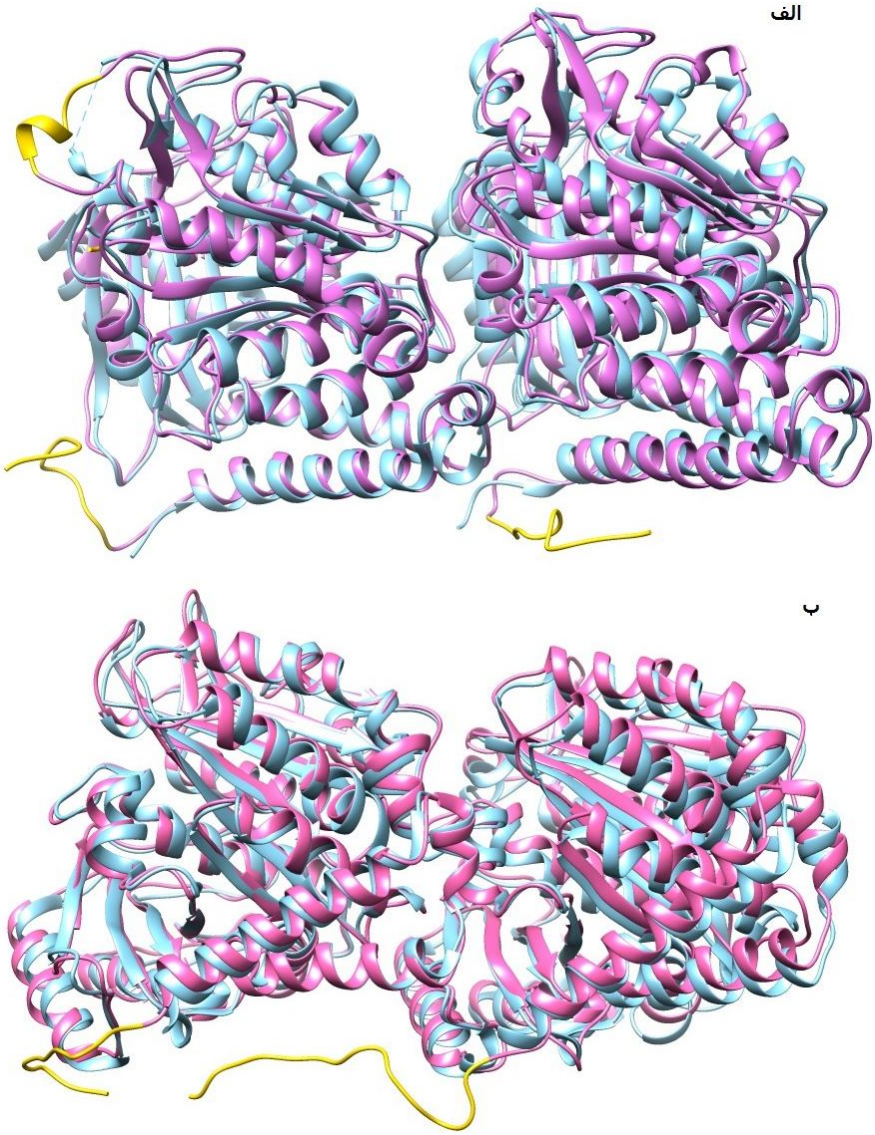
ب

```
4O4I.pdb chain A   1 MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFN
4O4I.pdb chain A  51 TFFSETGAGKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAA
4O4I.pdb chain A 101 NNYARGHYTIGKEIIDLVLDRIRKLADQCTGLQGFLVFHSFGGGTGSGFT
4O4I.pdb chain A 151 SLLMERLSVDYGKKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDC
4O4I.pdb chain A 201 AFMVDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGALNV
4O4I.pdb chain A 251 DLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISAEKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
4O4I.pdb chain A 301 QMVKCDPRHGKYMACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTG
4O4I.pdb chain A 351 FKVGINYQPPTVVPGGDLAKVQRAVCMLSNTTAIAEAWARLDHKFDLMYA
4O4I.pdb chain A 401 KRAFVHWYVGEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEEGEE
4O4I.pdb chain A 451 Y
4O4I.pdb  chain A 1; 451 ( 438-451 gap residue )
4O4I.pdb chain B   1 MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGDSDLQLERINVY
4O4I.pdb chain B  51 YNEATGNKYVPRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNN
4O4I.pdb chain B 101 WAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTL
4O4I.pdb chain B 151 LISKIREEYPDRIMNTFSVMPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETY
4O4I.pdb chain B 201 CIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADL
4O4I.pdb chain B 251 RKLAVNMVPFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDSKNMM
4O4I.pdb chain B 301 AACDPRHGRYLTVAAIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWIPNNVK
4O4I.pdb chain B 351 TAVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTG
4O4I.pdb chain B 401 EGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA
4O4I.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 4O4I. بخش-های مارپیچ آلفا، صفحات بتا و نواحی از دست رفته به ترتیب به رنگ طلایی، سبز و قرمز نشان داده شده‌اند.

