

تأثیر پودوفیلوتوکسین به عنوان القاء کننده آپوپتوز با استفاده از روش داکینگ مولکولی

محمدشریف طالبیان پور، حسن بردانیا، محبوبه منصوریان*

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: پودوفیلوتوکسین به عنوان یکی از درمان‌های اصلی زگیل‌های تناسلی استفاده می‌شود. این ترکیب پیش ماده دارویی اتوپوزاید و تنی‌پوزاید است که در درمان سرطان‌های مختلف کاربرد دارد. علی‌رغم نگارش تعداد زیادی پژوهش در زمینه سرطان‌ها، مکانیسم دقیق پودوفیلوتوکسین، مجهول و حل نشده باقی مانده است. سرکوب فعالیت آنزیمی کاسپازهای بالغ در سلول‌های سرطانی در حضور اعضای خاص خانواده پروتئین‌های بازدارنده آپوپتوز (IAPs) مانند پروتئین بازدارنده آپوپتوز وابسته به کروموزوم X (XIAP)، پروتئین شماره ۱ بازدارنده آپوپتوز سلولی (cIAP1) و سورویوین (Survivin) رخ می‌دهد. با اتصال ویژه مقلدهای دومین فعال‌کننده کاسپاز مشتق از میتوکندری به این تنظیم‌کننده‌های منفی آپوپتوز، مهار کاسپازهای مربوط به واسطه پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAPs) برطرف می‌شود و آپوپتوز القا می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین مکانیسم اثر پودوفیلوتوکسین به عنوان القاء کننده آپوپتوز با استفاده از روش داکینگ مولکولی بود.

روش بررسی: این مطالعه بیوانفورماتیک در سال ۱۳۹۹ انجام شد. برای محاسبات برهمکنش مولکولی پودوفیلوتوکسین با پروتئین‌های مرتبط با کاسپازهای آغازگر و افکتور شامل ناحیه سومین تکرار IAP با کلوویروس (BIR3) از XIAP/cIAP1 و سورویوین، لنفوما ۲ لنفوسیت‌های بی (Bcl-2) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) از روش داکینگ مولکولی استفاده شد. جایگاه اتصال نظری پودوفیلوتوکسین بر روی این پروتئین‌های آنتی‌آپوپتیک به عنوان مهارکننده تعیین شد تا اطلاعاتی از نحوه برهمکنش اولیه، انرژی آزاد اتصال و ثابت مهار به دست آید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزارهای مختلف و مقایسه با نتایج مقالات مرتبط تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: فعالیت پروآپوپتوتیک پودوفیلوتوکسین به عنوان یک عامل القاکننده آپوپتوز با مسیرهای سیگنالی کاسپازهای ۳، ۷، ۸ و ۹ مرتبط است. مکانیسم‌های کلیدی فعال‌سازی این کاسپازها ممکن است به دلیل اتصال پودوفیلوتوکسین و القاء تغییرات کنفورماسیونی در جایگاه‌های اتصال BIR3 از XIAP/cIAP1 و سورویوین باشد که در نزدیکی یا در همان محل اتصال مقلدهای دومین فعال‌کننده کاسپاز مشتق از میتوکندری قرار گرفته‌اند. سه پیوند هیدروژنی قوی با اسیدآمینوهای تیروزین ۱۰۸، سرین ۱۱۷ و گلوتامات ۱۱۸، نقش مهمی در تثبیت و پایدار سازی کمپلکس Bcl-2-پودوفیلوتوکسین ایفا می‌کند. پودوفیلوتوکسین مشابه مهارکننده‌های EGFR چندین برهمکنش هیدروفوب و دو پیوند هیدروژنی قوی با ترئونین ۸۳۰ و متیونین ۷۶۹ با انرژی آزاد پیوندی $-7/85$ کیلوکالری بر مول و ثابت مهار $K_i = 1/76$ میکرومولار تشکیل می‌دهد.

نتیجه‌گیری: القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی به وسیله پودوفیلوتوکسین می‌تواند به چندین مکانیسم مختلف نسبت داده شود. کنفورماسیون‌های پیوندی پیش‌بینی شده نشان داد که پودوفیلوتوکسین دارای پتانسیل مهارکنندگی ارزشمندی می‌باشد. بنابراین، پودوفیلوتوکسین ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان مؤثر برای پژوهش‌های بیشتر در توسعه دارو مورد توجه باشد.

واژه‌های کلیدی: پودوفیلوتوکسین، سرطان، آپوپتوز، داکینگ مولکولی

* نویسنده مسئول: محبوبه منصوریان، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه فارماکولوژی

Email: mahboubehmansourian90@gmail.com

مقدمه

مشتق قندی پودوفیلوتوکسین باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) بر روی رده‌های سرطانی کارسینوما تخمدان (Hela) و آدنوکارسینوما ریه (A2) می‌شود (۴). همچنین مطالعه آنالیز آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری نشان داده که پودوفیلوتوکسین باعث القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی 5637 می‌شود (۵). آپوپتوز، یک فرآیند سلولی ضروری در رشد و نمو و هموستازی موجودات چند سلولی است. آپوپتوز مکانیسمی است که بر اساس آن سلول‌هایی که آسیب دیده‌اند دچار مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند تا مانع از پیشروی آسیب در سلول و سلول‌های مجاور گردد (۶). تغییرات در مورفولوژی سلول از جمله برآمدگی غشاء^(۴) و تشکیل اجسام آپوپتوتیک با چروکیدگی سلول، قطعه قطعه شدن DNA، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته در فرآیند آپوپتوز رخ می‌دهد. تنظیم مسیر آپوپتوتیک در پژوهش‌های دارویی متعدد مورد بررسی قرار گرفته است (۷-۹). اختلالات بدخیم فرآیند آپوپتوتیک می‌تواند به طور مستقیم یا غیر مستقیم منجر به بروز بیماری‌های مختلفی از جمله سرطان و آلزایمر شود (۶). سلول‌های سرطانی با توجه به مکانیسم‌های مشخص شده مانع از ایجاد آپوپتوز می‌شوند، بنابراین اختلال و نارسایی در آپوپتوز، ویژگی مهم سلول‌های سرطانی است که به سلول‌ها امکان فرار از مرگ را می‌دهد. یکی از فاکتورهای مهم

جامعه امروزی درگیر بیماری‌های پیچیده و خطرناکی همچون انواع سرطان‌ها شده است، به طوری که درمان این بیماری‌ها عموماً کاری دشوار بوده و هزینه‌های زیادی را برای بیماران به همراه دارد. سرطان به عنوان یک مسئله سلامت جهانی، عامل بیش از ۱۸/۶ میلیون مرگ و میر تا سال ۲۰۶۰ خواهد بود و میزان پیشرفت آن نسبت به چندین سال گذشته به طور معنی‌داری بیشتر بوده است (۱). ترکیب پودوفیلوتوکسین که با عنوان پودوفیلوکس شناخته شده است، یک سم غیر آکالوئیدی در خانواده لیگنان می‌باشد که از گیاه پودوفیلیوم (*Podophyllum peltatum*) از خانواده زرشک (*Berberidaceae*) جداسازی شده و به عنوان یکی از درمان‌های اصلی زگیل‌های تناسلی استفاده می‌شود. پودوفیلوتوکسین و مشتقاتش از رشد سلول‌های اپی‌تلیال تحت اثر ویروس پاپیلوماوی انسانی (HPV)^(۱) در اپیدرم ممانعت می‌کند. این ترکیب پیش ماده ترکیب‌های مهم ضدسرطان به نام اتوپوزاید^(۲) و تنی پوزاید^(۳) است که در درمان سرطان‌های مختلف مانند سرطان ریه، سرطان بیضه و لمفوما کاربرد دارد. پژوهش‌هایی نیز در زمینه تأثیر پودوفیلوتوکسین و مشتقات آن روی رده‌های سلولی سرطانی صورت گرفته است (۲).

علی‌رغم نگارش تعداد زیادی پژوهش در زمینه مکانیسم تأثیر پودوفیلوتوکسین بر سرطان‌ها و ارایه مکانیسم‌های پیشنهادی، مکانیسم دقیق این دارو، مشخص نیست (۳). پژوهش‌ها نشان داده است که

1-Human Papilloma Virus
2-Etoposide
3-Teniposide
4-Membrane Blebbing

آنها مهم می‌باشد (۷ و ۱۵). از میان هشت عضو IAP که در سلول‌های پستانداران شناسایی می‌شوند، cIAP1 و 2 مهارکننده غیرمستقیم فعال‌سازی کاسپاز ۸ هستند (۱۶ و ۱۳). XIAP قادر است از طریق دومین سوم BIR (BIR3) خود (XIAP-BIR3)، کاسپاز ۹ آغازگر را به طور مستقیم مهار کند (۱۷ و ۱۵، ۱۳) که به وسیله دومین BIR3 از cIAP1 (cIAP1-BIR3) نیز قابل تشخیص است (۱۸).

