

غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار با توان بالا جهت انتخاب ترکیب (ترکیبات) شیمیایی

مهارکننده‌ی جدید علیه کمپلکس فاکتور رونویسی

FOXM1 با ترادف ژنومی هدف

طاهره مرآتی و حمید مهدیونی*

ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰

چکیده

پروتئین FOXM1 به عنوان یک فاکتور رونویسی مهم، در عملکردهای متنوعی از جمله کنترل بیان ژن‌های مختلف، انتقال سلول-ها به فاز تقسیم، آنژیوژنز، مهاجرت و غیره درگیر می‌باشد و بیش‌بیان آن در انواع مختلف سرطان گزارش شده است. بنابراین، این پروتئین یک هدف دارویی بالقوه در درمان سرطان می‌باشد. تاکنون، داروها و ترکیبات زیادی FOXM1 را هدف قرار داده‌اند، از جمله FDI-6 و RCM-1 که عملکرد آن‌ها مهار میان‌کنش‌های FOXM1-DNA می‌باشد. در این مطالعه، به منظور جلوگیری از تشکیل کمپلکس FOXM1-DNA، زیرمجموعه In-vitro از پایگاه داده ZINC بصورت محاسباتی مورد بررسی قرار گرفت. برای دستیابی به این هدف، ابتدا جایگاه‌های اتصال لیگاند در پروتئین، با اجرای الگوریتم MDpocket مورد جست و جو قرار گرفتند. قبل از محاسبه‌ی انرژی اتصال‌پذیری ترکیبات به پاکت‌های پیش‌بینی شده، کتابخانه مورد نظر (حدود ۲۶۰,۰۰۰ ترکیب) با استفاده از وب‌سرور FAF-Drugs4 بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی غربال شد. پس از آن، ترکیبات منتخب با استفاده از AutoDock VINA علیه پاکت‌های پیش‌بینی شده FOXM1 داک شدند. فرایند غربالگری بر اساس انرژی اتصال‌پذیری، هشدارهای ساختاری و گروه‌های غیر توکسیک طراحی شد. بر این اساس، سه ترکیب با انرژی داکینگ تقریباً مشابه، نمره‌ی عبور را بدست آوردند. جهت تمایز و رتبه‌بندی ترکیبات انتخاب شده، روش MM/PBSA روی سه کمپلکس FOXM1-لیگاند اعمال شد و نهایتاً، ۱-هیدروکسی پیرن $D-\beta$ -گلوکونوئید بر اساس انرژی آزاد اتصال انتخاب شد. لیگاند معرفی شده در این مطالعه، مولکول hit جدید نویدبخشی است که امید می‌رود میان‌کنش FOXM1 با DNA مرتبطش را قطع کند. با این حال، کوشش‌های آزمایشگاهی بیشتری به منظور شناسایی لیگاند کشف شده به عنوان یک ترکیب lead باید انجام شود.

واژه‌های کلیدی: FOXM1، غربالگری مجازی، داکینگ مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، MM-PBSA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۱۷۱۹۰۵، پست الکترونیکی: hmahdiuni@razi.ac.ir

مقدمه

ForkHead Domain (FKH) یا دُمین اتصال به DNA، DNA Binding Domain (DBD)، Transactivation Domain (TAD) و دُمین N-terminal Repressor Domain (NRD) است که از این میان، دُمین اتصال به DNA در بین تمامی پروتئین‌های ابرخانواده

فاکتور رونویسی FOXM1 که قبلاً با نام‌های Win، MPP2، HFH-11 و Trident شناخته می‌شد، یک فاکتور رونویسی آنکوژنیک است که مهار عملکرد آن برای درمان سرطان یک هدف بالقوه به شمار می‌آید (۱۵). این پروتئین شامل سه دُمین اصلی به نام‌های دُمین سرچنگالی

(independent growth) و پیش‌بردن چرخه‌ی تقسیم سلول، می‌باشد (۴). بیش بیان FOXM1 در گستره‌ی متنوعی از سرطان‌ها همچون پانکراس، کبد، معده، کولورکتال، کلون، کلیه، مثانه، پروستات، سینه، ریه، تخمدان، دهانه رحم، مغز، پوست و لوسمی گزارش شده است (۲، ۳۲، ۵، ۶، ۹، ۳۳).

داروهای ضد سرطان بسیاری گزارش شده‌اند که می‌توانند FOXM1 را مهار کنند (۹). با این حال، مکانیسم مولکولی دقیقی که نشان دهد این داروها چگونه FOXM1 را تحت تاثیر قرار می‌دهند در دسترس نمی‌باشد. اغلب نتایج حاصل از تیمار دادن سلولهای سرطانی با این ترکیبات شامل کاهش بیان mRNA و پروتئین FOXM1 و در نتیجه کاهش نرخ رشد و تهاجم سلولهای سرطانی می‌باشد (۹). دیگر مهارکننده‌های غیر مستقیم FOXM1 که پروتئین‌های بالادستی FOXM1 را تحت تاثیر قرار داده و منجر به تنظیم بیان و فعالیت رونویسی این فاکتور می‌گردند، شامل مهارکننده‌های پروتئازومی همچون MG115، MG132 و bortezomib (Velcade) و آنتی بیوتیک‌های تیزولوی مانند Siomycin A و Thiostrepton هستند (۲۴، ۱۰، ۱۱).

برخلاف آنزیم‌ها، انتقال دهنده‌های غشای سلولی و کانال‌های یونی، اغلب فاکتورهای رونویسی فاقد پاکت‌های اتصال دارو هستند و این امر آن‌ها را به هدف‌های دارویی چالش برانگیز اما بالقوه‌ای تبدیل کرده است. بنابراین، طراحی منطقی دارو برای این دسته از پروتئین‌ها امری دشوار محسوب می‌شود و در نتیجه تکنیک‌های غربالگری با توان بالا (High-Throughput Screening (HTS) در کشف و معرفی لیگاندهای جدید متصل شونده به فاکتورهای رونویسی از اهمیت بالایی برخوردارند. استفاده از این تکنیک‌ها منجر به معرفی تعدادی لیگاندهای شیمیایی کوچک به عنوان داروهای مهارکننده FOXM1 شد که از این میان می‌توان به FDI-6 و RCM-1 اشاره کرد (۸، ۳۰). ترکیب FDI-6 با استوکيومتری ۱-۱ به FOXM1 متصل شده و مانع از ایجاد کمپلکس FOXM1-DNA می‌شود در

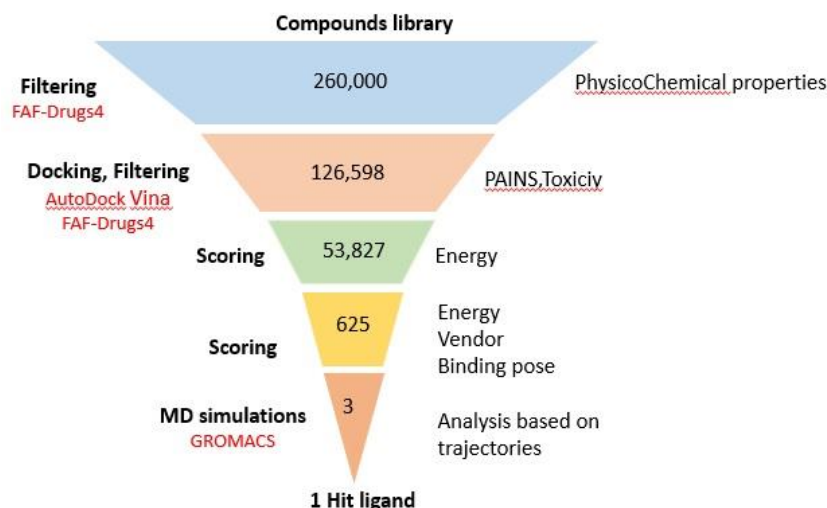
Forkhead در یک توالی ۱۰۰ آمینواسیدی حفاظت شده است. این دُمین با شناسایی جایگاه ویژه‌ی 5'-A(C/T)AAA(C/T)AA-3' بر روی پروموتور ژن‌های هدف، به DNA متصل می‌شود. پیرایش متناوب ۲ اگزون از ۱۰ اگزون کد کننده‌ی فاکتور رونویسی FOXM1 موجب ایجاد ۳ ایزوفرم در انسان می‌شود: FOXM1a، FOXM1b و FOXM1c که ایزوفرم اول از نظر فعالیت رونویسی غیرفعال محسوب شده و قابلیت اتصال به DNA در ایزوفرم سوم کمتر از نوع دوم آن است (۱۸، ۱۴).