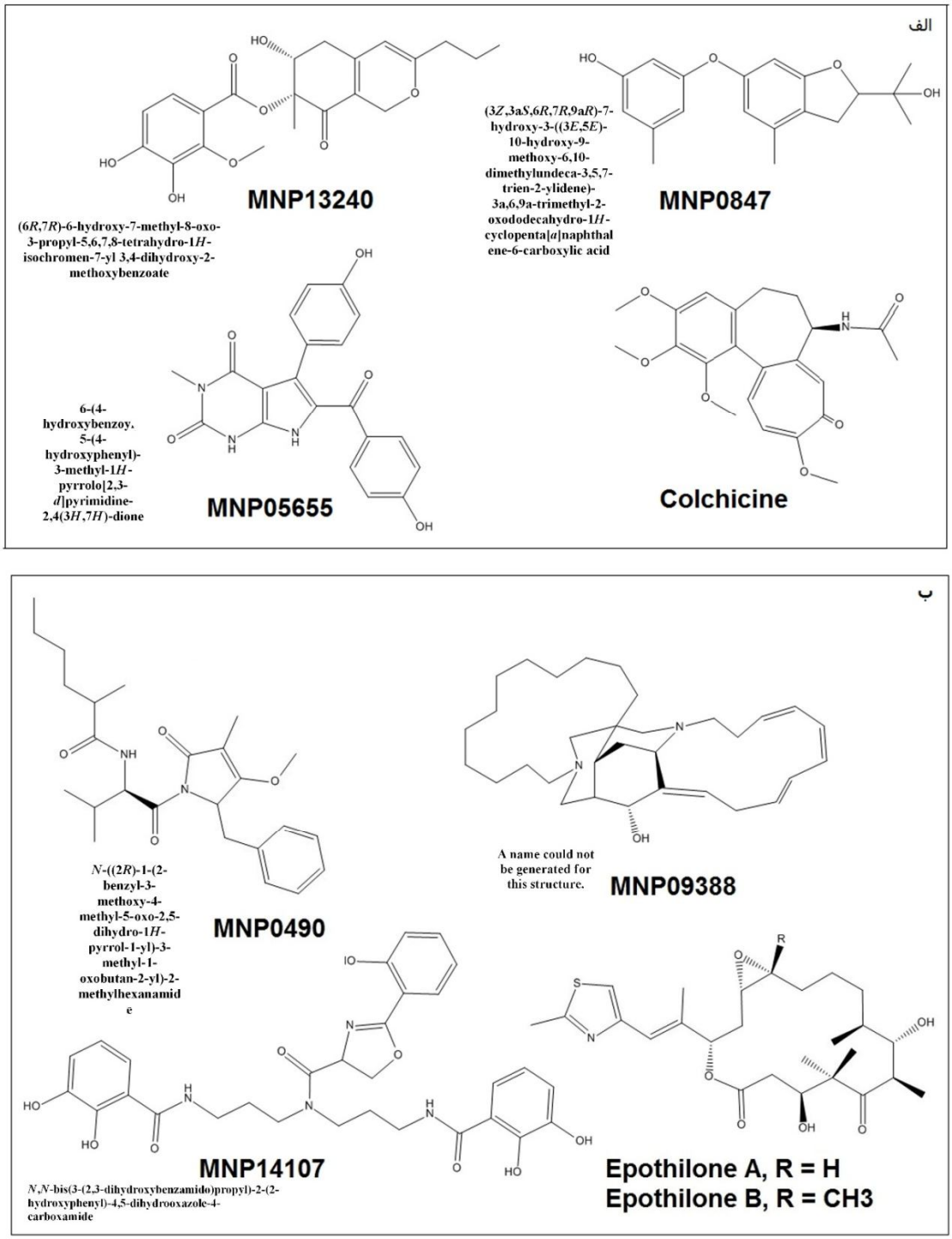


شکل 2 RMSD حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین مدل‌سازی شده در 10 نانوثانیه. نمودار RMSD پروتئین 3UT5 به رنگ قرمز و نمودار RMSD پروتئین 4O4I به رنگ سیاه نمایش داده شده است.