دومین فعال‌کننده کاسپاز مشتق از میتوکندری / پروتئین مستقیماً وصل شونده به بازدارنده آپوپتوز با نقطه ایزوالکتریک کم (Smac/DIABLO) (۱۰)، آنتاگونیست اندوژن cIAP1/2 و XIAP است (۱۷). Smac/DIABLO که از غشای درونی میتوکندری به سیتوزول آزاد می‌شود، به طور درونزا، فعالیت بازدارندگی IAPs بر روی کاسپازها را متوقف می‌کند، اما ممکن است مقادیر فیزیولوژیکی آن برای غلبه بر اثر مهارتی XIAP/cIAP1 در کاسپازها کافی نباشد. برخی از ترکیبات سنتتیک کوچک، که مقلدهای Smac (Smac-Mimetics) (۱۱) نامیده می‌شوند، می‌توانند سلول‌های بدخیم را از طریق مهار سریع cIAP1/2 از بین ببرند و همچنین عملکردهای XIAP را آنتاگونیزه کنند (۱۴ و ۷). این اتصال ویژه

در کنترل تکثیر سلول‌های سرطانی القاء آپوپتوز در آنهاست. فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ آپوپتوتیک، یکی از اهداف داروهای ضدسرطانی در القای سیتوتوکسیته یا سمیت سلولی می‌باشد (۱۰). آپوپتوز، با شبکه‌های پیچیده برهم کنش پروتئین تنظیم می‌شود که فازها و مراحل آن به زیر مجموعه‌ای از کاسپازها (proteases اختصاصی ASPartyl وابسته به سیستمین) (۱) وابسته است (۷). کاسپازهای مؤثر در آپوپتوز سلولی، را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد: کاسپازهای آغازگر (۲) (کاسپاز ۲، ۸، ۹ و ۱۰) و کاسپازهای افکتور (۳) (کاسپاز ۳، ۶ و ۷) (۱۱). زنده ماندن و مرگ هر سلول، در نهایت بستگی به برهمکنش متقابل (۴) مسیرهای سیگنالینگ پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک دارد (۱۲).

سرکوب فعالیت آنزیمی کاسپازهای بالغ در سلول‌های توموری در حضور اعضای خاص خانواده پروتئین IAP (۵) پروتئین‌های بازدارنده یا مهارکننده آپوپتوز) رخ می‌دهد (۱۳). IAPs مانند XIAP (IAP مرتبط با کروموزوم X) (۶)، cIAP1 و cIAP2 (IAP سلولی) (۷) در بسیاری از سلول‌های سرطانی با پیشرفت تومور و مقاومت در برابر درمان تنظیم مجدد می‌شوند (۱۴). اعضای خانواده IAP به عنوان بازدارنده‌های سلولی آپوپتوز، تنظیم‌کننده‌های منفی اصلی آپوپتوز هستند. cIAP1 ساختاری مشابه XIAP دارد، اینها حاوی سه ناحیه (دومین) (۸) مختلف تکرار IAP باکلوویروس (BIR) Baculoviral (۹) هستند که عملکردهای متمایزی را نشان می‌دهند که برای فعالیت‌های ضدآپوپتوزیکی

- 1-Cysteine-dependent Aspartyl Specific Prote(ASES)
- 2-Initiator Caspases
- 3-Effector Caspases
- 4-Cross-Talking
- 5-Inhibitor of Apoptosis Proteins(IAP)
- 6-X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)
- 7-Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins cIAP1 and cIAP2
- 8-Domain
- 9-Baculovirus IAP Repeat (BIR)
- 10-Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-binding protein with low pI (Smac/DIABLO)
- 11-Smac-Mimetics

مقلدهای Smac به cIAP1 و XIAP، به عنوان عوامل منحصر به فرد، باعث آزادسازی کاسپازها از Smac می‌شود و مهار کاسپازهای ۸ و ۹ را به واسطه IAPs برطرف می‌کند، در نتیجه باعث آپوپتوز در زیرمجموعه‌ای از رده‌های سلول سرطانی انسان می‌شود (۱۷ و ۱۴، ۷). این نشان می‌دهد که آنتاگونیست‌های دوگانه cIAP1/XIAP می‌توانند آپوپتوز را از طریق مسیرهای بیرونی و داخلی القا کنند (۱۴). سورویوین (Survivin)^(۱) به عنوان کوچک‌ترین عضو IAPs و نیز به عنوان افکتور ترمینال (پایانی) پروتئازهای مرگ سلول، کاسپازهای ۳ و ۷ از طریق دومین BIR عمل کرده و منجر به بازدارندگی فعالیت پروتئاز آن‌ها و در نهایت آپوپتوز می‌شود (۱۹). سورویوین، در بافت‌های نرمال تمایز یافته و غیرقابل تشخیص است، با این حال در بیشتر نئوپلاسم‌های انسانی، بیان افزایش می‌شود (۲۱ و ۲۰). علاوه بر این گزارش شده است که بیان سورویوین بالا، با بیماری تهاجمی‌تر، کاهش آپوپتوز سلول تومور، افزایش مقاومت به داروهای شیمی درمانی و کاهش زمان بقا، مرتبط است (۲۲). سورویوین اکنون به عنوان یک هدف درمانی سرطان شناخته شده است (۲۳). توسعه مقلدهای Smac به عنوان داروهای ضدسرطان جدید، مورد نظر محققان بوده به طوری که چندین ترکیب با هدف قراردادن IAPها در آزمایش‌های بالینی توسعه داده شده‌اند (۲۴ و ۱۴). علاوه بر این، خانواده لنفوم-۲ سلول B (Bcl-2)^(۱) آنتی آپوپتوتیک، مسیر آپوپتوز میتوکندریایی را تنظیم می‌کند. بیان بالای Bcl-2 در

سلول‌های سرطانی منجر به مقاومت به سیس پلاتین شده و با مقاومت سلول سرطانی به عوامل (داروهای) شیمی درمانی با پیشگیری از پاسخ آپوپتوتیک مرتبط است (۲۶ و ۲۵، ۳).

داکینگ مولکولی در جامعه علمی به عنوان ابزاری مهم برای بررسی برهمکنش‌های مقرون به صرفه لیگاند-گیرنده (رسپتور) در یک بازه زمانی بسیار کوتاه محبوبیت پیدا کرده است (۲۷). از آن جایی که اساس خیلی از پروژه‌های کاربردی در سطوح مختلف می‌تواند پژوهش‌های تئوریک باشد، این رویکردهای نظری به عنوان پیش آگهی به پژوهش‌های تجربی در جای خود نیز موجب کم کردن هزینه‌های پژوهش‌های خواهند شد (۲۹ و ۲۸، ۹)، بنابراین با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک، می‌توان محاسبات برهمکنش‌های مولکولی را انجام داد که اساس کار این روش‌ها بر منطق بیوفیزیکی استوار است. استفاده از نتایج روش‌های نظری نرم‌افزارهای کامپیوتری در کنار روش‌های آزمایشگاهی باعث تسریع درک ما از برهمکنش و اثر متقابل مولکول‌ها خواهد شد (۳۰). بنابراین، به عنوان یک روش آلترناتیو، شناسایی برهمکنش‌های مهم پودوفیلوتوکسین با اعضای خانواده IAPها به عنوان تنظیم کننده‌های منفی آپوپتوز از طریق داکینگ مولکولی قابل بررسی است. پودوفیلوتوکسین به عنوان یک مقلد Smac می‌تواند در القای آپوپتوز بر

1-Survivin

2-B-cell Lymphoma-2 (Bcl-2)

و EGFR از روش‌های بیوانفورماتیک استفاده شد. در این مطالعه از نرم‌افزار اتوداک نسخه ۴,۲^(۳) که از قدیمی‌ترین و مشهورترین برنامه‌های داکینگ می‌باشد، استفاده شد^(۳۱). محاسبات کامپیوتری بر طبق پروتکل‌های گزارش شده در منابع انجام شدند^(۲۸). این مطالعه با استفاده از پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک cIAP1-BIR3، XIAP-BIR3، سورویوین، Bcl-2 و EGFR به عنوان رسپتورهای مرتبط با آپوپتوز انجام شد. توالی انسانی رسپتورها از NCBI^(۴) دریافت شد. ساختار اشعه ایکس سه بعدی رسپتورهای انسانی برای داکینگ از بانک داده‌های پروتئین (PDB)^(۵) در مرکز همکاری پژوهشی بیوانفورماتیک ساختاری (RCSB)^(۶) دانلود شد.

ساختار کریستال (بلورین) پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 در کمپلکس با دومین هومولوژی Bcl-2 (BH3) از پروتئین ایکس مرتبط با Bcl-2 (BAX) (BH3)^(۷) با کد 2XA0 به دلیل تشابه توالی ۱۰۰ درصد با حداقل مقدار E برابر با ۹۸-۲/۸e به عنوان تارگت انتخاب شد. پروتئین Bcl-2 از نظر استوکیومتری، مونومر بوده و با دو زنجیره A و B، نقش یک دایمر را بازی می‌کند^(۳۲ و ۳۳). سورویوین، یک پروتئین دایمر (حاوی زنجیره‌های A و B) می‌باشد. زنجیره A و B تقریباً دارای توالی آمینواسیدی یکسانی هستند و تنها

روی رده‌های سلول سرطانی مورد بررسی قرار گیرد^(۷ و ۴).

