INFORMATICS IN BIOLOGY, HEALTH, AND FOOD

Interdisciplinary Explorations in Life Science

Volume 1 Number 1, Dec. 2024

DOI: 10.22034/ibhf.2024.482065.1008

Original Article

Modeling and Investigation of Rhamnogalacturonides Enzyme Interaction with Suitable Substrate: *Bacteroides xylanosolvens*, Gut Microbiota

Foozieh Moghadami [1], Reyhane Kamelnia [2, 3*], Elahe Kamelnia [4]

[1] Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2] Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Department of Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
[4] Department of biology, Faculty of sciences, Mashhad branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 2024/10/06 **Accepted:** 2024/11/03 **Online Published:** 2024/11/23

Abstract

Bacteroides xylanosolvens belongs to gut microbiota, digests the plant cell walls and causes the absorption of plant fibers by the human intestine. The bacterium performs this process by Rhamnogalacturonides enzyme which hydrolyses glycosidic linkages belongs to glycosile hydrolase enzymes. These enzymes digest the complex hydrocarbons such as cellulose, hemicelluloses and pectin. The studied protein in this research is Rhamnogalacturonides degradation RhiN from *xylanosolvens*. In this study to assessment of bacterial Rhamnogalacturonides, the structure of enzyme was modeled by modeller software version 9.17. After the selection of the best model, the energy minimization and qualitative assurance were done by computational methods. To evaluate the performance of the enzyme, the interaction with the suitable substrate (pectin) was analyzed by docking software. As results, important amino acids involved in enzyme connection to the pectin junctions were identified. The results showed that the proposed model to assess the interaction between enzyme-substrate was desirable

Keywords: Gut microbiota, Rhamnogalacturonidase, Pectin, Glycoside hydrolase, Molecular dynamics simulation.

Cite this article: Moghadami F, Kamelnia R, Kamelnia E. Modeling and investigation of rhamnogalacturonides enzyme interaction with suitable substrate: *Bacteroides xylanosolvens*, gut microbiota. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2024;1(1):9-18.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education.

Corresponding author: Reyhane Kamelnia **Email**: r_kamelniya@ut.ac.ir

انفورماتیک در زیست‌شناسی، بهداشت و غذا
کاوش‌های بین رشته‌ای در علوم زیستی

دوره: ۱، شماره ۱، آذر ۱۴۰۳ DOI: 10.22034/ibhf.2024.482065.1008

مقاله پژوهشی

مدل سازی و بررسی بر همکنش آنزیم رامنوگالاکتورونیداز با سوبسترای مناسب: باکتری *باکتروئیدس زیلانوسالونس*، میکروبیوتای معده

فوزیه مقدمی[۱]، ریحانه کامل نیا[۲،۳]*، الهه کامل نیا[۴]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۲] مؤسسه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳] گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
[۴] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۵ **پذیرش:** ۱۴۰۳ /۸/۱۳ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۳/۹/۳

چکیده

باکتری *باکتروئیدس زیلانوسالونس* که از میکروبیوتای روده محسوب می‌شود، سبب تجزیه دیواره سلولی سلول‌های گیاهی می‌شود و بدین ترتیب در هضم و جذب فیبرهای گیاهی توسط روده انسان بسیار مؤثر است. باکتری این عمل را با کمک آنزیم رامنوگالاکتورونیداز انجام می‌دهد که سبب هیدرولیز پیوندهای گلایکوزیدیک می‌شود. این آنزیم جز آنزیم‌های گلایکوزیل هیدرولاز می‌باشد که عمل تجزیه قندهای پیچیده مانند سلولز، همی سلولز و پکتین را برعهده دارد. این پروتئین دارای نقش آنزیمی به نام رامنوگالاکتورونیداز از باکتری *باکتروئیدس زیلانوسولوس* استخراج شده که گزارش‌های کمی در زمینه‌ی تعیین ساختار این آنزیم وجود دارد. در این پژوهش، مدل‌سازی آنزیم رامنوگالاکتورونیداز با استفاده از نرم افزار مدلر۹/۱۷ انجام شد که پس از انتخاب بهترین مدل، کمینه سازی انرژی و ارزیابی کیفی مدل با روش‌های محاسباتی موجود انجام شد و در ادامه، جهت بررسی عملکرد آنزیم، میان‌کنش آن با سوبسترای مناسب (پکتین) با نرم‌افزارهای داکینگ مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی سبب شناسایی اسیدآمینه‌های مهم در اتصال آنزیم به پکتین شد و نتایج نشان داد که مدل ارائه شده جهت بررسی میان‌کنش آنزیم - سوبسترا، مدل مطلوبی می‌باشد.