فاکتور FoxM1 بطور گسترده در سلول‌های با نرخ تکثیر بالا مانند جنین در حال رشد، تیموس، بیضه، روده‌ی کوچک و کلون بیان می‌شود و از طریق تنظیم انتقال G1/S و G2/M و اثر بر پیشرفت میتوز در چرخه‌ی سلولی قویا بر رشد سلول اثر می‌گذارد. پروتئین FoxM1 جهت تکامل جنین و هم‌چنین هومئوستاز و بازسازی بافت در بزرگسالان مورد نیاز است. این فاکتور حین جنین‌زایی (Embryogenesis) به منظور تکامل صحیح بافت‌های اپیتلیال و مزانشیمی بیان می‌گردد که شامل قلب، کبد، بافت‌های نورواکتودرمال و عضلات صاف موجود در رگ‌های خونی و دستگاه گوارش می‌باشند. سلول‌های تمایز-یافته‌ای که در فاز ایستایی یا سکون به سر می‌برند بندرت مقادیر کمی از FoxM1 را بیان می‌کنند، مگر تحت شرایط خاصی نظیر پاسخ به آسیب، که بیان FOXM1 جهت تغییر کینتیک چرخه‌ی سلولی افزایش پیدا می‌کند و در نتیجه سلول‌ها ظرفیت تکثیر مورد نیاز جهت ترمیم آسیب را باز می‌یابند. همچنین، آنالیز مکانیزم‌های دخیل در بازتولید بافت، نقش قابل توجه FOXM1 در ترمیم بافت‌های مختلفی مانند ریه، کبد و قلب را نشان می‌دهد (۱۴ و ۱۵). FOXM1 به عنوان یک آنکوژن بالقوه می‌تواند بصورت مستقیم و غیرمستقیم سبب آغاز فرایند تومورزایی و پیشرفت سرطان گردد، بدین صورت که بیش بیان (Over expression) آن مرتبط با افزایش رشد و تکثیر سلول بوسیله‌ی القاء رشد مستقل از لنگر (Anchorage

کتابخانه حاوی تقریباً ۲۶۰۰۰۰ ترکیب شیمیایی ابتدا با در نظر گرفتن فیلترهای فیزیکیوشیمیایی مورد نظر پایش و سپس مرحله‌ی داکینگ مولکولی انجام شد. پس از اعمال فیلترهای سمیت و دو مرحله نمره دهی بر اساس میزان تمایل انرژی اتصال، وجود شرکت تجاری تامین‌کننده‌ی ترکیبات و جایگاه اتصال آن‌ها به پروتئین FOXM1، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی سه ترکیب انتخاب شده در کمپلکس با پروتئین FOXM1 انجام گشت. آنالیزهای انجام گرفته بر روی ترژکتوری حاصل از شبیه‌سازی این ترکیبات، منجر به معرفی یک مولکول Hit جدید در اتصال به فاکتور FOXM1 شد.

حالی که RCM-1 تجمع FOXM1 در هسته را مختل کرده و با افزایش یوبی‌کوئیتیناسیون و انتقال پروتئین از هسته به پروتئاروم، تخریب آن را تقویت می‌کند.

داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یکی از مهم‌ترین ابزارهای پیش‌بینی محل اتصال میانکنش‌های اتصال مولکول‌های مختلف هستند و استفاده از این تکنیک‌ها در اکتشافات دارویی به سرعت در حال افزایش است (۳۱). هدف از انجام این تحقیق کوشش در جهت یافتن و معرفی ترکیب یا ترکیبات شیمیایی کوچک برهم‌زننده‌ی اتصال فاکتور رونویسی FOXM1 به توالی DNA مورد تشخیص آن از طریق روش غربالگری مجازی می‌باشد. شکل ۱ به طور شماتیک روند این مطالعه را نشان می‌دهد. یک



شکل ۱- نمای کلی روند انجام پژوهش.

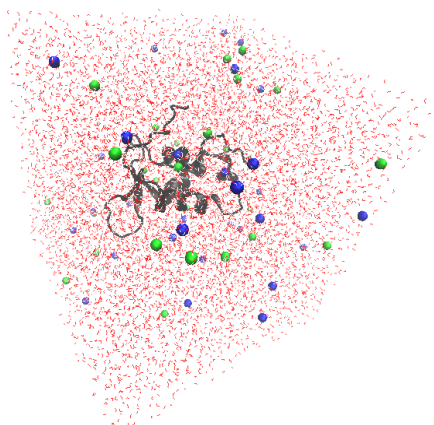
یافتن پاکت اتصال لیگاند در پروتئین FOXM1: از آنجا که FOXM1 جزء فاکتورهای رونویسی است که اغلب فاقد جایگاه اتصال لیگاند مشخصی می‌باشند، یافتن یک پاکت اتصال لیگاند در گام نخست امری ضروری است. ماهیت ساختارهای کریستالی به دلیل شرایط کریستالیزاسیون به گونه‌ای است که ممکن است بسیاری از پاکت‌های بالقوه در این ساختار آشکار نباشند. همچنین، تعدادی از پاکت‌های مهم تنها به طور گذرا در پروتئین ایجاد می‌شوند. به همین دلیل، به منظور در نظر گرفتن

مواد و روشها

آماده‌سازی ساختار پروتئین: مختصات اتمی دُمین متصل شونده به DNA پروتئین FOXM1 با شناسه 3G73 که شامل دو پروتئین FOXM1 در اتصال به توالی DNA مورد تشخیص خود می‌باشد، از بانک داده پروتئین (Protein Data Bank) به آدرس <https://www.rcsb.org> دانلود شد. مولکول‌های آب، زنجیره‌ی DNA و زنجیره‌ی A مولکول از فایل مربوطه حذف شدند. ساختار از لحاظ وجود هرگونه اتم‌های از دست رفته بررسی شد.

شد. پس از به تعادل رسیدن سیستم، با استفاده از میدان نیروی GROMOS96 53a6 جهت حل معادلات حرکت اتم‌ها، شبیه‌سازی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد.

پس از محاسبه‌ی انحراف جذر میانگین مربعات Root Mean Square Deviation (RMSD)، که به منظور اطمینان از پایداری ترمودینامیکی سیستم تحت مطالعه انجام می‌شود، ۸۰ نانوثانیه انتهایی ترژکتوری حاصل از MD برای آنالیزهای بعدی استفاده شد. با استخراج کنفورماسیون‌ها طی هر ۱۰ پیکوثانیه، ۸۰۰۰ ساختار کنفورماسیونی از ۸۰ نانوثانیه نهایی شبیه‌سازی تولید شد و با تنظیم پارامترهای MD pocket جهت محاسبه‌ی پاکت اتصالی برای مولکول‌های دارویی کوچک، برنامه در یک دستور پایتون (Python Directory) اجرا شد.



شکل ۲- سیستم آب‌پوشی شده‌ی پروتئین FOXM1. یون‌های Cl با رنگ آبی و یون‌های Na با رنگ سبز نشان‌دهنده‌اند.

غربالگری کتابخانه ترکیبات شیمیایی و داکینگ مولکولی: زیرمجموعه in-vitro از بانک داده ZINC، که یک پایگاه داده‌ی رایگان شامل بیش از ۲۳۰ میلیون ترکیب قابل خریداری می‌باشد، به صورت فرمت SDF دانلود شد. این کتابخانه در زمان انجام پروژه حاوی بیش از ۲۶۰۰۰۰ ترکیب شیمیایی بود. زیرمجموعه in-vitro شامل ترکیباتی است که در ارزیابی‌های اتصال مستقیم در غلظت‌های ۱۰ میکرومولار یا کمتر بصورت فعال عمل می‌کنند (۲۹). به منظور کاهش اندازه‌ی کتابخانه و آماده‌سازی ترکیبات،

شرایط دینامیکی پروتئین ابتدا شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی پروتئین FOXM1 انجام شد و سپس جهت یافتن پاکت‌های اتصال لیگاند در سطح پروتئین، از برنامه‌ی نرم‌افزاری MDpocket (۲۵) استفاده شد. برنامه MDpocket با استفاده از کنفورماسیون‌های بدست آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، به ما اجازه می‌دهد تا انعطاف‌پذیری پاکت‌ها و گذرا بودن آن‌ها، کانال‌ها و تغییرات کنفورماسیونی القاء شده توسط لیگاند را بر اساس حالات کنفورماسیونی پروتئین شناسایی کنیم (۲۶).