با توجه به مقاومت تومور به درمان و ایجاد عوارض ناخواسته یا اثرات جانبی، نیاز به تولید و تعیین استراتژی‌های جدید در درمان و بهبود سرطان‌های مختلف به طور شدیدی احساس می‌شود، بنابراین هدف از مطالعه حاضر، تعیین و بررسی تأثیر پودوفیلوتوکسین بر چندین مسیر القای آپوپتوزیس از جمله پروتئین‌های مرتبط با کاسپازهای آغازگر مسیر داخلی (کاسپاز ۹) و خارجی (کاسپاز ۸) آپوپتوز و کاسپازهای افکتور (کاسپاز ۳ و ۷) شامل دومین BIR3 از XIAP و cIAP1 و سورویوین، پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 و یکی از گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)^(۱) به عنوان مسیرهای مهم القای آپوپتوز از روش داکینگ مولکولی بود. برای رسیدن به این هدف، در این پروژه، سعی شد جایگاه اتصال نظری پودوفیلوتوکسین بر روی پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک انسانی مشخص شود تا اطلاعاتی از نحوه برهمکنش اولیه، ریزجوه‌های اسید آمینه درگیر در برهمکنش، انرژی آزاد اتصال و ثابت مهار^(۲) اتصال به دست آید.

روش بررسی

این مطالعه داکینگ مولکولی در سال ۱۳۹۹ انجام شد. برای بررسی برهمکنش ترکیب پودوفیلوتوکسین با پروتئین‌های مرتبط با کاسپازهای افکتور و آغازگر مسیر داخلی (کاسپاز ۹) و خارجی (کاسپاز ۸) آپوپتوز

1-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)
2-Constant
3-AutoDock 4.2
4-National Center for Biotechnology Information (NCBI)
5-Protein Data Bank (PDB)
6-Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)
7-Bcl-2-associated X protein (BAX)- Bcl-2 homology domain (BH3)

زنجیره B دارای دو اسید آمینه اضافی در انتهای کربوکسیل می‌باشد^(۲۰). زنجیره A پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک برای داکینگ انتخاب شده و پپتید پیوندی از قسمت فعال رسپتور Bcl-2 حذف شد^(۳۵) و ^(۲۰، ۳۴، ۱۸).

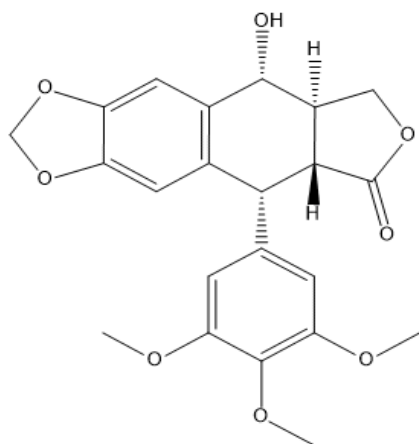
ساختار دو بعدی (2D) ترکیب پودوفیلوتوکسین با استفاده از نرم افزار ChemOffice 2015 ترسیم شده (شکل ۱) و با استفاده از نرم‌افزار هایپر کم ۷/۰ (HyperChem 7.0) بهینه‌سازی شد. با استفاده از میدان نیروی مکانیکی مولکولی MM⁺، محاسبات بهینه‌سازی هندسی سه بعدی برای لیگاند تا زمان به دست آمدن گرادیان ریشه میانگین مربعی کمتر از ۰/۰۱ کیلوکالری بر (آنگستروم مول) انجام شد. کنفورماسیون نهایی با روش AM1 نیمه تجربی محاسبه شد. ساختار مولکولی با استفاده از الگوریتم پلاک-ریبر (Polak-Ribiere)^(۱) تا زمان رسیدن به گرادیان ریشه میانگین مربعی برابر با ۰/۰۱ کیلوکالری بر (آنگستروم مول) بهینه‌سازی شد. بهینه‌سازی هندسی چندین بار با نقاط شروع متفاوت برای لیگاند انجام شد. جزییات روش بهینه‌سازی قبلاً توصیف شد^(۳۶) و^(۲۸). ترکیب پودوفیلوتوکسین بر روی مکان‌های پیوندی (اتصال) رسپتورها با استفاده از نرم افزار اتوداک نسخه ۴٫۲ قرار گرفت^(۳۱). پژوهش داکینگ مولکولی برای این لیگاند برای درک برهم کنش‌های لیگاند-پروتئین به طور مفصل انجام شد. داکینگ با استفاده از روش معمول و پارامترهای پیش فرض این

نرم‌افزار انجام شد^(۳۱). در پروتکل داکینگ، لیگاند به عنوان یک مولکول انعطاف‌پذیر برای چرخش همه پیوندهای قابل چرخش لیگاند برای به دست آوردن بهترین و بهینه‌ترین کانفورمر لیگاند درون مکان‌های فعال رسپتورها در نظر گرفته شد.

در مرحله اول، فایل‌های مختصاتی^(۲) رسپتور و لیگاند آماده شد که این فایل‌ها اطلاعات مورد نیاز اتوگرید^(۳) و اتوداک^(۴) را در بر دارد. در مرحله بعد، گرید مپ‌ها^(۵) با استفاده از اتوگرید (بخشی از بسته نرم‌افزاری اتوداک) ترسیم شد. چون موقعیت محل اتصال لیگاند در کمپلکس از طریق موتاژن یا جهش زایی هدایت یافته مکانی (SDM)^(۱) مشخص شده است، گرید باکس^(۶) بر روی اتم C_α گلوتامات ۳۱۴ از XIAP-BIR3 با رزولوشن ۲/۴ آنگستروم با کد 1NW9 (۳۵)، بر روی اتم C_α آسپاراتات ۳۱۴ از cAIP1-BIR3 با رزولوشن ۲/۳ آنگستروم با کد 3D9U (۱۸)، بر روی اتم C_α گلوتامین ۱۱۸ از Bcl-2 با رزولوشن ۲/۷ آنگستروم با کد 2XA0 (۳۷)، بر روی سورویوین در رزولوشن ۲/۷۱ آنگستروم با کد 1E31 (۳۸ و ۳۹، ۲۰) در مختصات X=-۲۴/۵۳۲ و Y=۳۶/۳۱۷ و Z=۶۴/۹۴ بر روی اتم C_α متیونین ۷۶۹ از EGFR با رزولوشن ۲/۶ آنگستروم با کد 1M17 قرار گرفت^(۳۶ و ۳۹). با استفاده از اتوگرید^(۴)، فایل پارامتر شبکه از طریق

- 1-Polak-Ribiere
- 2-Coordinate
- 3-AutoGrid
- 4-AutoDock
- 5-Grid Map
- 6-Site-Directed Mutagenesis
- 7-Grid Box

در بخش بیوانفورماتیک، اتوداک تولز^(۲) دارای چندین روش برای آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی داکینگ^(۳) است که شامل ابزاری برای دسته‌بندی نتایج بر اساس شباهت کنفورماسیون، دیدن کنفورماسیون‌ها، دیدن برهمکنش‌های بین لیگاندها و پروتئین‌ها و دیدن پتانسیل‌های تمایلی^(۴) ایجاد شده به وسیله اتوگرید است. آنالیز انرژی‌های محاسبه شده و منطقی بودن نتایج دست به دست هم داده تا بهترین جواب را تعیین کنند. در همه این مراحل ساختارهای مولکولی با استفاده از نرم‌افزار سه بعدی مانند VMD (۴۱) قابل مشاهده است. طرح شماتیک دو بعدی نتایج داکینگ به طور بصری (نموداری) برای درک الگوی برهم‌کنش با نرم‌افزار لیگ پلات (LigPlot) تجزیه تحلیل شد (۴۲). نتایج داکینگ مولکولی بایستی با نتایج SDM و مقالات مقایسه و ارزیابی شود (۴۳ و ۴۴):



شکل ۱: ساختار شیمیایی ترکیب پودوفیلوتوکسین

- 1-Lamarckian Genetic Algorithm
- 2-AutoDock Tools
- 3-Docking Simulation
- 4-Affinity Potentials

مقادیر محورهای x,y,z با ابعاد گرید باکس ۵۰×۵۰×۵۰ تنظیم شد. فاصله نقطه شبکه ۰/۳۷۵ آنگستروم به صورت مقدار پیش فرض در نظر گرفته شد. برای سیستم‌های معمولی، اتوداک چندین بار اجرا می‌شود تا چندین کنفورماسیون داک شده به دست آید. تحلیل خوشه‌ای در انتهای آزمایش داکینگ با ۲۰۰ دور انجام شد (۲۸). داکینگ با استفاده از چندین متد جستجو انجام می‌شود. از بین سه الگوریتم متفاوت جستجوی نوع پیوندها و گروه‌های عاملی درگیر اتصال لیگاند (پودوفیلوتوکسین) به پروتئین‌های مرتبط از برنامه الگوریتم ژنتیک لامارکی (LGA)^(۱) در اتوداک برای محاسبه کانفورمرهای متفاوت لیگاند استفاده شد، کارآمدترین متد LGA است (۴۰). انرژی پیوندی برهمکنش نیز با استفاده از نرم‌افزار اتوداک نسخه ۴,۲ محاسبه شد. در نهایت، در این مرحله انرژی آزاد حاصل از برهمکنش لیگاند پودوفیلوتوکسین با پروتئین‌های مرتبط، اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش به دست آمد. نتایج به دست آمده از داکینگ شامل فایل خروجی داکینگ و اشکال سه بعدی از لیگاند متصل شده به ماکرومولکول می‌باشد که با ابزارهای گرافیکی قابل مشاهده است و در تحلیل و به دست آوردن بهترین حالت از لیگاند برای برهمکنش با ماکرومولکول به ما کمک می‌کند. در میان کنفورماسیون‌های مختلف برهم‌کنش‌های بین این ترکیب و تارگت‌های مختلف، کنفورماسیون با بهترین حالت و با کم‌ترین انرژی پیوندی (برحسب کیلوکالری بر مول) انتخاب شد.