کلمات کلیدی: میکروبیوتای روده، رامنوگالاکتورونیداز، پکتین، گلیکوزید هیدرولاز، شبیه سازی پویایی مولکولی.

Cite this article: Moghadami F, Kamelnia R, Kamelnia E. Modeling and investigation of rhamnogalacturonides enzyme interaction with suitable substrate: *Bacteroides xylanosolvens*, gut microbiota. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2024;1(1):9-18.
Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education
Corresponding author: Reyhane Kamelnia **Email:** r_kamelniya@ut.ac.ir

مقدمه

میکروبیوتای روده به مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها، از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پروتوزوآها اشاره دارد که در دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات زندگی می‌کنند. این میکروبیوتا نقش‌های مهمی در سلامتی و عملکرد بدن ایفا می‌کنند. از نقش‌های مهم میکروبیوتای روده می‌توان به هضم غذا، تولید ویتامین‌ها، تقویت سیستم ایمنی، تنظیم متابولیسم و تأثیر بر سلامت روان را نام برد (۱). میکروبیوتا به تجزیه مواد غذایی، به ویژه فیبرها، کمک می‌کند و مواد مغذی را آزاد می‌کند که بدن نمی‌تواند به تنهایی آنها را هضم کند. همچنین در تجزیه فیبرهای غذایی و تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه[1] مانند استات، پروپیونات و بوتیرات نقش دارند. که این اسیدهای چرب می‌توانند تأثیرات متعددی بر متابولیسم چربی و قند داشته باشند. برخی دیگر می‌توانند ویتامین‌هایی مانند ویتامین K و برخی ویتامین‌های گروه B را تولید کنند که تقویت سیستم ایمنی بدن و تاثیر بر سلامت و روان را ایفا می کنند (۲).

باکتری *باکترئیدس زیلانوسالونس*[2] یکی از گونه‌های باکتری از جنس باکتروئیدس است که به عنوان بخشی از میکروبیوتای روده انسان و برخی از حیوانات شناخته می‌شود. این باکتری به ویژه در تجزیه و هضم فیبرهای گیاهی از جمله زایلان و کربوهیدرات‌های پیچیده نقش دارد. همچنین این باکتری می‌تواند اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مانند استات، پروپیونات و بوتیرات تولید کند. این اسیدها برای سلامت روده و متابولیسم بدن بسیار مهم هستند و می‌توانند به کاهش التهاب و بهبود سلامت عمومی کمک کنند (۳).

تحقیقات در مورد *باکتروئیدس زیلانوسالونس* و سایر باکتری‌های میکروبیوتای روده به درک بهتر از نقش میکروبیوتا در سلامت و بیماری‌ها کمک می‌کند. تغییرات در ترکیب میکروبیوتا، از جمله کاهش یا افزایش این باکتری، می‌تواند با شرایط مختلفی مانند چاقی، دیابت و بیماری‌های التهابی روده مرتبط باشد. این باکتری و سایر میکروبیوتاهای روده‌ای به عنوان یک جزء کلیدی در تنظیم متابولیسم و سلامت بدن شناخته می‌شوند (۴).

یکی از آنزیم‌های مهمی که این باکتری تولید می‌کند، آنزیم رامنو گلاکتورونیداز[3] است که موجب تجزیه ترکیبات گیاهی از جمله پکتین، پلی‌ساکارید موجود در دیواره سلولی گیاهان، می‌شود. رامنو گلاکتورونیداز به طور خاص به پیوندهای گلیکوزیدی بین واحدهای رامنو و گلاکتورونیک اسید در پکتین حمله می‌کند و این کار باعث آزادسازی قندهای ساده و دیگر ترکیبات می‌شود. این آنزیم در صنایع غذایی، دارویی و بیوتکنولوژی کاربرد دارد و می‌تواند در بهبود کیفیت محصولات غذایی و همچنین در فرایندهای تولید بیوماس و بیوپلیمرها مورد استفاده قرار گیرد. درک ساختار رامنوگالاکتورونان برای فهمیدن نحوه عملکرد این آنزیم ضروری است (۵, ۶).