شکل 3 انطباق ساختار سه‌بعدی دایمر توبولین کریستالوگرافی و مدل‌سازی شده بعد از شبیه‌سازی. الف.ساختار کریستالوگرافی پروتئین 3UT5 با رنگ آبی و ساختار پروتئین شبیه‌سازی شده‌ی آن با رنگ بنفش نشان داده شده است. ب. ساختار کریستالوگرافی پروتئین 4O4I با رنگ آبی و پروتئین شبیه‌سازی شده‌ی آن با رنگ صورتی نشان داده شده‌است. ریشه‌های آمینواسیدی و لوپ‌های مدل‌سازی شده نیز به رنگ زرد نمایش داده شده‌اند.

تمامی محاسبات داکینگ توسط برنامه AutoDock Vina انجام پذیرفت که طی آن 507 ترکیب بهینه، به جایگاه کلشی‌سین و اپوتیلون به ترتیب در پروتئین‌های 3UT5 و 4O4I داک گردیدند. ترکیبات قویتر شناسایی و پس از تأیید با XScore انتخاب شدند (شکل 4) و (جدول 2).



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

جدول 2 مقادیرحاصل از انرژی تمایل اتصال، تابع نمره‌دهی ترکیبات منتخب و RMSD لیگاندهای مرجع

Compounds	Vina(Kcal/mol)	X-Score	RMSD(Å)
	جایگاه کلشی‌سین		
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 نرم‌افزار Vina، لیگاندهای کلشی‌سین و اپوتیلون به جایگاه خود در 3UT5 و 4O4I به ترتیب داک شدند و مقادیرRMSD برای آنها نسبت به لیگاندهای کریستاله محاسبه شد (جدول 2). میزان تمایل برای کلشی‌سین 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 نرم‌افزار AutoDock Vina به اندازه 2 کیلوکالری بر مول انحراف استاندارد دارد. مقدار RMSD برای کلشی‌سین و اپوتیلون داک شده به ترتیب 0/33 و 1/44 انگستروم محاسبه شد.

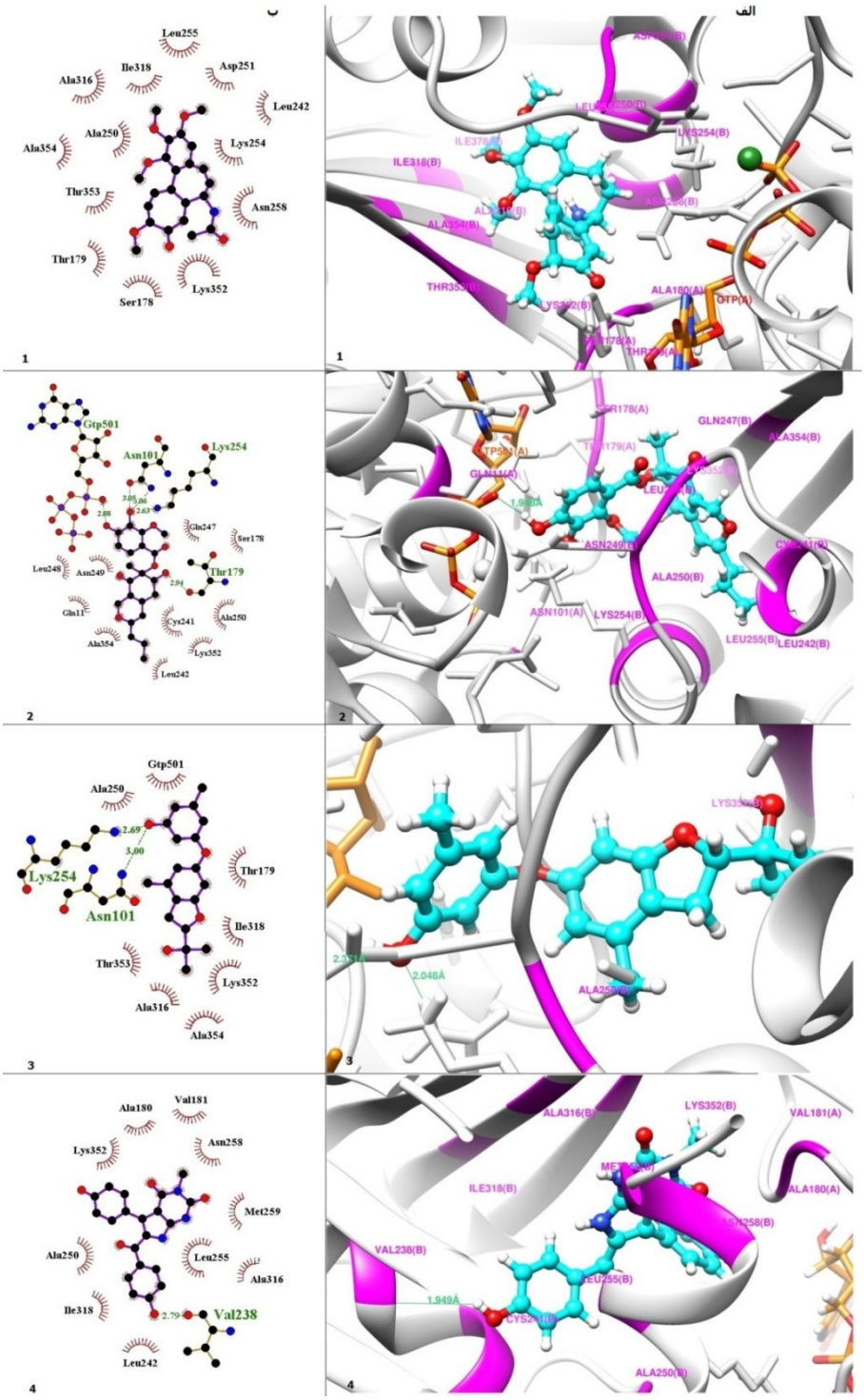
3-3- آنالیز نحوه میانکنش کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند

پس از انجام عملیات داکینگ، و شبیه‌سازی مجدد این کمپلکس‌ها، نحوه میانکنش سه ترکیب مؤثر با پروتئین مربوطه توسط برنامه‌های UCSF Chimera [29] و LigPlot [30] مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول 3)، تصاویر سه‌بعدی و دوبعدی حاصل از این برنامه‌ها در شکل‌های 5 و 6 نشان داده شده است.

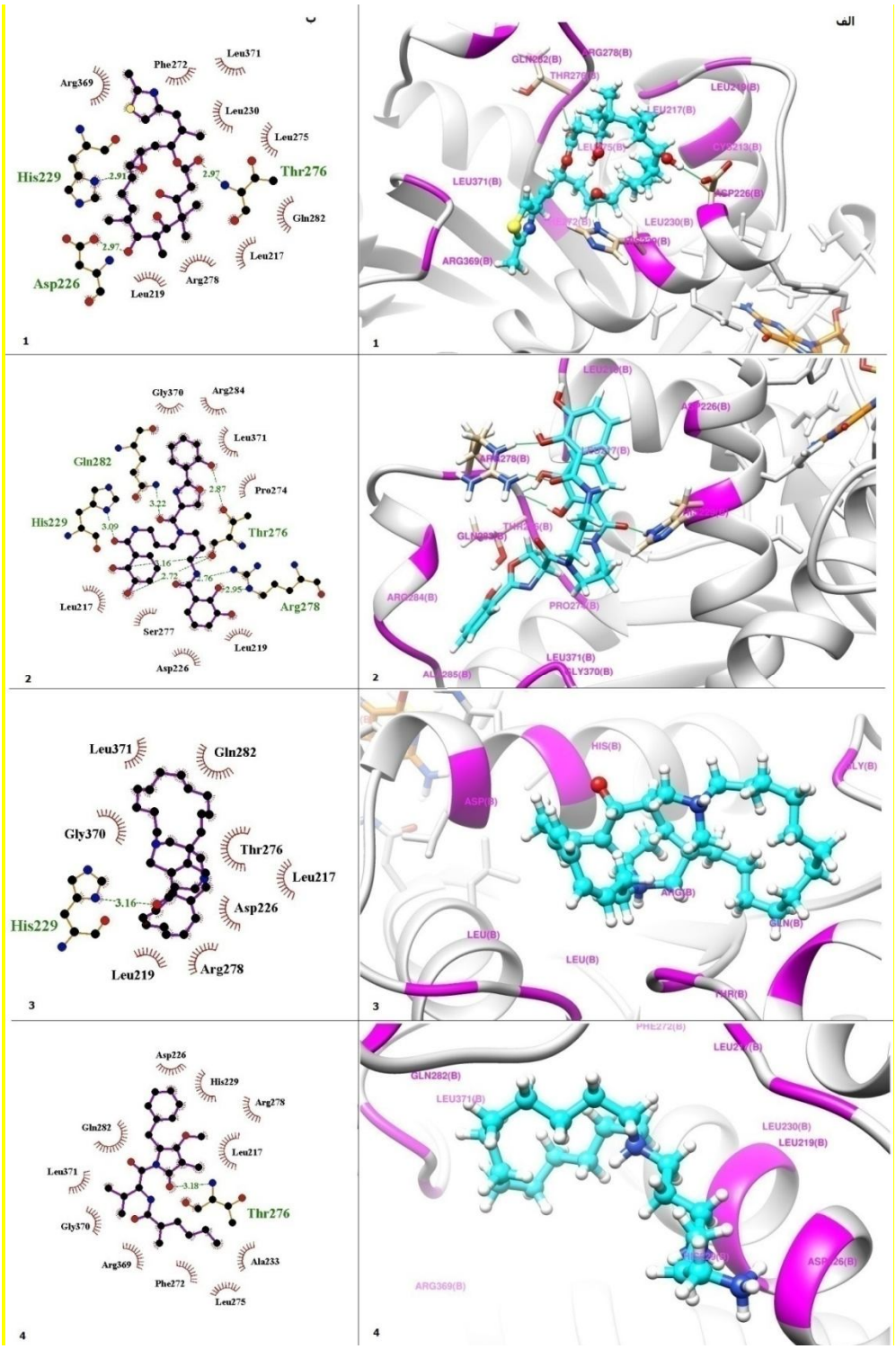