یافته‌ها

برهمکنش‌های پودوفیلوتوکسین در داخل اکتیو سایت (A) XIAP-BIR3، (B) cIAP-BIR3، (C) Bcl-2، (D) سورواویون و (E) EGFR در شکل ۲ نشان داده می‌شود.

پودوفیلوتوکسین مشابه مهارکننده‌های XIAP-BIR3، دو پیوند هیدروژنی قوی با اسید آمینه‌های گلوتامات ۳۱۹ و هیستیدین ۳۴۶ رسپتور XIAP-BIR3 تشکیل می‌دهد. لیزین ۳۲۲ پیوند هیدروژنی دیگری در فاصله ۲/۸۴ آنگستروم با بخش متوکسی پودوفیلوتوکسین تشکیل می‌دهد. نتایج داکینگ نشان داد که پودوفیلوتوکسین در یک کنفورماسیون مطلوب، که در ناحیه‌ای متفاوت از ترئونین ۳۰۸ و تریپتوفان ۳۱۰ واقع شده است، اما این برهمکنش باعث نقصان در مهار کاسپاز ۹ شده است (۴۵). علاوه بر این، پودوفیلوتوکسین برهمکنش‌های وان دروالس را با سرین ۳۱۳، گلوتامات ۳۱۴، آلانین ۳۱۶ و گلوتامات ۳۱۸ از XIAP-BIR3 تشکیل داد (شکل 2A). با توجه به نتایج داکینگ، حلقه فنیل از طریق تریپتوفان ۳۲۳ باعث افزایش تماس‌های وان دروالس می‌شود. اگرچه ترئونین ۳۰۸ یک اسید آمینه اصلی برای اتصال لیگاند به XIAP-BIR3 است (۴۶ و ۶)، اما در این مورد، چنین برهمکنشی مشاهده نشده است. علاوه بر این، گلیسین ۳۰۶، لوسین ۳۰۷، آسپاراتات ۳۰۹، تریپتوفان ۳۱۰،

گلوتامات ۳۱۴، گلوتامین ۳۱۹ و تریپتوفان ۳۲۳ برای اتصال مقلدهای Smac ضروری هستند (۴۶ و ۶). ثابت مهار کنندگی پودوفیلوتوکسین، انرژی آزاد اتصال تخمین زده شده و انرژی الکترواستاتیک بر حسب کیلوکالری بر مول در جدول ۱ نشان داده می‌شود.

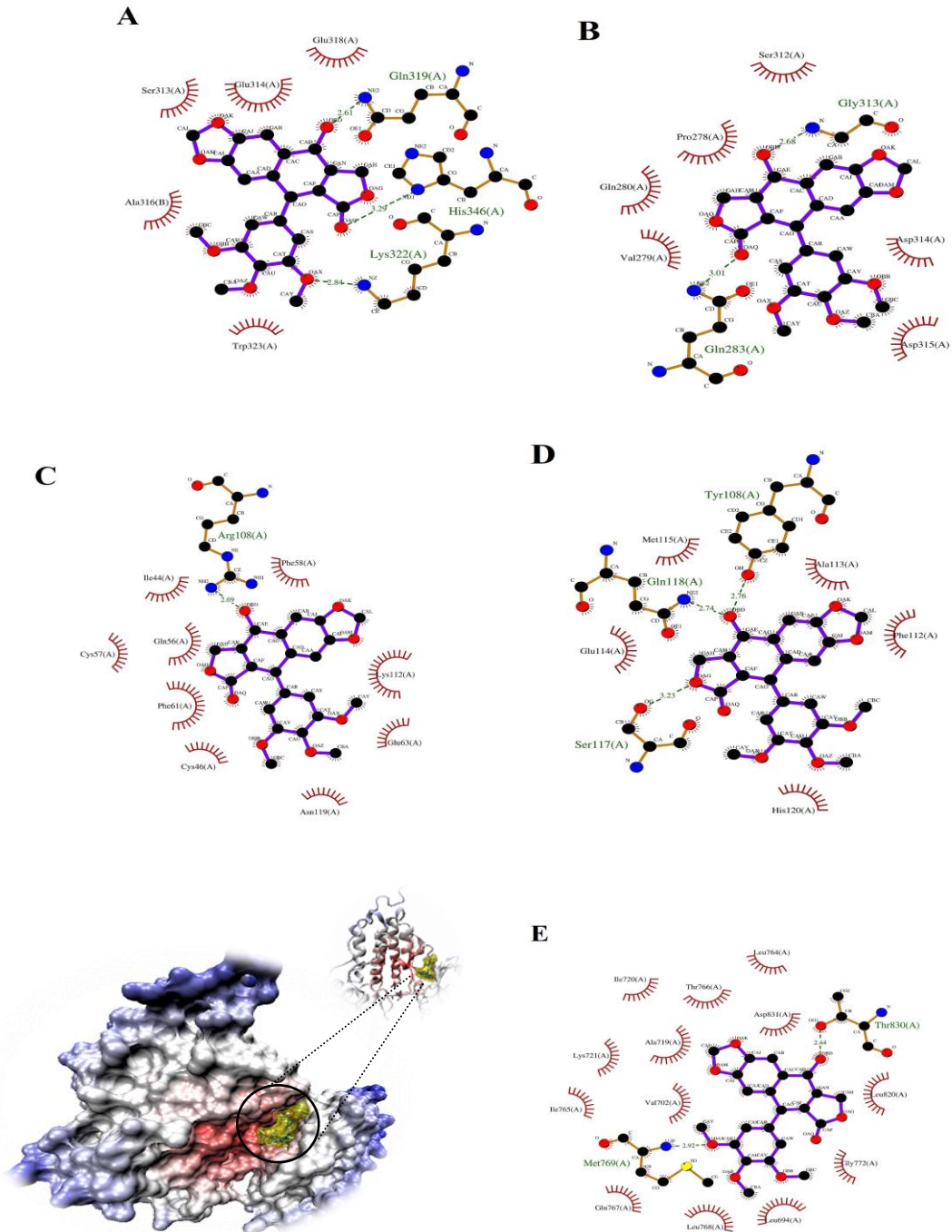
علاوه بر این، دو پیوند هیدروژنی مشابه از طریق هیدروژن هیدروکسی و اکسیژن کربونیل دی‌هیدروفوران پودوفیلوتوکسین و اسید آمینه‌های گلوتامین ۲۸۳ و گلیسین ۳۱۳ داخل شیار BIR3 از cIAP1 در فواصل مختلف ایجاد می‌شود (جدول ۱). دیده می‌شود که ۸ رزجیو اسید آمینه شامل پرولین ۲۷۸، والین ۲۷۹، گلوتامین ۲۸۰، سرین ۳۱۲، آسپاراتات ۳۱۴ و آسپاراتات ۳۱۵ به طور عمده مسئول اتصال هیدروفوبیک پودوفیلوتوکسین هستند، که گلوتامین ۲۸۳ و گلیسین ۳۱۳ از طریق پیوند هیدروژنی هم برهمکنش دارند (شکل ۲B). اتصال پودوفیلوتوکسین به cIAP-BIR3، باعث القاء تغییرات کنفورماسیونی می‌شود که در نتیجه باعث فعال شدن کاسپاز ۸ می‌شود. ساختار کمپلکس cIAP-BIR3/پودوفیلوتوکسین نشان می‌دهد که برهمکنش‌های نمایش داده شده به وسیله پودوفیلوتوکسین مشابه یافته‌های دیگران است (۲۴ و ۱۴).

الکترواستاتیک برابر با ۰/۱۵- کیلوکالری بر مول مطلوب است. آمینواسیدهای تیروزین ۱۰۸ و گلوتامین ۱۱۸ بقایای متداولی هستند که با مهارکننده‌های Bcl-2 واکنش می‌دهند و لازم به ذکر است که گلوتامین ۱۱۸ بر هم کنش‌ها و پیوندهای قوی با پپتید BAX برقرار می‌کند (۴۸ و ۴۳، ۳۲).

پودوفیلوتوکسین مشابه مهارکننده‌های EGFR مانند ارلوتینیب از طریق دو پیوند هیدروژنی قوی به ترئونین ۸۳۰ و متیونین ۷۶۹ به ترتیب در فواصل ۲/۴۴ آنگستروم و ۲/۹۲ آنگستروم متصل می‌شود. پیوندهای هیدروژنی به عنوان پایدارکننده‌های برهمکنش لیگاند - پروتئین محسوب می‌شوند. همان طور که در شکل ۲E نشان داده شده است، پودوفیلوتوکسین با اسیدآمینوهای زیادی برهمکنش‌های هیدروفوب تشکیل می‌دهد که در توافق با پژوهش‌های گذشته می‌باشد (۴۹ و ۳۶). بر طبق ثابت مهارکنندگی پودوفیلوتوکسین ۱/۷۶ میکرومولار، برهم کنش با انرژی آزاد پیوندی ۷/۸۵- کیلوکالری بر مول مطلوب است. نیروی الکترواستاتیک پودوفیلوتوکسین برابر با ۰/۱۳- کیلوکالری بر مول است که نشان دهنده برهم کنش خوب بین پروتئین - دارو است (۲۰). کنفورماسیون‌های پیوندی پیش‌بینی شده نشان داد که ترکیب پودوفیلوتوکسین دارای پتانسیل مهارکنندگی ارزشمندی می‌باشد.