جهت بدست آوردن کنفورماسیون‌های مورد نیاز برای اجرای MDpocket، یک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۱۰۰ نانوثانیه‌ای روی دُمین متصل شونده به DNA پروتئین FOXM1 با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری GROMACS نسخه ۵,۱,۴ انجام شد (۱). برای این منظور، میدان نیروی GROMOS96 53a6 که برای شبیه‌سازی پروتئین مناسب می‌باشد انتخاب، و توپولوژی پروتئین تولید گردید. یک جعبه مکعب شکل تعریف شد به طوری‌که برای جلوگیری از برهم‌کنش‌های ناخواسته ناشی از شرایط مرزی، فاصله سطح پروتئین تا دیواره‌های جعبه ۱ نانومتر در نظر گرفته شد. این جعبه توسط مولکول‌های مدل آبی SPC/E پر شد. پس از آن، برای خنثی‌سازی بار سیستم و بافری کردن آن، نمک NaCl با غلظت ۰/۱۵ مولار اضافه شد (شکل ۲). کمینه‌سازی انرژی بر روی سیستم انجام شد. سپس، به سیستم اجازه داده شد که به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه، با شرایط NVT و ۵۰۰ نانوثانیه با شرایط NpT به تعادل برسد. دمای سیستم، تا ۳۰۰ درجه کلونین افزایش یافت و در طول شبیه‌سازی ثابت بود. برای ثابت نگه داشتن دما، از ترموستات Berendsen با ثابت زمانی ۰/۱ پیکوثانیه استفاده شد. فشار سیستم در طول شبیه‌سازی ثابت و برابر با ۱ بار (Bar) در نظر گرفته شد. برای ثابت نگه داشتن فشار سیستم، از باروستات Parrinello-Rahman به صورت همگرا (Isotropic) و با ثابت زمانی ۲ پیکوثانیه استفاده

جامعیت (Exhaustiveness) به عنوان کنترل‌کننده‌ی تعداد تکرار محاسبات برابر با ۲۴ اعمال شد.

پس از انجام داکینگ، لیگاندها بر اساس میزان تمایل اتصال، محل اتصال به پروتئین (پاکت پیش‌بینی شده در مجاورت N-terminal loop) و عبور از فیلترهای سمیت که توسط وب‌سرور FAF-Drugs4 انجام گردید، نمره دهی شد و سه لیگاند جهت انجام مراحل بعدی انتخاب گردیدند.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند: شبیه‌سازی کمپلکس پروتئین FOXM1 با لیگاندهای انتخاب شده هر یک به مدت ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. پارامترهای توپولوژی لیگاندها با استفاده از سرور PRODRG تولید شد (۲۷). شرایط شبیه‌سازی MD همانند بخش ۲-۲ اعمال شد. پس از انجام شبیه‌سازی MD تمامی کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند، پایداری ترمودینامیکی کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند توسط محاسبه‌ی RMSD ارزیابی شد. با توجه به نمودارهای RMSD، فواصل زمانی که ساختارها در تعادل ترمودینامیکی بودند (۴۰ نانوثانیه پایانی) جهت انجام آنالیزهای بعدی انتخاب شدند.

تخمین انرژی آزاد اتصال بین FOXM1 و لیگاندها با استفاده از روش MM-PBSA: راهکار MM-PBSA (Molecular Mechanics-Poisson-Boltzmann Surface Area) یک روش محاسبه‌ی انرژی مستقل از مسیر است که از مجموعه‌ای از ساختارها در حالت آغازین و پایانی جهت تخمین انرژی آزاد اتصال بیومولکول‌ها در کمپلکس استفاده می‌کند. این روش می‌تواند انرژی پتانسیل مکانیک مولکولی شامل نیروهای وان‌دروالس، میانکنش‌های الکترواستاتیک و انرژی‌های قطبی و غیرقطبی حلال را در طول ترژکتوری حاصل از شبیه‌سازی MD محاسبه کند (۱۶). به طور کلی، معادله‌ی محاسبه‌ی انرژی آزاد اتصال کل برای کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند در حلال مجازی (Implicit Solvent) به صورت زیر می‌باشد:

فیلترهای ازپیش‌تعریف‌شده‌ی RO5 (Lipinski role of 5) و فیلترهای شبه-دارو (Drug-like filters) با استفاده از ابزار Filter Editor موجود در وب‌سرور FAF-Drugs4 باهم ترکیب شده و بر ترکیبات شیمیایی کتابخانه اعمال شدند (۳، ۲۱، ۱۷).

با استفاده از برنامه‌ی Open Babel (۲۲)، مختصات اتمی ترکیبات حاصل از مرحله قبل از فرمت SDF به PDB تغییر یافت، درحالی‌که هیدروژن‌های قطبی با در نظر گرفتن ژئومتری به آن‌ها اضافه گردید. سپس، با استفاده از ماژول Pythonsh از برنامه نرم‌افزاری AutoDock Tools (ADT) (۲۸)، این ساختارها به فرمت pdbqt تبدیل شدند. این فرمت ساختاری که شامل اطلاعاتی همچون بارهای جزئی، اتم‌های هیدروژن قطبی، نوع اتم‌ها و همچنین اطلاعاتی در مورد درجات آزادی نسبی می‌باشد جهت اجرای داکینگ مولکولی این ترکیبات در مرحله بعد ضروری است.

داکینگ مولکولی یک فرایند محاسباتی است که تلاش می‌کند اتصال غیرکووالان بین ماکرومولکول‌ها (رستپور) و مولکول‌های کوچک (لیگاند) را پیش‌بینی کند. برای اجرای داکینگ مولکولی از اتوداک Vina (۷) نسخه ۱،۱،۲ استفاده شد (۱۳). این برنامه نرم‌افزاری یکی از رایج‌ترین و محبوب‌ترین ابزار داکینگ مولکولی می‌باشد. علت محبوبیت آن را می‌توان به رایگان بودن برنامه و مهم‌تر از آن کیفیت نتایج خصوصاً در مورد لیگاندهایی با بیش از ۸ باند قابل چرخش مربوط دانست. جهت انجام داکینگ، ابتدا توسط برنامه ADT، اتم‌های هیدروژن به فایل PDB ساختار آماده شده‌ی FOXM1 اضافه شدند و سپس ساختار حاصل با فرمت pdbqt تولید شد. جعبه توری (Grid Box) با ابعاد ۳۴×۲۴×۳۸ Å در محل پاکت پیش‌بینی شده تعریف شد. برای انجام داکینگ پروتئین-لیگاند، پروتئین درون جعبه توری از پیش تعریف‌شده ثابت و لیگاندها بصورت منعطف در نظر گرفته شدند. پارامتر

$$1) \quad \Delta G_{\text{binding}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}})$$

مجموع تغییرات انرژی مکانیک مولکولی (MM)، تغییرات هیدراته شدن (solvation) و تغییرات انتروپی (ΔS) در دمای مطلق (T)، محاسبه می‌شود:

$$2) \quad \Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solvation}} - T\Delta S$$

$$3) \quad \Delta G_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{internal bonded}} + \Delta E_{\text{electrostatic}} + \Delta E_{\text{van der Waals}}$$

$$4) \quad \Delta G_{\text{solvation}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{nonpolar}}$$

با استفاده از روابط زیر محاسبه شد:

$$5) \quad \Delta R_x^{\text{BE}} = \sum_{i=0}^n (A_i^{\text{complex}} - A_i^{\text{free}})$$

می‌شود، و n تعداد نهایی اتم‌ها در آمینواسید مذکور است. در نهایت انرژی آزاد اتصال طبق فرمول زیر بدست می‌آید:

$$6) \quad \Delta G_{\text{Binding}} = \sum_{x=0}^m \Delta R_x^{\text{BE}}$$

سطحی پروتئین‌ها وجود دارد آنست که بیشتر روش‌های کنونی از یک ساختار ایستا برای پیش‌بینی پاکت‌ها استفاده می‌کنند. بنابراین، به منظور لحاظ کردن دینامیک پروتئین و در نظر گرفتن پاکت‌های گذرا که می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای لیگاندهای شیمیایی کوچک باشند، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به مدت ۱۰۰ نانوثانیه روی دُمین متصل شونده به DNA پروتئین FOXM1 انجام شد. برای نمونه‌برداری کافی، ساختارهای کنفورماسیونی از ترژکتوری MD استخراج شد. برای استخراج این کنفورماسیون‌ها لازم است که سیستم مورد نظر ما از نظر ترمودینامیکی به تعادل رسیده باشد و یکی از معیارهای رایج برای این منظور، پایایی نمودار RMSD است. همان‌گونه که در شکل ۳ نمایش داده شده است، سیستم پس از ۲۰ نانوثانیه به تعادل رسید و از اینرو، ۸۰۰۰ ساختار کنفورماسیونی از ۸۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی استخراج شد.

در این معادله G_{complex} انرژی آزاد کل برای کمپلکس پروتئین-لیگاند است، G_{protein} انرژی آزاد کل برای پروتئین فاقد لیگاند در حلال می‌باشد و G_{ligand} انرژی آزاد کل برای لیگاند در حلال می‌باشد. انرژی آزاد اتصال از

برای تعیین سهم هر آمینواسید (x) پروتئین FOXM1 در اتصال به ترکیبات منتخب، انرژی اتصال به ازای هر رزیدو

به طوری که A_i^{complex} و A_i^{free} انرژی اتم i از آمینواسید x بوده که در حالت اتصال یافته و آزاد محاسبه

در این معادله، m نشان‌دهنده تعداد کلی اسیدهای آمینه در کمپلکس پروتئین-لیگاند است.

با استفاده از ماژول g-mmpbsa (۱۶) انرژی آزاد اتصال کل در طول ترژکتوری‌های حاصل از شبیه‌سازی کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند، محاسبه گردید و بهترین لیگاندها از لحاظ انرژی آزاد اتصال کل، به عنوان ترکیبات Hit انتخاب شدند.