رامنو گلاکتورونان[4] به دو شکل عمده وجود دارد، در درجه اول رامنو گلاکتورونان یک و رامنو گلاکتورونان دو که هر کدام دارای ویژگی‌های ساختاری متمایز هستند. رامنوگلاکتورونان یک دارای یک ستون فقرات متشکل از واحدهای دی ساکارید تکراری است، به ویژه [α-D-GalA-(1,2)-α-L-Rha-(1-۴)] که شامل باقیمانده‌های اسید گالاکتورونیک[5] و رامنوز[6] است (۷). رامنوگلاکتورونان دو از نظر ساختاری پیچیده‌تر از نوع یک است و حداقل ۱۲ واحد قندی گلیکوزیل مختلف مانند D_ رامنوز، D_ آپیوز ، D_ گالاکتوز و D_ گالاکتورونیک اسید را شامل می‌شود. این باقیمانده‌ها با بیش از ۲۰ پیوند گلیکوزیدی مجزا به هم مرتبط هستند. یکی از ویژگی‌های قابل توجه رامنو گلاکتورونان توانایی آن در تشکیل دایمرهایی است که توسط دی استرهای بورات به هم متصل می‌شوند و برای حفظ یکپارچگی و خواص مکانیکی دیواره سلولی گیاه بسیار مهم هستند. این اتصال متقابل به تشکیل یک شبکه سه بعدی کمک می‌کند که برای رشد و نمو گیاهان حیاتی است (۸, ۹). ویژگی‌های ساختاری رامنوگالاکتورونان‌ها بر تعامل آن‌ها با سایر اجزای دیواره سلولی و حساسیت آن‌ها به تخریب آنزیمی تأثیر می‌گذارد. رامنوگالاکتورونیداز به طور خاص پیوندهای گلیکوزیدی درون این پلی ساکاریدها را می‌شکند و تجزیه آنها را در طی فرایندهایی مانند رسیدن میوه و تخریب میکروبی در اکوسیستم‌های خاک تسهیل می‌کند (۱۰). رامنوگالاکتورونیداز قادر است که ساختارهای متنوع رامنوگالاکتورونان‌ها را هدف قرار دهد پس درک و اهمیت

[1] Short Chain Fatty Acids
[2] *Bacteroides xylanisolvens*
[3] Rhamnogalacturonidase
[4] Rhamnogalacturonan
[5] Galacturonic acid
[6] Rhamnose

ساختار این پلی ساکاریدها می‌تواند به ما بینش‌های عمیق‌تری در مورد بیولوژی گیاهی بدهد. شناخت نحوه تأثیر این ساختارها بر ویژگی‌های مکانیکی و بیوشیمیایی دیواره سلولی می‌تواند به بهبود روش‌های کشاورزی و افزایش عملکرد محصولات و همچنین در علوم غذایی در زمینه بهبود بافت و کیفیت مواد غذایی به توسعه راهکارهای نوآورانه در این صنایع شود (۵).