علاوه بر این، یک پیوند هیدروژنی قوی با نیتروژن آرژینین ۱۰۸ و اکسیژن هیدروکسیل در فاصله ۲/۶۹ آنگستروم بین این دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی، نقش‌های مهمی در تثبیت و پایدارسازی کمپلکس سورواپوین-پودوفیلوتوکسین ایفا می‌کنند (شکل ۲C). قابل ذکر است که بقایای ایزولوسین ۴۴، سیستئین ۴۶، گلوتامین ۵۶، سیستئین ۵۷، فنیل آلانین ۵۸، فنیل آلانین ۶۱، گلوتامات ۶۳، لیزین ۱۱۲ و آسپاراژین ۱۱۹ از سورواپوین، مسئول اصلی برهمکنش‌های آب‌گریز بین مولکولی هستند که مشابه یافته‌های دیگران است (۴۷ و ۳۰).

همان طوری که در شکل ۲D نشان داده شده است، ترکیب پودوفیلوتوکسین در فاصله ۴/۰ آنگستروم از اسید آمینوهای Bcl-2 از جمله تیروزین ۱۰۸، فنیل آلانین ۱۱۲، آلانین ۱۱۳، گلوتامات ۱۱۴، متیونین ۱۱۵، سرین ۱۱۷، گلوتامین ۱۱۸ و هیستیدین ۱۲۰ برای تشکیل برهم کنش‌های آب‌گریز بین مولکولی قرار گرفت. به علاوه، پودوفیلوتوکسین، سه پیوند هیدروژنی قوی را با تیروزین ۱۰۸، سرین ۱۱۷ و گلوتامات ۱۱۸ در فواصل مختلف تشکیل داد. بر طبق ثابت بازدارندگی پودوفیلوتوکسین ۲۸/۱۷ میکرومولار، برهم کنش با انرژی آزاد اتصال ۶/۲۱- کیلوکالری بر مول و با نیروی



شکل ۲: برهمکنش شماتیک بهترین کنفورماسیون پودوفیلوتوکسین حاصل از نرم افزار اتوداک ارایه شده به وسیله نرم افزار لیگ پلات با (A) دومین سوم تکرار IAP باکلوویروس (BIR3) از پروتئین بازدارنده آپویتوز وابسته به کروموزوم X (XIAP) و (B) پروتئین شماره ۱ بازدارنده آپویتوز سلولی (cIAP1)، (C) سورواپوین (Survivin)، (D) لنفوم سلول B (Bcl-2) و (E) گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR). در این شکل، ترکیب پودوفیلوتوکسین با رنگ آبی نشان داده شده است. پیوند هیدروژنی به رنگ سبز و برهمکنش‌ها و پیوندهای وان دروالسی با دایره‌های قرمز نشان داده شده‌اند. ساختار پودوفیلوتوکسین در اکتیو سایت EGFR در سمت چپ با استفاده از نرم افزار سه بعدی VMD نشان داده می‌شود.

جدول ۱: جزئیات برهمکنش های بر اساس انرژی از ترکیب پودوفیلوتوکسین به عنوان مهارکننده های رسپتور دومین سومین تکرار IAP باکلویروس (BIR3) از پروتئین بازدارنده آپوپتوز وابسته به کروموزوم X (XIAP) و پروتئین شماره ۱ بازدارنده آپوپتوز سلولی (cIAP1)، سورویوین (Survivin)، لنفوم سلول B (Bcl-2) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR).

رسپتور	انرژی آزاد اتصال (کیلوکالری بر مول)	انرژی الکترواستاتیک (کیلوکالری بر مول)	ثابت مهار (میکرو مولار)	جزئیات برهمکنش ها		فاصله (Å)
				لیگاند	رسپتور	
XIAP-BIR3	-۵/۸۳	-۰/۷۱	۵۳/۳۱	OBD	گلوتامین ۳۱۹	NE2 ۲/۶۱
				OAX	لیزین ۳۲۲	NZ ۲/۸۴
				OAQ	هیستیدین ۳۴۶	ND1 ۳/۲۹
cIAP-BIR3	-۵/۱۰	-۰/۱۵	۱۸۱/۶۷	OAQ	گلوتامین ۲۸۳	NE2 ۳/۰۱
				OBD	گلیسین ۳۱۳	N ۲/۶۸
Survivin	-۵/۲۹	-۰/۰۳	۱۳۲/۵۱	OBD	آرژنین ۱۰۸	NH2 ۲/۶۹
Bcl-2	-۶/۲۱	-۰/۱۵	۲۸/۱۷	OBD	تیروزین ۱۰۸	OH ۲/۷۶
				OAG	سرین ۱۱۷	OG ۳/۲۳
				OBD	گلوتامات ۱۱۸	NE2 ۲/۷۴
EGFR	-۷/۸۵	-۰/۱۳	۱/۷۶	OAX	متیونین ۷۶۹	N ۲/۹۲
				OBD	ترئونین ۸۳۰	OG1 ۲/۴۴

بحث

پروتئین های آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و سورویوین و همچنین EGFR می شود. بنابراین، القای آپوپتوز به وسیله پودوفیلوتوکسین ممکن است از طریق مسیرهای مختلف در تنظیم آپوپتوز با مهار پروتئین های Bcl-2، سورویوین و EGFR و فعال سازی کاسپاز ۸ و ۹ صورت گیرد.

برخی ترکیبات شیمیایی دارای چندین فعالیت زیستی (بیولوژیکی)، شیوه ها و مکانیسم های عمل متفاوت یا دوگانه، پروفایل انتخابی اصلاح شده و اثرات جانبی نامطلوب پایین به دلیل وجود فارماکوفورها^(۲) در یک داربست مولکولی می باشند (۵۰). تنظیم مسیر آپوپتوز به طور گسترده ای در پژوهش های دارویی مورد مطالعه قرار گرفته

پودوفیلوتوکسین در القای آپوپتوز بر روی رده های سلول سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است (۴)، لذا هدف از این مطالعه تعیین مکانیسم اثر پودوفیلوتوکسین بر چندین مسیر القای آپوپتوزیس به عنوان القاء کننده آپوپتوز با استفاده از روش داکینگ مولکولی بود.

در این پروژه برهمکنش پیوندی پودوفیلوتوکسین به عنوان یک مقلد Smac با دومین های BIR3 از cIAP1 و XIAP و همچنین با رسپتورهای سورویوین، Bcl-2 و EGFR مورد بررسی قرار گرفت. پژوهش های کامپیوتری مربوط به بررسی مسیر آپوپتوتیک نشان داد که به طور بالقوه، پودوفیلوتوکسین موجب فعال سازی پروتئین نقاط واریسی^(۱) داخلی کاسپاز ۹ و خارجی کاسپاز ۸ و مهار

1-Checkpoint Protein
2- Pharmacophores

مرگ(DISC)^(۵) فعال می‌کند(۲۰ و ۱۹، ۱۰). کاسپازها به وسیله بسیاری از فرآیندهای سلولی تنظیم می‌شوند. مهار فعالیت کاسپاز درون سلول‌های سرطانی در حضور اعضای خاص خانواده پروتئین IAP رخ می‌دهد(۵۲ و ۷). به بیان دیگر، IAP ها به عنوان پروتئین‌های تنظیم‌کننده منفی آپوپتوز عمل می‌کنند که به شکل درونزا مانع از مرگ سلول با مهار فعالیت‌های آنزیمی کاسپازهای بالغ می‌شود(۵۳). همان‌طور که XIAP و cIAP1 آپوپتوز را با مکانیسم‌های مختلف تنظیم می‌کنند، مهارکننده‌های انتخابی IAP می‌توانند ابزار ارزنده‌ای در بررسی نقش این پروتئین‌های IAP در تنظیم آپوپتوز و بیماری‌های انسانی باشند(۱۷).