آنالیزهای انجام شده در این مطالعه با استفاده از ماژول‌های موجود در بسته نرم‌افزاری GROMACS و نرم‌افزار LigPlot (۲۳) صورت گرفت. گراف‌ها توسط نرم‌افزار OriginLab نسخه ۸، Microsoft Excel 2013 و تصاویر به کمک نرم‌افزار VMD (۱۲) تولید شدند.

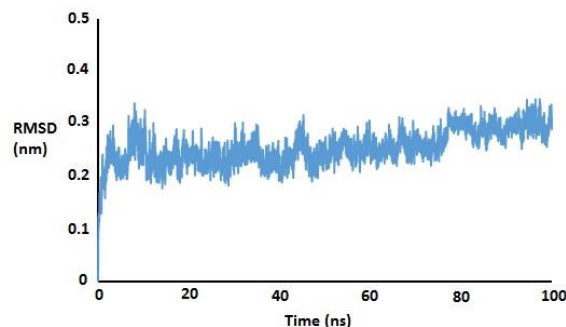
نتایج و بحث

پیش‌بینی پاکت‌های بالقوه اتصال لیگاند در پروتئین FOXM1: یکی از چالش‌هایی که در یافتن پاکت‌های

لوپ C-terminal شناسایی شد (پیکان نشان داده شده در شکل ۴). از آنجا که هدف این مطالعه برهم زدن اتصال پروتئین به توالی ژنومی هدفش می‌باشد و تا کنون هیچ اطلاعاتی در مورد نقش لوپ C-terminal در اتصال پروتئین FOXM1 به DNA گزارش نشده است، این پاکت برای محاسبات داکینگ مولکولی نادیده گرفته شد.

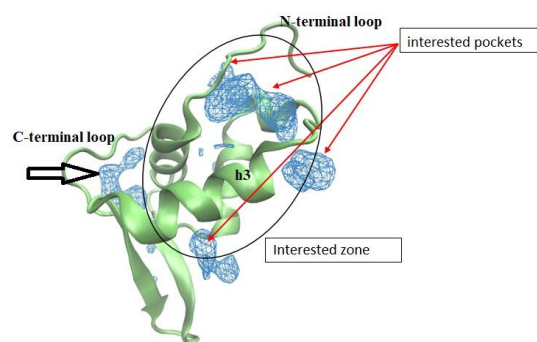
غربال‌گری زیرمجموعه *in-vitro* بانک داده ZINC و پیشگویی ساختار کمپلکس‌های FOXM1 با لیگاندهای غربال شده: با استفاده از وب سرور FAF-Drugs4 و براساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (جدول ۱) کتابخانه‌ی ۲۶۰۰۰۰ تایی ترکیبات شیمیایی زیرمجموعه *in-vitro* غربال‌گری شد و اندازه‌ی کتابخانه به ۱۲۶۵۹۸ ترکیب کاهش یافت. فرایند داکینگ مولکولی با استفاده از الگوریتم VINA انجام شد. با اعمال معیار انرژی اتصال و غربالگری مجدد ترکیبات توسط وب‌سرور FAF-Drugs4 بر اساس سنجش Pan(PAINS) که شامل مواردی همچون وجود گروه‌های توکسیک می‌باشد، ۵۳۸۲۷ ترکیب شیمیایی موفق به عبور از سنجش Pan شدند که در بین آنها ۶۲۵ ترکیب دارای بالاترین میزان تمایل اتصال (انرژی بیش از

-7kJ/mol) بودند. از این میان، سه ترکیب قابل خریداری، موفق به کسب بالاترین نمره شدند (جدول ۲) و به صورت کمپلکس با پروتئین FOXM1 و در فرمت PDB جهت بررسی‌های دقیق‌تر و انجام مطالعات شبیه‌سازی استخراج شدند. به منظور مقایسه جایگاه اتصال و انرژی تمایل اتصال ترکیبات شیمیایی FDI-6 و RCM-1 (که در بخش مقدمه به عنوان مهارکننده‌های مستقیم FOXM1 به آن‌ها اشاره شد)، نتایج حاصل از داکینگ این ترکیبات با پروتئین FOXM1 در شکل ۵ نمایش داده شده است. همانگونه که آشکار است، موقعیت اتصالی این دو مهارکننده در پروتئین کاملاً متفاوت است اما در حفره‌های اصلی پیش‌بینی شده توسط برنامه MD Pocket قرار می‌گیرند. انرژی اتصال این مهارکننده‌ها کمتر از ترکیبات



شکل ۳- نمودار RMSD پروتئین FOXM1-DBD در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی MD. سیستم پس از ۲۰ نانوثانیه به تعادل ترمودینامیکی رسیده است.

شکل ۴ نشان‌دهنده‌ی نقشه‌ی چگالی پاکت (Pocket density map) حاصل از اجرای MD pocket بر روی ترژکتوری حاصل از شبیه‌سازی MD پروتئین FOXM1-DBD است. این نقشه دربرگیرنده‌ی اطلاعاتی همچون کانال‌ها و پاکت‌های حفظ شده در پروتئین در طی شبیه‌سازی می‌باشد. در مطالعات قبلی بر نقش لوپ N-terminal در پایداری ساختار کمپلکس پروتئین-DNA تاکید شده است (۳۱).



شکل ۴- نتایج حاصل از اجرای MD pocket. پاکت‌های پیش‌بینی شده در محل هلیکس سه (h3) و لوپ N-terminal به عنوان پاکت‌های بالقوه اتصال دارو در نظر گرفته شدند. پاکت موجود در ناحیه C-ترمینال با علامت پیکان مشخص شده است.

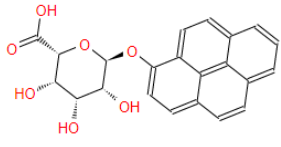
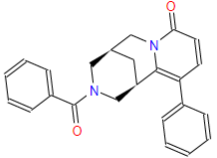
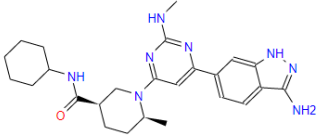
بر اساس این داده‌ها و نتایج حاصل از اجرای MD pocket، نواحی از پروتئین که باید برای محاسبات داکینگ مورد جستجو قرار گیرند شامل ناحیه دربرگیرنده هلیکس سه (h3) و لوپ N-ترمینال (ناحیه محصور در شکل ۴) می‌باشند. باید توجه داشت که یک پاکت بالقوه در ناحیه

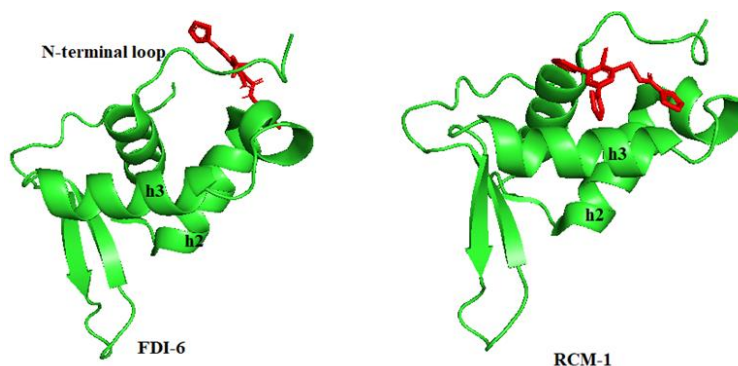
منتخب می‌باشد (۶/۴ Kcal/mol و ۶ Kcal/mol) به ترتیب برای FDI6 و RCM-1) اما با توجه به تقریب‌های مورد استفاده در محاسبه انرژی‌های داکینگ (۲۰) نمی‌توان

جدول ۱- پارامترهای فیزیکوشیمیایی تعریف‌شده جهت غربال‌گری زیرمجموعه *in-vitro* بانک داده ZINC

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی	محدوده انتخابی
وزن مولکولی (MW)	۵۰۰-۱۰۰
لگاریتم ضریب تقسیم (LogP)	-۵-۳
گیرنده‌ی پیوند هیدروژنی (HBA)	≤۱۰
دهنده‌ی پیوند هیدروژنی (HBD)	≤۵
سطح توپولوژیکی قطبی (tPSA)	≤۱۸۰
پیوندهای قابل چرخش	≤۱۱
تخلّف مجاز	۱

جدول ۲- ترکیبات انتخاب‌شده پس از انجام داکینگ با شعاع برش انرژی kcal/mol ۷-۷

شماره لیگاند	ساختار	انرژی اتصال
۱		-۷/۵
۲		-۷/۵
۳		-۷/۵



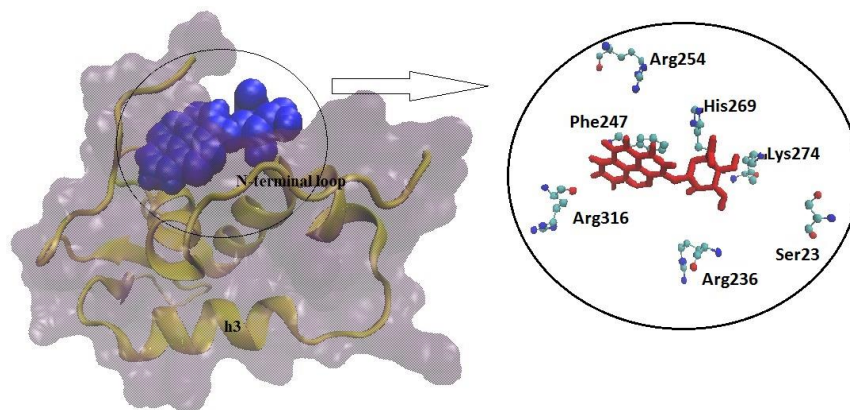
شکل ۵- داکینگ مولکولی ترکیبات شیمیایی FDI-6 و RCM-1 بر روی پروتئین FOXM1. ترکیبات در دو جایگاه متفاوت اما در پاکت‌های پیش‌بینی شده توسط MD Pocket قرار می‌گیرند.