روده انسان تنها جایی است که باکتری *باکتروئیدس زیلانوسالونس* از آن جدا شده است. شرایط رشد ایده آل برای آن، دمای ۳۸ درجه سانتیگراد است. این باکتری بی هوازی اجباری است و در حال حاضر هیچ گونه بیماری زا فرصت طلب شناخته شده ای از *باکتروئیدس زیلانوسالونس* وجود ندارد. از این رو ممکن است دارای کیفیت پروبیوتیک باشد (۱۱). این باکتری‌ها قادرند که ترکیبات سنگینی مانند سلولز، همی سلولز و پکتین را به ملکول‌های کوچکی مانند استات، پروپیونات و بوتیرات تبدیل کنند و با این کار منبع انرژی مهمی را برای میزبان فراهم آورند (۱۲). پلی ساکاریدهای دیواره سلول‌های گیاهی[1] مانند سلولز، همی سلولز و پکتین که در میوه‌ها، غلات و سبزیجات به وفور یافت می‌شوند بخش مهمی از رژیم فیبری غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. این پلی ساکاریدها توسط روده کوچک انسان تجزیه نشده و به کولون رسیده و توسط باکتری‌های همزیست شکسته و تخمیر می‌شوند (۱۳). یکی از این ترکیبات پکتین است که حاوی بیش از ۱۷ منوساکارید و ۲۰ نوع پیوند مختلف است. برآورد شده است که روزانه در حدود ۴-۵ گرم پکتین توسط انسان مصرف می‌شود که ۹۰ درصد آن به کولون میرسد و عمدتا توسط باکتری‌هایی مانند *باکتروئیدس* تجزیه و شکسته می‌شوند (۱۴). ساختار ثانویه آنزیم رامنو گالاکتورونیداز شامل دومین‌های کوچک که معمولاً از چندین تعدیل‌کننده تشکیل شده است که به یکپارچگی ساختاری و عملکرد کلی آن کمک می‌کند. هر دومین ممکن است نقش‌های متمایزی در شناسایی و کاتالیز بستر داشته باشد. همچنین با ترکیبی از مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا مشخص می‌شود که برای حفظ پایداری آنزیم و تسهیل برهمکنش با بستر آن ضروری هستند. آرایش این عناصر می‌تواند بر کارایی و ویژگی کاتالیزوری آنزیم تأثیر بگذارد (۱۰). تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین آمیدهای ستون فقرات و کربونیل‌ها باعث تثبیت مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا در آنزیم می‌شود. این برهمکنش نقش حیاتی در حفظ ترکیب ساختاری لازم برای فعالیت آنزیمی ایفا می‌کند. این آنزیم همولوژی ساختاری با سایر آنزیم‌های فعال کربوهیدرات دارد، که حاکی از حفظ تکاملی الگوهای چین‌خوردگی خاصی است که برای عملکرد آنزیمی آنها حیاتی است. ترتیب خاص عناصر ساختار ثانویه در رامنو گالاکتورونیداز نه تنها برای ثبات آن بسیار مهم است بلکه برای توانایی آن در تشخیص و شکاف پیوندهای گلیکوزیدی در رامنو گالاکتورونان است. درک این جزئیات ساختاری می تواند دانش ما را در مورد مکانیسم‌های آنزیم تقویت کرده و کاربردهای بیوتکنولوژیکی مربوط به تخریب پکتین را آگاه سازد. ساختار ثانویه آنزیم، توسط دومین‌های کوچک، مارپیچ‌های آلفا، صفحات بتا و بر همکنش‌های پیوند هیدروژن مشخص می شود، که برای عملکرد آنزیم در تخریب پلی ساکارید دیواره سلولی گیاه اساسی است (۱۵).

پروتئین بررسی شده در این مطالعه رامنو گالاکتورونیداز[2] از باکتری باکتروئیدس زیلانوسالونس می‌باشد که اطلاعات کمی به روش تجربی از آن در اختیار است. در این پژوهش، مدلسازی آنزیم رامنوگالاکتورونیداز با استفاده از نرم‌افزار مدلر ۹/۱۷ انجام شد که پس از انتخاب بهترین مدل، کمینه سازی انرژی و ارزیابی کیفی مدل با روش‌های محاسباتی موجود انجام شد و در ادامه، جهت بررسی عملکرد آنزیم، میان‌کنش آن با سوبسترای مناسب (پکتین) با نرم افزارهای داکینگ مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

ابتدا فایل pdb از سایت protein data bank استخراج شد. سپس به منظور اطلاعات بیشتر در مورد ساختار سه بعدی پروتئین، Rhamnogalacturonides degradation protein RhiN از databaseهای مختلفی از جمله rcsb. rg و uniprot استفاده شد. جهت مدلسازی پروتئین مورد نظر از نرم‌افزار مدلر۹/۱۷ استفاده شد. بعد از آپلود بهترین مدل کمینه سازی انرژی با نرم‌افزار spdviewer انجام شد. جهت ارزیابی کیفی مدل PDB، از سرور rampage استفاده شد. در ادامه، جهت بررسی عملکرد آنزیم، میان‌کنش آن با سوبسترای مناسب یعنی پکتین با نرم‌افزار swissdock داکینگ مورد بررسی قرار گرفت.

[1].Plant cell wall polysaccharides

[2] Rhamnogalacturonides degradation RhiN

ساختار پکتین از سایت pubchem با PubChem CID: 6857565 و فرمول شیمیایی C12H18O13 و وزن مولکولی ۳۷۰/۲۶ g/mol استخراج شد.