بر طبق نتایج بیوانفورماتیک در خصوص مسیرهای احتمالی القای آپوپتوز، در این پروژه تلاش شد تا نقاط اتصال(مکان‌های پیوندی) نظری پودوفیلوتوکسین به عنوان یک مهارکننده انتخابی IAP بر روی پروتئین‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز در مسیرهای متفاوت تعیین شود تا اطلاعاتی در خصوص انرژی اتصال(پیوندی) برهم‌کنش بالقوه اولیه این القاکننده و نحوه اتصال آن به دست آید. بنابراین، به منظور درک مکانیسم اتصال بالقوه پودوفیلوتوکسین با رسپتورهای آنتی‌آپوپتوتیک و حساسیت سلول‌های سرطانی به آپوپتوز، روش

است(۴۷ و ۳۰، ۷). در سلول‌های سرطانی، آپوپتوز می‌تواند از طریق فعال‌سازی مولکول‌های بالادست سیگنالینگ آپوپتوز یا از طریق مهار کنندگی فاکتورهای آنتی‌آپوپتوتیک القا شود(۱ و ۱۰، ۹). القای آپوپتوز با فعال‌سازی در پاسخ به محرک‌های مختلف مرگ سلول از طریق مسیرهای بیرونی(گیرنده مرگ)^(۱) و مسیرهای درونی(میتوکندریایی)، انجام می‌شود(۱۰ و ۹). مسیر داخلی، در پاسخ به تعدادی از شرایط استرس‌زا از جمله آسیب DNA و استرس اکسیداتیو که موجب القای آزادسازی پروتئین‌های میتوکندری نظیر سیتوکروم C از فضای بین غشایی به سیتوزول می‌شود، فعال می‌گردد. سیتوکروم C با برخی مولکول‌های دیگر نظیر فاکتور ۱ فعال‌کننده پروتئین آپوپتوزیس(Apaf-1)^(۲) و ATP (یا dATP)، تشکیل یک کمپلکس مولتی مری یعنی آپوپتوزوم می‌دهد که موجب بهبود فعال‌سازی کاسپاز ۹ می‌شود. سپس، کاسپاز ۹ فعال شده، کاسپازهای افکتور نظیر: کاسپاز ۳، ۶ و ۷ را فعال می‌کند. مسیر خارجی مرگ سلولی به طور مستقل از میتوکندری عمل می‌کند. این مسیر به وسیله گیرنده‌های مرگ سلول سطح سلولی CD95(Apo-1 یا FAS) / لیگاند القاکننده آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز تومور(TRAIL)^(۳) / فاکتور نکروز تومور(TNF)^(۴) پروتئین‌های خانواده گیرنده ۱ که بر روی غشای پلازما قرار دارند، فعال می‌شود و مستقیماً آبشار کاسپاز را از طریق به کارگیری پروکاسپاز ۸، کاسپاز ۸ "آغازگر" در یک کمپلکس پیام‌رسان القاگر

- 1- Death receptor
- 2-Apoptosis protease activating factor (Apaf)
- 3-Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)
- 4-Tumor Necrosis Factor (TNF)
- 5-Death-Inducing Signaling Complex (DISC)

آپوپتوتیک در سلول‌های سرطانی و توسعه مقاومت چند دارویی سرطان می‌شود (۳۰ و ۳۱). در چندین رده سلول سرطانی، حضور سورویوین با مقاومت بالا به آپوپتوز همبستگی دارد، زیرا موجب افزایش بدخیمی می‌شود (۳۴). پژوهش‌های آزمایشگاهی برون‌تنی نشان داد که بازدارندگی سورویوین موجب احیاء یا بهبود سیتوتوکسیته معرف‌های شیمیایی می‌شود (۵۴ و ۳۴) و پژوهش‌های حیوانی، کارایی عالی را نسبت به زئوگراف‌ها با استفاده از یک استراتژی آدنوویرال هدف برای سورویوین نشان می‌دهد (۵۵ و ۳۴).

بنابراین، ارزیابی ترکیب پودوفیلوتوکسین به عنوان یک مقلد Smac علاوه بر BIR3 از XIAP/cIAP1 برای دومین BIR سورویوین به طور بالقوه از طریق داکینگ مولکولی برای ویژگی ضدسرطانی آن، انجام شد. اتصال پودوفیلوتوکسین در مطالعه حاضر مانند دیگر مهارکننده‌ها به دومین BIR سورویوین و BIR3 از XIAP/cIAP1 ممکن است منجر به آزادسازی کاسپازها از این پروتئین‌ها و بهبود آپوپتوز مشابه با نتایج گزارش شده شود (۵۲ و ۵۱، ۴۷، ۲۰). برای مثال، مهارکننده‌های سورویوین می‌توانند به دومین BIR سورویوین در مکان اتصال نظیر Smac/DIABLO با راهبرد اتصال مناسب متصل شوند (۵۳ و ۳۰، ۲۰). علاوه بر این، برطبق نتایج برهمکنش ترکیب پودوفیلوتوکسین با پروتئین سورویوین لازم به یادآوری می‌باشد که پروتئین سورویوین حاوی یک

داکینگ مولکولی ابتدا بر روی دومین‌های BIR3 از XIAP/cIAP1 و سورویوین به عنوان یک مقلد Smac انجام شد.

مکانیسم کلیدی نشان می‌دهد که القای آپوپتوز ممکن است به دلیل اتصال پودوفیلوتوکسین در اکتیوسایت‌های BIR3 از XIAP/cIAP1 و سورویوین باشد که در نزدیکی یا در همان محل اتصال مقلدهای Smac قرار دارند. یافته‌های داکینگ مولکولی اولین گزارش را تأیید می‌کنند که پودوفیلوتوکسین احتمالاً می‌تواند اتصال کاسپازها به دومین‌های BIR3 از cIAP1 و XIAP را در جهت القای آپوپتوز مهار کند که نیاز به پژوهش‌های بیشتر برون‌تنی^(۱) می‌باشد. IAPs نظیر XIAP/cIAP1-BIR3 و سورویوین می‌توانند به کاسپازها که پروتئین‌های ضروری در آپوپتوز هستند متصل شده و متعاقباً، فعالیت آن‌ها را مهار کنند (۵۲). IAPs همچنین می‌توانند به طور مستقیم فعالیت کاسپازهای ۳، ۷، ۸ و ۹ را مهار کرده و بنابراین، رویدادهای آپوپتوتیک پایین دست را مهار کنند (۵۱ و ۳). علاوه بر آن، سورویوین، نقشی حیاتی در مهار آپوپتوز و تقسیم سلول ایفا می‌کند. پژوهش‌ها حاکی از آن است که بیان بیش از اندازه سورویوین باعث شده است تا به یک هدف انتخابی تبدیل شود که به وسیله عوامل کموپروتکتیو^(۲) مهار شده و منجر به القای آپوپتوز به ویژه در سلول‌های سرطانی شود. کاهش یا مهار بیان سورویوین همراه با عوامل سیتوتوکسیک دیگر می‌تواند یک روش مؤثر در درمان سرطان باشد (۲۰). افزایش بیان ژن سورویوین موجب مهارکنندگی

1-In vitro
2-Chemo-Protective Agents

دومین BIR با انتهای آمینی از آمینواسید ۱۵ تا ۸۹ و یک مارپیچ با انتهای کربوکسیلیک طولانی از آمینواسید ۱۰۰ تا ۱۴۰ در ساختار خود می‌باشند. یون روی در ساختار سوروایوین، در مرکز دومین BIR واقع شده و نقش مهمی در تثبیت و پایدارسازی دومین BIR ایفا می‌کند. این دومین، نقشی اساسی در بازدارندگی فعالیت کاسپاز ایفا می‌کند (۲۱ و ۱۹). از طرف دیگر خانواده پروتئین‌های Bcl-2، یک تنظیم کننده مرکزی در مسیر آپوپتوز داخلی است، این پروتئین‌های مرتبط به صورت مشترک دارای حداقل یکی از چهار منطقه همولوگ هستند که موسوم به دومین‌های همولوژی Bcl (BH) (BH1 تا BH4) بوده و توانایی پروتئین‌های Bcl-2 را برای اتصال به یکدیگر برای تشکیل همودایمرها و هتروداایمرها کنترل می‌کنند. دومین‌های BH، در سطوح متعدد، در عملکرد این پروتئین‌ها در مرگ و بقای سلول سهم دارند (۵۶ و ۱۲). پروتئین Bcl-2، به سطح بیرونی میتوکندری و گاهی اوقات شبکه آندوپلاسمی متصل شده و اعضای پروآپوپتیک نظیر Bax را از میتوکندری جدا کرده و از مرگ آپوپتوتیک سلول پیشگیری می‌کند (۵۷). سطح بالای بیان Bcl-2 در سلول‌های سرطانی از آپوپتوز پیشگیری کرده و منجر به پیشرفت تومور می‌شود. بیان بالای Bcl-2 در بسیاری از سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو گزارش شده است (۲۶ و ۲۵، ۹، ۳). یافته‌های داکینگ مولکولی مطالعه حاضر در راستای نتایج پژوهش‌هایی است که بر اساس آن مولکول‌های کوچکی به عنوان

آنتاگونیست‌های قوی و انتخابی Bcl-2، به دلیل قابلیت‌های ضد سرطانی سنتز شدند (۴۸ و ۳۲، ۳۰، ۲۹).

اگرچه Bcl-2 و سوروایوین هر دو بازدارنده‌ها و مهارکننده‌های آپوپتوز هستند، آن‌ها از طریق مسیرهای مختلف در تنظیم آپوپتوز سلول نقش ایفا می‌کنند. پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 عمدتاً موجب بازدارندگی و مهار مسیرهای میتوکندریایی می‌شود (۵۸ و ۴۷، ۳۴)، در حالی که سوروایوین به طور مستقیم، پردازش و فعال‌سازی کاسپاز ۳ و ۷ را مهار می‌کند که معمولاً در پایین دست هر دو مسیر سیگنالینگ آپوپتوز عمل می‌کند (۵۹ و ۳۴). پروتئین Bcl-2 غالباً در میتوکندری قرار دارد که در آن، نقطه تصمیم حیاتی، یعنی آزادسازی سیتوکروم C تنظیم می‌شود. در سلول‌های سرطانی، آن‌ها از تشکیل یک منفذ در غشای میتوکندری و آزادسازی سیتوکروم C پیشگیری می‌کنند. از این رو، آن‌ها مانع از فعال‌سازی کاسپاز ۹ و ۳ در مولکول‌های پایین دست می‌شوند. گفته می‌شود که کاهش در بیان پروتئین Bcl-2 می‌تواند منجر به آزاد سازی سیتوکروم C و در نتیجه آپوپتوز سلول شود (۲۶ و ۲۵، ۹، ۳). نتایج کامپیوتری ما نشانگر آن است که احتمالاً مهار پروتئین Bcl-2 به وسیله پودوفیلوتوکسین می‌تواند، همچنین باعث القای آپوپتوز از این مسیر شود. بر این اساس، نتایج داکینگ مولکولی مؤید این است که احتمالاً القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی به وسیله

است از طریق این مسیرها در درمان بیماری‌های مخرب مثل بیماری سرطان مفید باشد.