و نام 1-Hydroxypyrene β -D-Glucuronide منفی‌ترین میزان انرژی اتصال را دارا بود. همانگونه که از جدول ۳ پیداست، نتایج حاصل از محاسبه‌ی انرژی مقادیر بالای از انرژی الکتروستاتیک و انرژی حلال‌پوشی قطبی را نشان می‌دهند. این مقادیر اغلب به دلیل اثرات حلال، یکدیگر را خنثی می‌کنند. از طرفی سهم غیر الکتروستاتیک حلال‌پوشی که توسط SASA (Solvent-Accessible Surface Area) نمایندگی می‌شود، برای تمامی لیگاندها مقداری کوچک و مشابه است. در نتیجه، انرژی وان در والس سهم اصلی را در انرژی اتصال کل دارا می‌باشد. در کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱، محل اتصال لیگاند بر روی پروتئین، لوپ N-terminal می‌باشد. (شکل ۶). این لیگاند به ناحیه‌ای از پروتئین متصل شده که در آنالیز MDpocket به عنوان یکی از نواحی بالقوه اتصال مولکول‌های کوچک شیمیایی معرفی شد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس‌های FOXM1 و لیگاندهای منتخب: به منظور مدل‌سازی دقیق‌تری از کمپلکس‌های FOXM1 با لیگاندهای منتخب، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) این کمپلکس‌ها به مدت ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. محاسبه‌ی انرژی اتصال و سهم هر مولفه در این انرژی با روش MM/PBSA برای سه کمپلکس FOXM1 با لیگاندهای ۱، ۲ و ۳ انجام شد (جدول ۳). مقایسه مقادیر انرژی اتصال در جداول ۲ و ۳ به خوبی نشان می‌دهد که روش‌های مبتنی بر توابع نمره‌دهی (مانند داکینگ مولکولی) قادر به رتبه‌بندی لیگاندها نمی‌باشند؛ درحالی‌که سه لیگاند منتخب در محاسبات داکینگ تقریباً انرژی داکینگ یکسانی داشتند، انرژی‌های اتصال حاصل از روش MM/PBSA این ترکیبات اختلاف قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر نشان می‌دادند. از میان این ترکیبات، لیگاند ۱ با فرمول شیمیایی $C_{22}H_{18}O_7$

جدول ۳- انرژی آزاد اتصال و مقدار عبارات استفاده شده در محاسبه آن برای ترکیبات شیمیایی منتخب. واحد تمامی داده‌ها kJ/mol می‌باشد.

شماره لیگاند	انرژی وان در والس	انرژی الکترواستاتیک	انرژی حلال پوشی قطبی	SASA	انرژی اتصال
۱	-۱۷۶/۶۳۲	-۱۹۶/۰۷۸	۱۹۸/۰۵۸	-۱۵/۴۷۱	-۱۹۰/۰۷۰
۲	-۱۱۴/۵۴۶	-۶۸/۵۸۲	۷۹/۳۵۱	-۱۱/۷۲۴	-۱۱۵/۵۱۹
۳	-۱۴۹/۹۴۰	-۲۵/۱۷۴	۶۲/۳۰۱	-۱۴/۸۴۶	-۱۲۷/۶۲۱



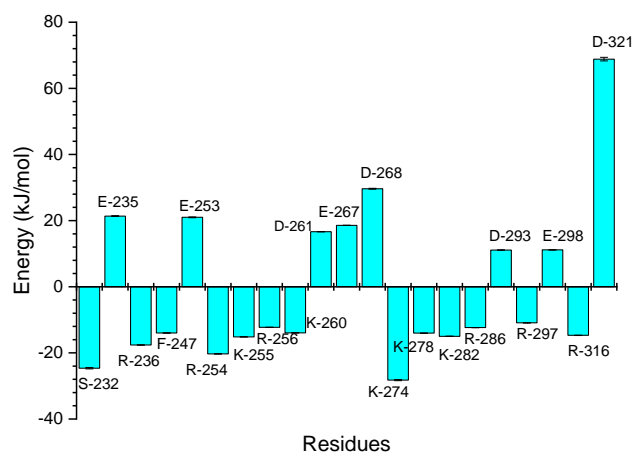
شکل ۶- کمپلکس لیگاند ۱ با پروتئین FOXM1 در کمپلکس FOXM1-ligand1، لیگاند شیمیایی به لوپ N-ترمینال متصل شده است. ریشه-های درگیر در تشکیل پیوند نشان داده شده‌اند.

لیگاند ۱ به FOXM1 (تقریباً -196 kJ/mol)، به نظر می‌رسد که سهم اصلی در اتصال لیگاند به پروتئین را پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های یونی بازی می‌کنند (جدول ۴). اما، تقریباً بخش اعظم این انرژی الکتروستاتیک توسط انرژی حلال‌پوشی قطبی خنثی می‌شود (جدول ۳ را ببینید)؛ بنابراین، مولفه وان در والسی نیروی مکانیک مولکولی سهم اصلی را از طریق بخش آب‌گریز این آمینو اسیدها به خصوص لیزین دارا می‌باشد. از طرف دیگر، رزیدوهای آمینو اسیدی مانند Glu235, Glu253, Asp268 و Asp321 بیشترین سهم نامطلوب را در فرآیند اتصال لیگاند ۱ به پروتئین FOXM1 بازی می‌کنند (شکل ۸).

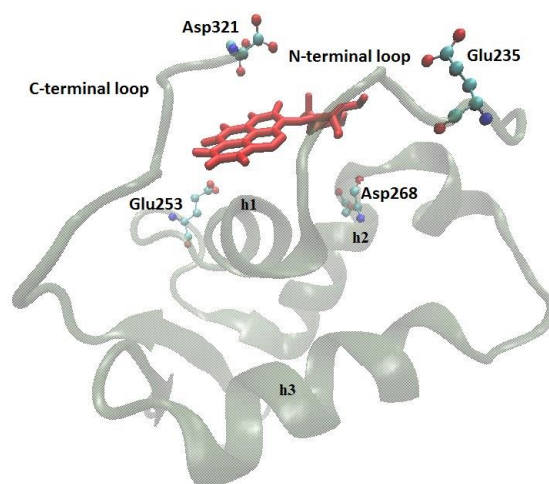
تعیین آمینواسیدهای مهم در برهم‌کنش FOXM1-لیگاند ۱: به منظور تعیین سهم هر آمینواسید در جایگاه‌اتصال FOXM1 برای لیگاند ۱، انرژی اتصال کل برای هر رزیدوی آمینو اسیدی در این پاکت اتصالی محاسبه شد (شکل ۷). در جایگاه اتصال لیگاند ۱، رزیدوهای آمینو اسیدی Ser232, Arg236, Phe247, Arg254, Lys247, Lys282 و Arg316 منفی‌ترین انرژی آزاد اتصال کل را نشان دادند و با احتمال قوی، موثرترین ریشه‌ها در برقراری اتصال لیگاند ۱ به پروتئین FOXM1 می‌باشند. با توجه به ماهیت این آمینو اسیدها که بیشتر رزیدوهای بازی آرژنین و لیزین می‌باشند و همچنین با در نظر گرفتن مقادیر بالای انرژی الکتروستاتیک در اتصال

جدول ۴- سهم انرژی مکانیک مولکولی، حلال‌پوشی قطبی و غیرقطبی آمینواسیدهای درگیر در کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱. واحد تمامی داده‌ها kJ/mol می‌باشد.