نتایج:

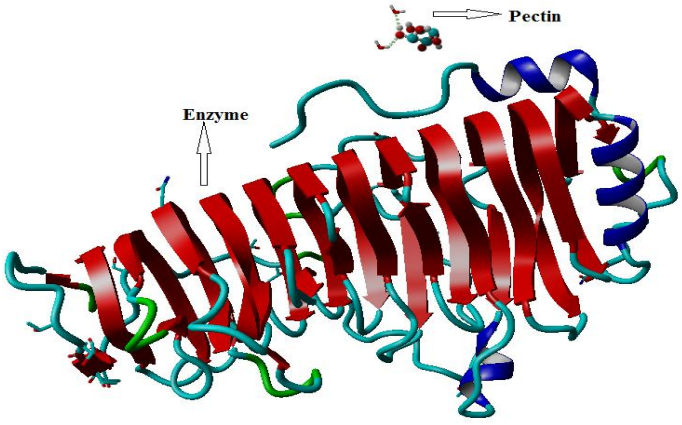
مشخصات پروتئین

جهت بررسی مشخصات توالی این پروتئین شامل تعداد اسیدآمینه، وزن مولکولی و کد پروتئین از پایگاه داده‌ی uniprot فایل FASTA استخراج شد. این مشخصات به قرار زیر است:

>tr|D4VI84|D4VI84_9BACE Rhamnogalacturonides degradation protein RhiN OS=Bacteroides xylanisolvens SD CC 1b GN=BN890_30430 PE=4 SV=1
MKKLSATLLSALFLGGAICAGCADKKDTSSEEV
INIIHKVNNYWQANHPEHGRSFWDAAYHTGNM
EAYFLTKKPEYLDYSKAWAEHNEWKGAKSDN
KADWKYSYGESDDYVLF
GDYQICFQTYADLYNLEPDTQKIARAREVMEY
QMSTPNRDYWWWADGLYMVMPVM
TKMYNITKNPLYLEKLHEYLAYADSIMYDEEA
GLYYRDGKYVYPKHKSVNGKKDFW
ARGDGWVLAGLAKVLKDLPETDQYRQEYIDRF
RTLAKSVAACQQPEGYWTRSMLDP
QHAPGPETSGTAFFTYGLQWGINNGFLNAAEYQ
PVVEKAWKYLSTVALQPDGKIGYV
QPIGEKAIPGQVVDANSTSNFGVGAFLLAACER
VRHLNQ
Length:377 Mass (Da): 43,222 Uniprot: D4VI84

ساختار سه بعدی پروتئین

این آنزیم به شکل یک مارپیچ B موازی راست‌گرد بزرگ با هسته‌ای متشکل از ۱۳ چرخش رشته B تا می‌شود. چهار صفحه B موازی PB1، PB1a، PB2 و PB3 که توسط چرخش‌های متوالی تشکیل شده‌اند، معمولاً توسط یک باقیمانده به شکل یک مارپیچ چپ‌گرد از هم جدا می‌شوند. تصویر ساختار سه بعدی آنزیم و پکتین در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: تصویر شماتیکی ساختار سه بعدی آنزیم گالاکتورونیداز و پکتین(moe softwere)

Figure 1: Schematic illustration of the three-dimensional structure of galacturonidase and pectin (moe softwere).

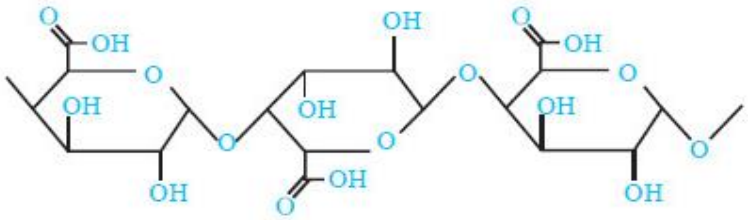
ساختار پکتین

پکتین‌ها مجموعه‌ای از پلی‌ساکاریدها هستند که از زیرواحدهای گالاکتورونیک‌اسید ($C_6H_{10}O_7$$C_6H_{10}O_7$) تشکیل می‌شود (شکل ۲). این قند اسیدی از اکسیداسیون-D گالاکتوز ایجاد می‌شود و در ساختار باز، یک گروه آلدهیدی به کربن شماره ۱ (C_1C_1) و گروه کربوکسیلی در کربن شماره ۶ (C_6C_6) متصل شده است. پکتین‌های مختلف از اضافه شدن گروه‌های متیل و استر به این کربوهیدرات اسیدی تشکیل می‌شود. بعضی از انواع این پلیمر از زیرواحدهای یکسان (هوموپلی‌ساکارید) و بعضی از آن‌ها از چند زیرواحد مختلف (هتروپلی‌ساکارید) تشکیل می‌شوند.