جدول 3 آنالیز اسیدهای آمینه درگیر در پیوندهای هیدروژنی و میانکنش‌های هیدروفوبیک با ترکیبات داک شده به جایگاه اتصال

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

*Hydrophobic Interactions



شکل 5 برهمکنش‌های احتمالی ترکیبات منتخب با جایگاه اتصال کلشی‌سین 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. کلشی‌سین 2. ترکیبMNP13240، 3. ترکیبMNP0847، 4. ترکیبMNP05655). 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 پروتیئن با رنگ خاکستری و ریشه‌های آمینواسیدی درگیر در پیوند هیدورژنی 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. ترکیبMNP14107، 3. ترکیبMNP09388، 4. ترکیبMNP04288). در LigPlot، 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، فلئور با رنگ سبز، ساختار پروتیئن با رنگ خاکستری و ریشه‌های آمینواسیدی درگیر در پیوند هیدورژنی و هیدروفوب با رنگ صورتی، پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز به نمایش گذاشته شده است.

4- بحث

ترکیبات طبیعی مشتق شده از ارگانیسم‌های 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 مختلفی با شکست مواجه می‌شوند. حتی برخی از پروژه-ها 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 ستخراج شده از اسفنج *hemimycale 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 کیناز3β کبدی(GSK-3β) 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-3β، 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 نورون‌ها باشد [34].

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

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 شبیه-سازی شده‌ی 3UT5 و 4O4I با پروتئین کریستاله‌ی 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 آنگسترم شد. مقادیر محاسبه شده‌ی 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 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 وCys241، Lys254، 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 وAsn100 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. ترکیبMNP0847 