ریشه‌های آمینواسیدی	انرژی مکانیک مولکولی	حلال‌پوشی قطبی	حلال‌پوشی غیرقطبی
SER-232	-۳۰/۶۹۴۹	۶/۱۳۸۸	-۰/۰۸۹۱
GLU-235	۲۴/۷۵۵۷	-۳/۳۷۴۸	-۰/۰۱۷۲
ARG-236	-۲۱/۵۷۴۲	۳/۹۶۵۳	-۰/۰۰۶۶
PHE-247	-۱۵/۷۶۲۵	۲/۹۵۶۴	-۱/۱۷۵۳
GLU-253	۲۱/۶۰۹۲	-۰/۶۰۵۱	-۱ E -۴
ARG-254	-۲۳/۴۴۷۲	۳/۱۳۷۷	۰
LYS-255	-۱۵/۸۹۸۹	۰/۷۴۶۶	۰
ARG-256	-۱۲/۸۴۸۳	۰/۵۷۸۹	۰
LYS-260	-۱۴/۳۳۸۴	۰/۴۰۰۷	۰
ASP-261	۱۸/۷۲۶۴	-۲/۰۹۰۹	۰
GLU-267	۲۲/۰۲۰۳	-۳/۴۵۸۹	۰
ASP-268	۳۴/۶۱۷۷	-۴/۹۷۵	-۰/۰۰۲
LYS-274	-۳۲/۶۴۳۶	۴/۴۱۴۸	-۰/۰۰۲۹
LYS-278	-۱۴/۹۵۱۱	۰/۹۲۷۵	۰
LYS-282	-۱۶/۸۶۲۳	۱/۸۸۴۷	۰
ARG-286	-۱۳/۶۲۳۳	۱/۲۸۱۴	۰
ASP-293	۱۱/۸۹۴۲	۰/۷۸۷	۰
ARG-297	-۱۱/۵۶۷۹	۰/۶۴۶۳	۰
GLU-298	۱۱/۶۷۴۶	-۰/۵۲	۰
ARG-316	-۱۶/۳۵۸	۱/۶۹۱۴	-۰/۰۲۷۲
ASP-321	۷۱/۰۹۶۶	-۲/۱۷۷۸	-۰/۱۰۰۱



شکل ۷- نمودار سهم هر رزیدوی آمینو اسیدی در انرژی اتصال کل لیگاند ۱ به پروتئین FOXM1 در کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱



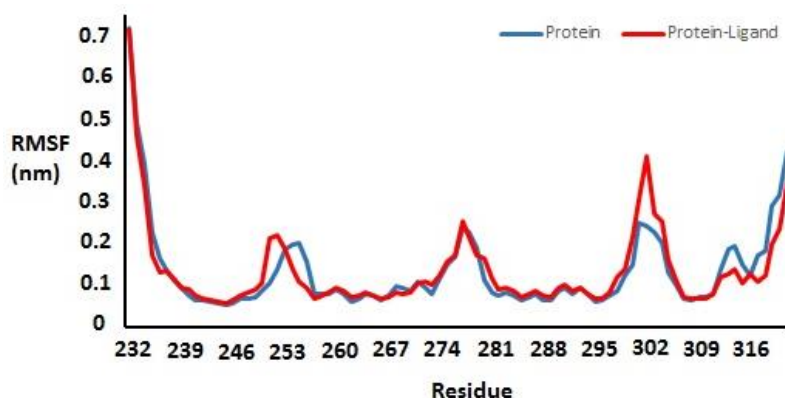
شکل ۸- موقعیت ریشه‌های آمینو اسیدی نامطلوب از نظر انرژی در اتصال به لیگاند در کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱

سازی است. در نمودار RMSF مربوط به کمپلکس پروتئین-لیگاند، چنانچه کربن‌های آلفای ریشه‌های آمینو اسیدی نسبت به همین کربن‌ها در پروتئین تنها، نوسان کمتری داشته باشند، می‌توان اینگونه استنتاج کرد که این ریشه‌ها در ایجاد پیوندهایی جدید مشارکت می‌کنند و بالعکس. البته باید خاطر نشان کرد که لیگاند می‌تواند موجب افزایش نوسانات موضعی $C\alpha$ در فاصله ای دور از محل برهمکنش شود (۱۹). در کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱، آمینو اسیدهای ۲۵۱، ۲۵۲، ۲۹۸ الی ۳۰۳ انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به همین آمینو اسیدها در پروتئین تنها دارند اما رزیدوهای ۲۵۴ الی ۲۵۶ و ۳۱۳ الی ۳۲۱ نوسانات کمتری تجربه می‌کنند. این نتایج در هماهنگی با نتایج ذکر شده در شکل ۷ و جدول ۴، به نقش

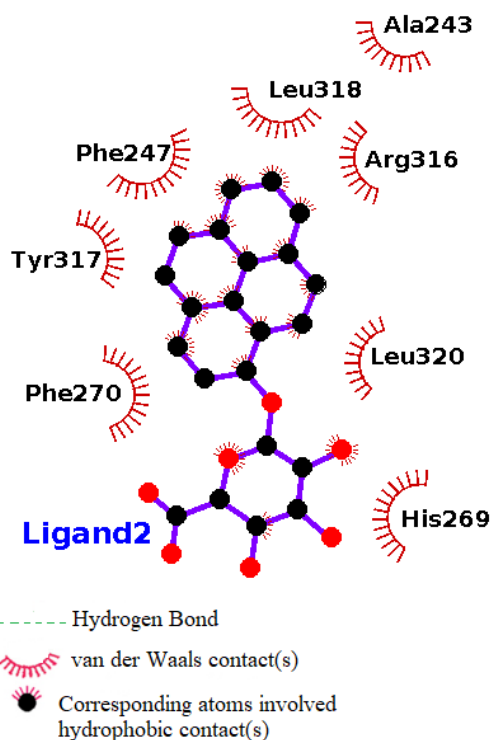
اثر متقابل لیگاند ۱ و پروتئین FOXM1 یکی از ارزیابی‌های مهم در مطالعه برهم‌کنش لیگاند با پروتئین، بررسی اثر لیگاند بر ساختار پروتئین است و یکی از معیارهای مهم در این ارتباط، تغییرات انعطاف‌پذیری رزیدوهای پروتئین مربوطه در اثر اتصال لیگاند می‌باشد. برای بررسی تغییرات انعطاف‌پذیری رزیدوهای آمینو اسیدی FOXM1 در اثر اتصال به لیگاند ۱، نوسانات مربع ریشه میانگین Root Mean Square Fluctuation (RMSF) برای هر آمینو اسید در پروتئین FOXM1 در غیاب و حضور لیگاند ۱ در ۸۰ نانوثانیه انتهایی شبیه‌سازی MD محاسبه شد (شکل ۹). نمودار RMSF معیاری از میزان انعطاف‌پذیری کربن آلفای ($C\alpha$) رزیدوهای آمینو اسیدی پروتئین نسبت به مقدار میانگین نوسانات $C\alpha$ در حین شبیه

FOXM1 باشد. لازم به ذکر است که در یک مطالعه محاسباتی توسط طباطبایی و همکاران، تغییرات نوسانی محسوسی برای آمینو اسیدهای FOXM1 با و بدون اتصال به DNA به عنوان لیگاند طبیعی این فاکتور مشاهده نشده است (۳۱) که این خود احتمالاً نشان‌دهنده اتصال ضعیف این فاکتور با لیگاندهای دیگر به عنوان یک ضرورت است.

نامطلوب آمینواسیدهایی همچون Glu298 با انرژی اتصال کل برابر با $11/1536$ kJ/mol و نقش مطلوب رزیدوهای Arg254، Arg255 و Arg256 اشاره می‌کند. سایر ریشه‌های آمینو اسیدی تغییرات نوسانی محسوسی نسبت به پروتئین تنها نشان نمی‌دهند. این پدیده می‌تواند احتمالاً به دلیل اتصال ضعیف بین لیگاند مورد نظر و پروتئین



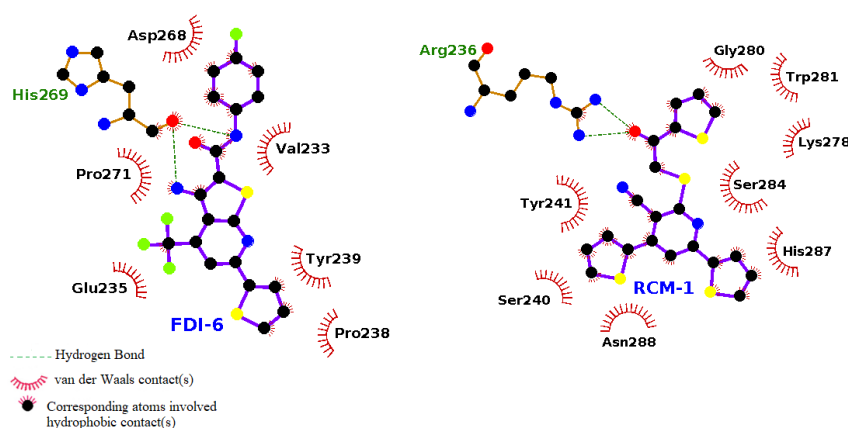
شکل ۹ - نمودار RMSF پروتئین FOXM1 (آبی) و کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱ (قرمز)