محدودیت اصلی داکینگ مولکولی به دلیل عدم اطمینان در توانایی نمره گذاری توابع برای ایجاد انرژی اتصال صحیح است. یکی از چالش‌های عمده دیگر وجود گیرنده سفت و سخت می باشد، طیف فعالیت در برابر پروتئین‌های خارج از هدف چیزی است که حتی در صفحه‌های محاسباتی به ندرت دیده می شود و فقط توسط آزمایشات انسانی و حیوانی مورد بررسی قرار می گیرد. بنابراین، پیشنهاد می شود که اثر مهارى پودوفیلوتوکسین بر روی این پروتئین‌ها، از طریق پژوهش‌های تجربی در سطح بیان ژن و پروتئین مانند آنالیز RT-PCR^(۲) و آنالیز گران قیمت وسترن بلات^(۳) مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی داده‌های نظری حاضر نشان می دهد که پودوفیلوتوکسین می تواند آپوپتوز را از طریق مسیرهای مختلف، القاء کند، اما القای آپوپتوز، باید در سطوح پروتئینی نیز تأیید شود. پژوهش‌های داکینگ مولکولی، اطلاعات خوبی را در خصوص تمایل اتصال (پیوندی)^(۴) ترکیب پودوفیلوتوکسین ارایه کرد و به درک برهمکنش‌ها کمک کرد که نیازمند آزمایش‌های بیوشیمیایی بیشتری می باشد. نتایج نشان داد که اثر

پودوفیلوتوکسین با مسیرهای سیگنالینگ اختلال عملکرد میتوکندری به عنوان مسیرهای داخلی مرتبط می باشد.

به طور کلی یافته‌های حاضر نشان می دهد که القای آپوپتوز به وسیله ترکیب پودوفیلوتوکسین می تواند از طریق مهار اعضای خانواده IAP ها شامل: XIAP/cIAP1-BIR3 و سورویوین، پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و EGFR انجام شود. اثر آنتی پroliferative (ضد تکثیری)^(۱) پودوفیلوتوکسین به چندین مکانیسم اولیه نسبت داده می شود که احتمالاً این مکانیسم‌ها منجر به القای آپوپتوز و بیان پروتئین‌ها و ژن‌های مرتبط با آپوپتوز می شود (۶۰ و ۴۸، ۴۷، ۷، ۴). با این حال، تلاش‌های مستمر و پیوسته برای اثبات توانایی ترکیب پودوفیلوتوکسین با تارگت قراردادن تنظیم کننده‌های آپوپتوز مورد مطالعه و نیز پژوهش‌های برون تنی، بایستی انجام شوند تا شواهد بیشتری را در خصوص مکانیسم اثر القایی آپوپتوز پودوفیلوتوکسین بر روی رده‌های سلول سرطانی مشابه با نتایج قبلی ارایه کنند (۶۰، ۲۹، ۲۰، ۷، ۴).

در نهایت، به نظر می رسد پودوفیلوتوکسین، که دارای ساختار مناسب برای قرارگیری گروه‌های فارماکوفور در موقعیت‌های فضایی مناسب در فعالیت‌های آپوپتوزیس می باشد، احتمالاً می تواند برای فعالیت‌های مهار کننده بر روی پروتئین‌های ضد آپوپتوز در جهت القای آپوپتوز مفید باشد. با بررسی چندین مسیر احتمالی مهم آپوپتوزیس در این مطالعه به نظر می رسد که پودوفیلوتوکسین ممکن

1-Anti-Proliferative
2-Real Time-PCR
3-Western blot analysis
4-Binding affinity

سینرژیستی(هم افزایی) بالقوه این ترکیب بر روی القای آپوپتوز می‌تواند ناشی از تنظیم مسیرهای مختلف آنتی‌آپوپتوتیک و پرولیفراتیو مختلف از جمله مهار رسپتورهای XIAP/cIAP1-BIR3، سورویوین به عنوان یک مقلد Smac در جهت فعال‌سازی کاسپاز ۳، ۷، ۸ و ۹ و یا به عنوان مهارکننده Bcl-2 و EGFR باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از یک طرح پژوهشی در دانشگاه علوم پزشکی یاسوج با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1396.88 می‌باشد، بدین وسیله نویسندگان از همکاری حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج در جهت اجرای آن تقدیر و تشکر می‌نمایند.

REFERENCES

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health* 2019; 9(4): 217-22.
2. Gordaliza M, Castro Md, Miguel del Corral J, Feliciano AS. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Current Pharmaceutical Design* 2000; 6(18): 1811-39.
3. Singh M, Chaudhry P, Fabi F, Asselin E. Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance. *BMC Cancer* 2013; 13(1): 233.
4. Qi Y-l, Liao F, Zhao C-q, Zuo M-x. Cytotoxicity, apoptosis induction, and mitotic arrest by a novel podophyllotoxin glucoside, 4DPG, in tumor cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26(8): 1000-8.
5. Sadeghi E, Behmanesh M, Sharifi M, Soltani BM, Ahmadian N. Induced apoptosis of bladder carcinoma cell line 5637 by podophyllotoxin treatment. *Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)* 2014; 27(3): 399-405.
6. Ling B, Zhang R, Wang Z, Liu Y, Liu C. Study on the interactions of smac mimetics with xiap-bir3 domain by docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry* 2010; 9(04): 797-812.
7. Cossu F, Mastrangelo E, Milani M, Sorrentino G, Lecis D, Delia D, et al. Designing Smac-mimetics as antagonists of XIAP, cIAP1, and cIAP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 378(2): 162-7.
8. Xu F, Gao X, Li H, Xu S, Li X, Hu X, et al. Hydrogen sulfide releasing enmein-type diterpenoid derivatives as apoptosis inducers through mitochondria-related pathways. *Bioorganic Chemistry* 2019; 82: 192-203.
9. Wang Y, Wu C, Zhang Q, Shan Y, Gu W, Wang S. Design, synthesis and biological evaluation of novel β -pinene-based thiazole derivatives as potential anticancer agents via mitochondrial-mediated apoptosis pathway. *Bioorganic chemistry* 2019; 84: 468-77.
10. Ding Y, Nguyen TA. PQ1, a quinoline derivative, induces apoptosis in T47D breast cancer cells through activation of caspase-8 and caspase-9. *Apoptosis* 2013; 18(9): 1071-82.
11. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell* 2002; 9(3): 459-70.
12. Ghasemian M, Mahdavi M, Zare P, Feizi MAH. Spiroquinazolinone-induced cytotoxicity and apoptosis in K562 human leukemia cells: alteration in expression levels of Bcl-2 and Bax. *The Journal of Toxicological Sciences* 2015; 40(1): 115-26.
13. Cossu F, Milani M, Vachette P, Malvezzi F, Grassi S, Lecis D, et al. Structural insight into inhibitor of apoptosis proteins recognition by a potent divalent smac-mimetic. *PLoS One* 2012; 7(11): e49527.
14. Tamanini E, Buck IM, Chessari G, Chiarparin E, Day JE, Frederickson M, et al. Discovery of a Potent non-peptidomimetic, small-molecule antagonist of cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (ciap1) and x-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 60(11): 4611-25.
15. Welsh K, Milutinovic S, Ardecky RJ, Gonzalez-Lopez M, Ganji SR, Teriete P, et al. Characterization of potent SMAC mimetics that sensitize cancer cells to TNF family-induced apoptosis. *PloS one* 2016; 11(9): e0161952.
16. Dynek JN, Vucic D. Antagonists of IAP proteins as cancer therapeutics. *Cancer letters* 2013; 332(2): 206-14.
17. Sun H, Lu J, Liu L, Yang C-Y, Wang S. Potent and selective small-molecule inhibitors of cIAP1/2 proteins reveal that the binding of Smac mimetics to XIAP BIR3 is not required for their effective induction of cell death in tumor cells. *ACS Chemical Biology* 2014; 9(4): 994-1002.
18. Kulathila R, Vash B, Sage D, Cornell-Kennon S, Wright K, Koehn J, et al. The structure of the BIR3 domain of cIAP1 in complex with the N-terminal peptides of SMAC and caspase-9. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 2009; 65(1): 58-66.
19. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research* 1998; 58(23): 5315-20.
20. Mahdavi M, Lavi MM, Yekta R, Moosavi MA, Nobarani M, Balalaei S, et al. Evaluation of the cytotoxic, apoptosis inducing activity and molecular docking of spiroquinazolinone benzamide derivatives in MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 2016; 260: 232-42.
21. Engels K, Knauer S, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early