از طریق ریشه‌های آمینواسیدی Cys241، Leu248، Lys352، Ala354، Asn101، Ile318، Ala316 درگیر برهمکنش-های 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 می-شود) درگیر پیوند هیدروژنی با لیگاند می‌باشند [37]. Ayoub و همکاران محاسبات غربال‌گری مجازی بر روی

عوامل پایدارکننده توبولین 1TVK انجام دادند. نتایج حاصل از داکینگ مجدد اپوتیلونA ریشه‌های آمینواسیدی Thr274، His227 و Arg276 را درگیر در پیوند هیروژنی 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 MNP14107، MNP09388، MNP0490 و اپوتیلون (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 وGln282 بودند که در بین آنها His229، Thr276، Gln282 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 اسیدهای‌آمینه Thr276، Arg278، Gln282 و His229 برای پروتئین 4O4I به وضوح دیده می‌شوند. اسیدهای‌آمینه Lys352، Cys241، Leu248، Lys254، Leu255، Ile318، Ala316 از پروتئین 3UT5 و اسیدهای‌آمینه Leu217، Asp226، Leu275، Arg369، Leu371 از پروتئین 4O4I 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، Leu371 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 antimitotic 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, *DrugsThatTarget DynamicMicrotubules*: *ANewMolecularPerspective*. Wiley Online Library, 2011: pp. 443-481.

[5] Mahboobi, A., A. Sellmer, and T. Beckers, *Development of tubulin inhibitors as antimitotic 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*

[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 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.

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 drugs, 2010. **8**(10): pp. 2702-2720.

[34] Khanfar, M.A., et al., *The marine natural-derived inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta phenylmethylene hydantoins: 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.