شکل ۱۰- الف: دیاگرام دوبعدی آمینواسیدهای مجاور میان‌کنش کننده با لیگاند ۱

از آنجا که پیوندهای هیدروژنی در اتصال دارو به گیرنده مربوطه نقش مهمی ایفا می‌کنند، تعیین پیوندهای هیدروژنی پایدار و گروه‌های درگیر در آنها حائز اهمیت است. جهت محاسبه پیوندهای هیدروژنی بین لیگاند منتخب و پروتئین FOXM1، علاوه بر در نظر گرفتن رزیدوهای دارای منفی‌ترین میزان انرژی مکانیک مولکولی و انرژی آزاد اتصال کل، پیوندهای هیدروژنی و وان در والس در آخرین کنفورماسیون تولید شده در شبیه‌سازی‌های کمپلکس مربوطه توسط نرم‌افزار Ligplot+ مورد بررسی قرار گرفتند و ریشه‌های آمینواسیدی پروتئین در مجاورت لیگاند ۱ استخراج شدند (شکل ۱۰-الف). همچنین، جهت مقایسه ریشه‌های مهم میان‌کنش کننده در جایگاه اتصال، دیاگرام دو بعدی آمینواسیدهای مجاور ترکیبات FDI-6 و RCM-1 با استفاده از کنفورماسیون‌های حاصل از داکینگ مولکولی رسم شد (شکل ۱۰-ب). همانطور که مشاهده می‌شود و در بخش‌های قبلی نیز بدان اشاره شد، میان‌کنش‌های وان در والس نقشی حیاتی در اتصال لیگاندها به پروتئین ایفا می‌کنند.

دینامیک مولکولی انجام شد (شکل ۱۱). به منظور محاسبه پیوندهای هیدروژنی در کمپلکس FOXM1 با لیگاند ۱ زاویه قطع بین گروه پذیرنده و دهنده‌ی پیوند ۳۰ درجه و فاصله‌ی قطع بین هیدروژن و گروه پذیرنده کوچکتر یا برابر با $\text{\AA}^3/5$ در نظر گرفته شد. اکسیژن و نیتروژن غیر-متصل به هیدروژن همواره به عنوان پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی عمل می‌کنند.



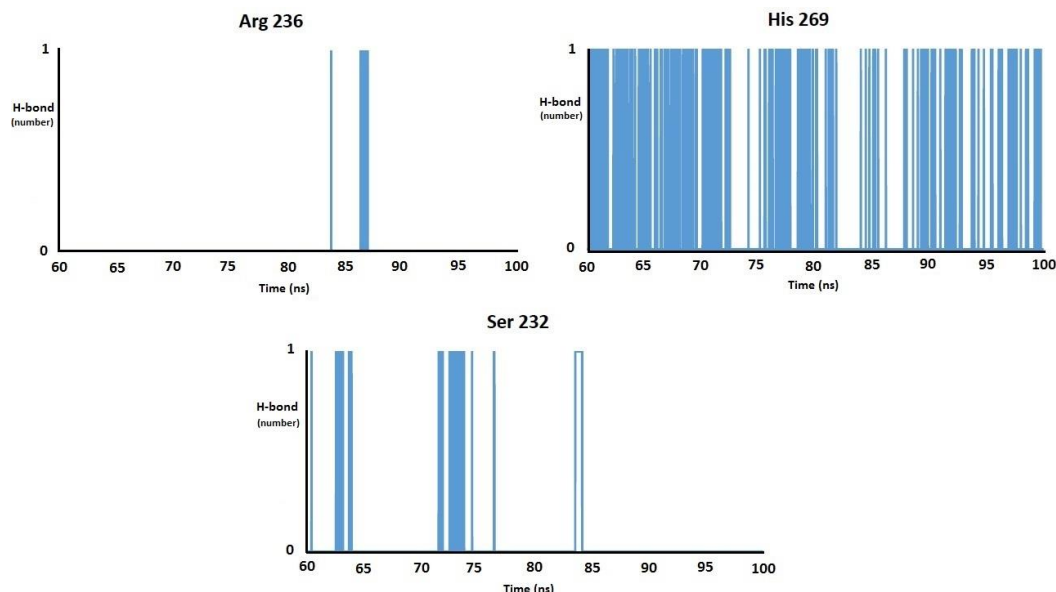
شکل ۱۰-ب: دیاگرام دو بعدی آمینواسیدهای مجاور میان کنش کننده با ترکیبات FDI-6 و RCM-1

پیوند هیدروژنی برای کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱ نشان داد که تنها رزیدوهای آمینو اسیدی His269، Ser232 و Arg236 قادر به ایجاد پیوند هیدروژنی با لیگاند مربوطه هستند (شکل ۱۱) و از بین آنها فقط رزیدوی His269 می‌توانست پیوند هیدروژنی پایدار تشکیل دهد. باید توجه داشت که آمینواسید His269 در کمپلکس پروتئین-لیگاند ۱ در شکل ۱۰-الف به عنوان آمینواسید شرکت کننده در میانکنش وان در والس در نظر گرفته شده بود، که این خود نشان می‌دهد برای ارزیابی برهمکنش‌های مهم نمی‌توان تنها به یک کنفورماسیون منفرد اعتماد کرد. پیوند هیدروژنی تشکیل شده توسط ریشه‌های Ser232 و Arg236 ناپایدارتر از His269 بود و آنالیز سایر ریشه‌ها ایجاد هیچگونه پیوند هیدروژنی مناسبی با لیگاند را نشان نداد.

بر اساس شکل ۱۰-الف، آمینواسیدهای His269، Phe270، Arg316، Tyr317، Leu318، Leu320 و Ala243 در میان‌کنش‌های وان در والس با لیگاند ۱ شرکت می‌کنند. اما، لیگاند ۱ ظاهراً هیچگونه پیوند هیدروژنی با هیچکدام از ریشه‌های مجاور برقرار نمی‌کند. جهت بررسی صحت این داده‌ها، آنالیز پیوند هیدروژنی برای کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱ در طول ترژکتوری حاصل از شبیه‌سازی

برای ترکیب RCM-1، ریشه‌های Ser240، Tyr241، Lys278، Gly280، Trp281، Ser284 و His287 در ایجاد میان‌کنش‌های وان در والس FOXM1 با این لیگاند درگیر هستند در حالی که آمینواسید Arg236 دو پیوند هیدروژنی با گروه کربنیل این ترکیب ایجاد می‌کند (شکل ۱۰-ب). ریشه‌های مجاور ترکیب شیمیایی FDI-6 که جایگاه اتصال آن به پروتئین FOXM1 مشابه محل اتصال لیگاند ۱ است، متشکل از Val233، Glu235، Pro238، Tyr239، Asp268 و Pro271 هستند و His269 در ایجاد دو پیوند هیدروژنی با این ترکیب مشارکت می‌کند.

در لیگاند ۱، بواسطه وجود یک گروه کربوکسیل آزاد، برهمکنش‌های یونی متعددی بین لیگاند و رزیدوهای باردار FOXM1 قابل پیش‌بینی است (شکل ۷). اما، آنالیز



شکل ۱۱- سیر زمانی تشکیل پیوند هیدروژنی بین لیگاند ۱ و رزیدوهای کلیدی پروتئین FOXM1 در طول ترژکتوری حاصل از شبیه‌سازی کمپلکس FOXM1-لیگاند ۱. رزیدوی His269 پیوند هیدروژنی پایداری تشکیل می‌دهد.

نتیجه‌گیری

اسیدهای دارای بار مثبت فراوان بودند، انتخاب یا طراحی لیگاندهای دارای گروه‌های باردار منفی (همانند لیگاند 1) منطقی به نظر می‌رسد. اما، باید توجه داشت که وجود این گروه‌ها در یک لیگاند تمایل به آب‌پوشی را برای لیگاند افزایش می‌دهد که این خود می‌تواند موجب ضعیف شدن برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک بین این گروه‌ها و آمینو اسیدهای مربوطه در پروتئین هدف شود. علاوه‌براین، آب‌پوشی گروه‌های قطبی و باردار در یک لیگاند هزینه آنتروپی تشکیل کمپلکس (اتصال لیگاند به گیرنده) را به شدت افزایش می‌دهد. با وجود این، با توجه به مقدار و ماهیت انرژی الکتروستاتیک در مورد لیگاند انتخاب شده، و همچنین وجود آمینواسیدهای مجاور با بار مثبت، میتوان لیگاندهایی با بار کلی منفی طراحی کرد که بتوانند به پروتئین FOXM1 متصل شوند.