هوموگالاکتورونان‌ها پکتین‌های خطی هستند که با اتصال آلفا-۱-۴-گلیکوزیدی بین زیر واحدهای دی گالاکتورونیک اسید به وجود می‌آیند که در C6C6 متیله و در O2O2 یا O3O3 استیله می‌شود. اضافه شدن زیر واحدهای زایلوز و آپیوز به زنجیره‌های جانبی انواع مختلف این نوع پکتین (زایلوگالاکتوران و آپیوگالاکتوران) را می‌سازد (۱۶).

زنجیره اصلی پکتین‌های رامنوگالاکتورونان۱، از دی‌ساکاریدهای ۴-آلفا-D-گالاکتورونیک‌اسید- (۱،۲)-آلفا-L-رامنوز تشکیل و زنجیره‌های جانبی قندهای خنثی (حداقل ۱۲ نوع کربوهیدرات) به زیر واحدهای رامنوز (D_گالاکتوز، L _ آرابینوز و D_ زایلوز) متصل می‌شوند.

رامنوگالاکتورونان ۲، یکی دیگر از پکتین‌های ساختاری و پلی‌ساکاریدی بسیار منشعب است که فراوانی کمتری نسبت به دو نوع قبلی دارد. زنجیره اصلی این پلی‌ساکارید مثل گالاکتورونان‌ها از کنار هم قرار گرفتن زیر واحدهای دی گالاکتورونیک اسید تشکیل شده است (۹).



شکل ۲: تصویر ساختار دو بعدی پکتین که از واحدهای گالاکتورونیک اسید تشکیل شده است (Rcsb.ir).

Figure 2: Image of the two-dimensional structure of pectin, which consists of galacturonic acid units (Rcsb.ir).

مدلسازی و بررسی کیفی مدل فضای

جهت مدلسازی پروتئین مورد نظر از نرم‌افزار MODDELLER 9.17 استفاده شد. سپس با نرم‌افزار spdviewer بهترین مدل انتخاب و مدل مورد نظر از لحاظ کیفی مورد ارزیابی قرار داده شد.

یکی از روش‌های پیشگویی ساختار دو بعدی پروتئین و درک و عملکرد آن استفاده از نمودار راماچاندران[1] می‌باشد. این نمودار، یک ابزار گرافیکی است که برای نمایش توزیع زوایای چرخش (phi و psi) در ساختارهای پروتئینی استفاده می‌شود. که به ما کمک می‌کند تا بفهمیم که کدام زوایای چرخش در ساختارهای پروتئینی پایدار و قابل قبول هستند. زاویه phi (φ): زاویه چرخش بین گروه NH و گروه Cα (کربن آلفا) در یک اسیدآمینه. زاویه psi (ψ): زاویه چرخش بین گروه Cα و گروه CO (کربن کربونیل) در یک اسیدآمینه.

نمودار راماچاندران به چهار ناحیه اصلی تقسیم می‌شود که هر کدام به نوع خاصی از ساختارهای پروتئینی مربوط می‌شوند: ناحیه آلفا _ هلیکس: در این ناحیه، زوایای phi و psi به گونه‌ای هستند که منجر به تشکیل هلیکس آلفا می‌شوند. این ناحیه معمولاً در حدود $\varphi = -60^\circ$ و $\psi = -50^\circ$ قرار دارد. ناحیه صفحات بتا: این ناحیه مربوط به ساختارهای بتا است. زوایای phi و psi در این ناحیه معمولاً در حدود $\varphi = -120^\circ$ و $\psi = +120^\circ$ قرار دارند. ناحیه ناپایدار: این ناحیه شامل زوایای چرخش است که معمولاً ناپایدار هستند و به ساختارهای پروتئینی منجر نمی‌شوند. ناحیه‌های دیگر: نواحی دیگری نیز وجود دارند که به ساختارهای خاصی مانند حلقه‌ها و پیچ‌ها مربوط می‌شوند. برای ارزیابی کیفی مدل PDB، بهترین مدل را در RAMPAGE آپلود کرده و نتایج در شکل ۳ مشاهده شد.