- prognostic marker. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2007; 211(5): 532-40.
22. Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, et al. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 2004; 10(11): 3737-44.
23. Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15(2): 2494-516.
24. Chessari G, Buck IM, Day JE, Day PJ, Iqbal A, Johnson CN, et al. Fragment-based drug discovery targeting inhibitor of apoptosis proteins: discovery of a non-alanine lead series with dual activity against cIAP1 and XIAP. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58(16): 6574-88.
25. Beale P, Rogers P, Boxall F, Sharp S, Kelland L. BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer* 2000; 82(2): 436-40.
26. Barvaux VA, Lorigan P, Ranson M, Gillum AM, McElhinney RS, McMurry TBH, et al. Sensitization of a human ovarian cancer cell line to temozolomide by simultaneous attenuation of the Bcl-2 antiapoptotic protein and DNA repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004; 3(10): 1215-20.
27. Gupta M, Sharma R, Singh M, Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Computational Biology and Chemistry* 2018; 76: 210-17.
28. Mansourian M, Fassihi A, Saghaie L, Madadkar-Sobhani A, Mahnam K, Abbasi M. QSAR and docking analysis of A 2B adenosine receptor antagonists based on non-xanthine scaffold. *Medicinal Chemistry Research* 2015; 24(1): 394-407.
29. Kamath PR, Sunil D, Joseph MM, Salam AAA, Sreelekha T. Indole-coumarin-thiadiazole hybrids: an appraisal of their MCF-7 cell growth inhibition, apoptotic, antimetastatic and computational Bcl-2 binding potential. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 136: 442-51.
30. Taheri S, Nazifi M, Mansourian M, Hosseinzadeh L, Shokoohinia Y. Ugi efficient synthesis, biological evaluation and molecular docking of coumarin-quinoline hybrids as apoptotic agents through mitochondria-related pathways. *Bioorganic Chemistry* 2019; 91: 103147.
31. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 2009; 30(16): 2785-91.
32. Kamath PR, Sunil D, Ajees AA, Pai K, Das S. Some new indole-coumarin hybrids; Synthesis, anticancer and Bcl-2 docking studies. *Bioorganic Chemistry* 2015; 63: 101-9.
33. Nordin N, Fadaeinasab M, Mohan S, Hashim NM, Othman R, Karimian H, et al. Pulchrin A, a new natural coumarin derivative of *Enicosanthellum pulchrum*, induces apoptosis in ovarian cancer cells via intrinsic pathway. *PloS one* 2016; 11(5): e0154023.
34. Javid A, Ahmadian S, Saboury A, Rezaei-Zarchi S. Anticancer effect of doxorubicin loaded heparin based super-paramagnetic iron oxide nanoparticles against the human ovarian cancer cells. *World Acad Sci Eng Tech* 2011; 74: 143-9.
35. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular Cell* 2003; 11(2): 519-27.
36. Nasab RR, Mansourian M, Hassanzadeh F, Shahlaei M. Exploring the interaction between epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and some of the synthesized inhibitors using combination of in-silico and in-vitro cytotoxicity methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2018; 13(6): 509.
37. Ku B, Liang C, Jung JU, Oh BH. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Research* 2011; 21(4): 627-41.
38. Chantalat L, Skoufias DA, Kleman J-P, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual α -helical extensions. *Molecular Cell* 2000; 6(1): 183-9.
39. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(48): 46265-72.
40. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 1998; 19(14): 1639-62.
41. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 1996; 14(1): 33-8.

42. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection* 1995; 8(2): 127-34.
43. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition* 1996; 9(1): 1-5.
44. Nadendla RR. Molecular modeling: A powerful tool for drug design and molecular docking. *Resonance* 2004; 9(5): 51-60.
45. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu J-W, Du C, Wang X, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 408(6815): 1008-12.
46. Ling B, Dong L, Zhang R, Wang Z, Liu Y, Liu C. Theoretical studies on the interactions of XIAP-BIR3 domain with bicyclic and tricyclic core monovalent Smac mimetics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2010; 29(3): 354-62.
47. Sabour R, Harras MF, Mehany AB. Design, synthesis, cytotoxicity screening and molecular docking of new 3-cyanopyridines as survivin inhibitors and apoptosis inducers. *Bioorganic Chemistry* 2020; 94: 103358.
48. Dey SP, Sepay N, Mallik AK, Patra A. Novel chalcones as Bcl-2 inhibitor in lung cancer: docking, design and synthesis of 2, 3-Tetrasubstituted-2, 3-dihydrobenzofuran-3-carboxamides. *Journal of Chemical Sciences* 2020; 132(1): 1-9.
49. Al-Suwaidan IA, Abdel-Aziz AAM, Shawer TZ, Ayyad RR, Alanazi AM, El-Morsy AM, et al. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of some novel 3-benzyl-4 (3H) quinazolinone analogues. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2016; 31(1): 78-89.
50. Abdolmaleki A, Ghasemi JB. Dual-acting of Hybrid Compounds-A New Dawn in the Discovery of Multi-target Drugs: Lead Generation Approaches. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2017; 17(9): 1096-114.
51. Sabour R, Harras MF, Mohamed AI, Kamaly O, Altwaijry N. discovery of novel 3-cyanopyridines as survivin modulators and apoptosis inducers. *Molecules* 2020; 25(21): 4892.
52. Tian S, Ji C, Zhang JZ. Molecular basis of SMAC-XIAP binding and the effect of electrostatic polarization. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2021; 39(2): 743-52.
53. Sattarinezhad E, Bordbar AK, Fani N. Piperine derivatives as potential inhibitors of survivin: An in silico molecular docking. *Computers in Biology and Medicine* 2015; 63: 219-27.
54. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22(53): 8581.
55. Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG, Li F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(15): 15196-203.
56. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Advances in Hematology* 2012; 2012: 15.
57. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology* 2011; 3(4): 279-96.
58. Pettersson F, Dagleish A, Bissonnette R, Colston K. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR- γ and altered expression of Bcl-2/Bax. *British Journal of Cancer* 2002; 87(5): 555-61.
59. Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2004; 1644(2-3): 229-49.
60. Alkahtani HM, Abdalla AN, Obaidullah AJ, Alanazi MM, Almehezia AA, Alanazi MG, et al. Synthesis, cytotoxic evaluation, and molecular docking studies of novel quinazoline derivatives with benzenesulfonamide and anilide tails: Dual inhibitors of EGFR/HER2. *Bioorganic Chemistry* 2020; 95: 103461.

The Effect of Podophyllotoxin as an Inducer of Apoptosis Using Molecular Docking Method

Talebianpoor MS, Bardania H, Mansourian M*

Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 11 Feb 2021

Accepted: 10 May 2021

Abstract

Background and aim: Podophyllotoxin is used as one of the main treatments for genital warts. It is a precursor of etoposide and teniposide, which is used in the treatment of various cancers. Despite a large number of cancer studies, the exact mechanism of podophyllotoxin remains unknown. Suppression of enzymatic activity of adult caspases occurs in cancer cells in the presence of specific members of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family such as X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), cellular inhibitor of apoptosis proteins (cIAP1), and Survivin. By specifically binding a second mitochondria-derived activator of caspases-mimetics (Smac-mimetics) to negative apoptosis regulators, inhibition of IAPs-mediated caspases is eliminated and apoptosis is induced. The aim of the present study was used to determine the mechanism of action of podophyllotoxin as an inducer of apoptosis using molecular docking method.

Methods: The present bioinformatics study was conducted in 2020. Molecular docking method was used to calculate the molecular interaction of podophyllotoxin with proteins associated with initiator and effector caspases including baculovirus IAP repeat (BIR3) of XIAP / cAIP1 and Survivin, as well as B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and epidermal growth factor receptor (EGFR). The theoretical binding site of podophyllotoxin on these anti-apoptotic proteins was determined as an inhibitor to obtain information on the initial interaction, free binding energy and inhibition constant by molecular docking method. The collected data were analyzed using different software and compared with the results of related articles.

Results: The proapoptotic activity of podophyllotoxin as an apoptotic-inducing agent is associated with the signaling pathways of caspases 3, 7, 8, and 9. The key activation mechanisms of these caspases may be due to podophyllotoxin binding and induction of conformational changes at active sites of the XIAP / cAIP1-BIR3 and Survivin located near or at the same Smac-mimetics binding site. Three strong hydrogen bonds with the amino acids Tyr108, Ser117 and Glu118 play important roles in the stabilization of the Bcl-2-podophyllotoxin complex. Podophyllotoxin, similar to EGFR inhibitors, forms several hydrophobic interactions and two strong hydrogen bonds with Thr830 and Met769 with a bond-free energy of -7.85 kcal / mol and an inhibition constant of $K_i = 1.76 \mu\text{M}$.

Conclusion: Induction of apoptosis in cancer cells by podophyllotoxin can be attributed to several different mechanisms. Predicted binding conformations showed that podophyllotoxin had valuable inhibitory potential. Therefore, podophyllotoxin may be considered as an effective anticancer agent for further research into drug development.

Keywords: Podophyllotoxin, Cancer, Apoptosis, Molecular docking

*Corresponding author: Mansourian M, Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Email: mahboubehmansourian90@gmail.com

Please cite this article as follows:

Talebianpoor MS, Bardania H, Mansourian M. The Effect of Podophyllotoxin as an Inducer of Apoptosis Using Molecular Docking Method. Armaghane-danesh 2021; 26(3): 351-370.