هدف از انجام این مطالعه، معرفی ترکیب(های) شیمیایی کوچک جدید به عنوان مهارکننده‌های فاکتور رونویسی FOXM1، که نقش کلیدی و مهمی در آغاز و پیشرفت انواع سرطان‌ها ایفا می‌کند، به روش غربالگری مجازی بود که روشی مقرون به صرفه در زمان و هزینه‌های مالی محسوب می‌شود. در پایان، یک ترکیب شیمیایی از میان کتابخانه‌ی ۲۶۰۰۰۰ تایی به عنوان ترکیب Hit معرفی شد. نیروهای اصلی در اتصال لیگاند منتخب به پروتئین FOXM1 نیروهای بین مولکولی خصوصا میان‌کنش‌های وان در والسی بودند که با توجه به ماهیت و محل برهم‌کنش این فاکتور با DNA هدف مربوطه قابل پیش‌بینی است. با توجه به آن‌که لیگاند طبیعی این پروتئین، پروموتور DNA هدف می‌باشد و همچنین با در نظر گرفتن اینکه دست کم در یکی از پاکت‌های محاسبه شده برای FOXM1 آمینو

منابع

- 1- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., Lindahl, E., 2015, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, SoftwareX., 1-2:19-
- 25.
- 2- Adami, G. R., Ye, H., 2007, Future roles for FoxM1 inhibitors in cancer treatments, Future Oncology., 3:1-3.

- 3- Alland, C., Moreews, F., Boens, D., Carpentier, M., Chiusa, S., Lonquety, M., Renault, N., Wong, Y., Cantalloube, H., Chomilier, J., Hochez, J., Pothier, J., Villoutreix, B. O., Zagury, J.-F., Tuffery, P., 2005, RPBS: a web resource for structural bioinformatics, *Nucleic Acids Research.*, 33: 44–49.
- 4- Bella, L., Zona, S., Nestal de Moraes, G., Lam, E. W.-F., 2014, FOXM1: A key oncofoetal transcription factor in health and disease, *Seminars in Cancer Biology.*, 29:32–39.
- 5- Benayoun, B. A., Caburet, S., Veitia, R. A., 2011, Forkhead transcription factors: key players in health and disease, *Trends in Genetics.*, 27:224–232.
- 6- Faust, D., Al-Butmeh, F., Linz, B., Dietrich, C., 2012, Involvement of the transcription factor FoxM1 in contact inhibition, *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 426:659–663.
- 7- Feinstein, W. P., Brylinski, M., 2015, Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets, *Journal of Cheminformatics.*, 7:18.
- 8- Gormally, M. V., Dexheimer, T. S., Marsico, G., Sanders, D. A., Lowe, C., Matak-Vinković, D., Michael, S., Jadhav, A., Rai, G., Maloney, D. J., Simeonov, A., Balasubramanian, S., 2014, Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition, *Nature Communications.*, 5:51–65.
- 9- Halasi, M., Gartel, A. L., 2013, Targeting FOXM1 in cancer, *Biochemical Pharmacology.*, 85:644–652.
- 10- Hegde, N. S., Sanders, D. A., Rodriguez, R., Balasubramanian, S., 2011, The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thioestrepin, *Nature Chemistry.*, 3:725–731.
- 11- Huang, C., Du, J., Xie, K., 2014, FOXM1 and its oncogenic signaling in pancreatic cancer pathogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.*, 1845:104–116.
- 12- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996, VMD: Visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics.*, 14:33–38.
- 13- Jaghoori, M. M., Bleijlevens, B., Olabarriaga, S. D., 2016, 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening, *Journal of Computer-Aided Molecular Design.*, 30:237–249.
- 14- Jaiswal, N., Chakraborty, S., Nag, A., 2014, Biology of foxm1 and its emerging role in cancer therapy, *Journal of Proteins and Proteomics.*, 5:1–24.
- 15- Koo, C.-Y., Muir, K. W., Lam, E. W.-F., 2012, FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.*, 1819:28–37.
- 16- Kumari, R., Kumar, R., Lynn, A., 2014, g_mmpbsa —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations, *Journal of Chemical Information and Modeling.*, 54:1951–1962.
- 17- Lagorce, D., Sperandio, O., Baell, J. B., Miteva, M. A., Villoutreix, B. O., 2015, FAF-Drugs3: a web server for compound property calculation and chemical library design, *Nucleic Acids Research.*, 43: 200–207.
- 18- Littler, D. R., Alvarez-Fernandez, M., Stein, A., Hibbert, R. G., Heidebrecht, T., Aloy, P., Medema, R. H., Perrakis, A., 2010, Structure of the FoxM1 DNA-recognition domain bound to a promoter sequence, *Nucleic Acids Research.*, 38:4527–4538.
- 19- Martínez, L., 2015, Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis, *PLoS ONE.*, 10:1–10.
- 20- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., 2009, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry.*, 30:2785–2791.
- 21- Neron, B., Menager, H., Maufrais, C., Joly, N., Maupetit, J., Letort, S., Carrere, S., Tuffery, P., Letondal, C., 2009, Mobylye: a new full web bioinformatics framework, *Bioinformatics.*, 25:3005–3011.
- 22- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G. R., 2011, Open Babel: An open chemical toolbox, *Journal of Cheminformatics.*, 3:33.
- 23- RA, L., MB, S., 2011, LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, *Journal of Chemical Information and Modeling.*, 51:2778–2786.
- 24- Radhakrishnan, S. K., Bhat, U. G., Hughes, D. E., Wang, I., Costa, R. H., Gartel, A. L., 2006, Identification of a Chemical Inhibitor of the Oncogenic Transcription Factor Forkhead Box M1, *Cancer Research.*, 66:9731–9735.

- 25- Schmidtke, P., Bidon-Chanal, A., Luque, F. J., Barril, X. ,2011, MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories, *Bioinformatics.*, 27:3276–3285.
- 26- Schmidtke, P., Le Guilloux, V., Maupetit, J., Tuffery, P. ,2010, fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking, *Nucleic Acids Research.*, 38: 582–589.
- 27- Schüttelkopf, A. W., van Aalten, D. M. F. ,2004, PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography.*, 60:1355–1363.
- 28- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. ,2009, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry.*, 30:2785–2791.
- 29- Sterling, T., Irwin, J. J. ,2015, ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone, *Journal of Chemical Information and Modeling.*, 55:2324–2337.
- 30- Sun, L., Ren, X., Wang, I.-C., Pradhan, A., Zhang, Y., Flood, H. M., Han, B., Whitsett, J. A., Kalin, T. V, Kalinichenko, V. V ,2017, The FOXM1 inhibitor RCM-1 suppresses goblet cell metaplasia and prevents IL-13 and STAT6 signaling in allergen-exposed mice, *Science Signaling.*, 10:1-10.
- 31- Tabatabaei-Dakhili, S. A., Aguayo-Ortiz, R., Domínguez, L., Velázquez-Martínez, C. A. ,2018, Untying the knot of transcription factor druggability: Molecular modeling study of FOXM1 inhibitors, *Journal of Molecular Graphics and Modelling.*, 80:197–210.
- 32- Wang, Z., Ahmad, A., Li, Y., Banerjee, S., Kong, D., Sarkar, F. H. ,2010, Forkhead box M1 transcription factor: A novel target for cancer therapy, *Cancer Treatment Reviews.*, 36:151–156.
- 33- Xu, X., Miao, R., Wan, Y., Zhang, L., Qu, K., Liu, C. ,2015, FoxM1 as a Novel Therapeutic Target for Cancer Drug Therapy, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, 16:23–29.

High-throughput structure-based virtual screening to select new inhibitory chemical compound(s) against FOXM1 transcription factor with its DNA target

Merati T. and Mahdiuni H.*

Dept. of Biology, School of Sciences, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

As an important transcription factor, FOXM1 involves in various functions including the control of expression of several genes, the transition of cells into dividing phase, angiogenesis, migration and so on, and its overexpression has been reported in the different types of cancers. Therefore, this protein is a putative drug target in cancer therapy. Hitherto, many compounds and medicines have been targeted FOXM1 including FDI-6 and RCM-1 whose functions are the inhibition of FOXM1-DNA interactions. In this study, in order to inhibit FOXM1-DNA complex formation, in-vitro subset of the ZINC database was evaluated computationally. To achieve this purpose, ligand-binding pockets on the protein were explored firstly by running of MDpocket algorithm. Before computation of affinity binding energy of the compounds to the predicted pockets, the library (circa 260000 compounds) was screened using FAF-drugs4 web server based on the physicochemical properties. Afterwards, the passed compounds were docked on the predicted pockets of FOXM1 using AutoDock-VINA. The screening process was planned according to the affinity binding energy, structural alerts and toxic-free groups. Accordingly, the three compounds acquired the passing score with approximately the same docking energy. To differentiate and ranking of the selected compounds, the MM/PBSA approach was applied on the three ligand-FOXM1 complexes and finally, 1-Hydroxypyrene β -D-Glucuronide was picked out based on its binding free energy. The introduced ligand in this study is the promising novel hit molecule, interrupting FOXM1 interactions with its cognate DNA. However, more experimental efforts need to be performed for recognition of the discovered ligand as lead compound.

Key words: FOXM1, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics simulation, MM-PBSA