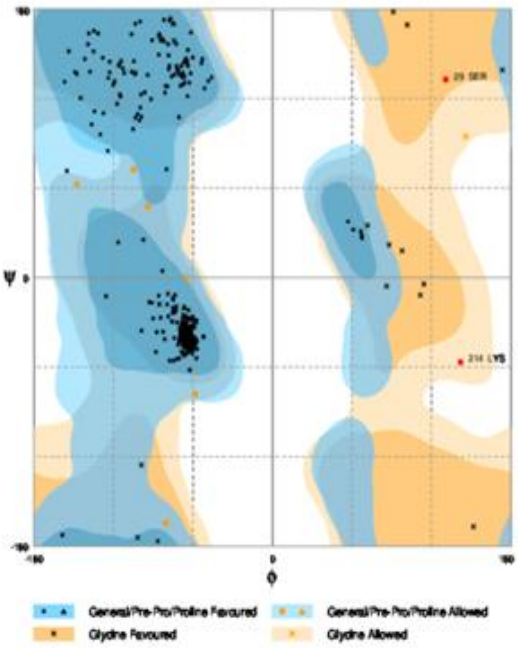
کمینه سازی انرژی[2]

بعد از آپلود بهترین مدل و بررسی کمینه سازی انرژی با استفاده از نرم‌افزار spdviewer، در نهایت کمینه سازی انرژی به صورت زیر مشاهده می‌شود.

KJ/mol 346.317 1642.215 1688.152 709.662 -11433.65 -10663.39 0.0000 // E= -17710.688

[1]. Ramachandran plot

[2] Energy minimization



شکل ۳: نمودار نواحی راماچاندران. نواحی آبی رنگ به معنی قرارگیری ایده آل اسیدهای آمینه می‌باشد. نواحی نارنجی نشانگر نواحی قابل قبول است و نواحی صورتی کم‌رنگ نواحی غیر قابل قبول را نشان می‌دهد.

Figure 3: Ramachandran District Chart. The blue areas mean the ideal placement of amino acids. Orange areas indicate acceptable areas and pale pink areas indicate unacceptable areas.

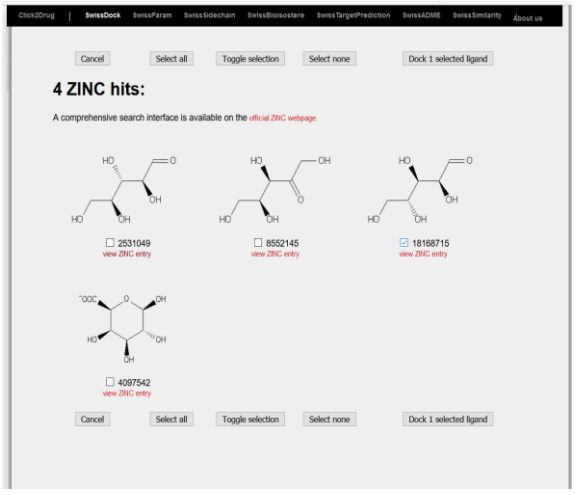
```
esidue [   47 :ASN] (-147.62,  62.62) in Allowed region
esidue [   52 :GLY] ( 146.10,  94.58) in Allowed region
esidue [   53 :ARG] ( -58.09, -78.08) in Allowed region
esidue [  111 :TYR] ( -64.34,   0.03) in Allowed region
esidue [  154 :ASP] ( -93.90,  47.73) in Allowed region
esidue [  156 :TRP] (-104.95,  72.27) in Allowed region
esidue [  305 :ASN] ( -80.34,-164.44) in Allowed region
esidue [   29 :SER] ( 130.94, 132.70) in Outlier region
esidue [  214 :LYS] ( 142.05, -56.64) in Outlier region
umber of residues in favoured region    (~98.0% expected)  :  366 ( 97.6%)
umber of residues in allowed region     ( ~2.0% expected)  :    7 (  1.9%)
umber of residues in outlier region                        :    2 (  0.5%)
```

شکل ۴: تعداد اسیدهای آمینه و مکان قرارگیری.

Figure 2: The number of amino acids and their location.

داکینگ آنزیم – سوبسترا

آنزیم رامنوگالاکتورونیداز دارای سوبستراهای مختلفی است نظیر سلولز، همی سلولز و پکتین. در این مرحله پکتین به عنوان سوبسترای مناسب انتخاب شد و به بررسی میان‌کنش آنزیم - سوبسترا پرداخته شد. داکینگ با استفاده از سرور SWISSDOCK انجام شد. از بین ۴ لیگاند پیشنهادی که در شکل ۵ قابل مشاهده است، مورد سوم انتخاب شد.



شکل۵: ساختار دو بعدی لیگاندهای پیشنهادی توسط وب سایت ZINC .

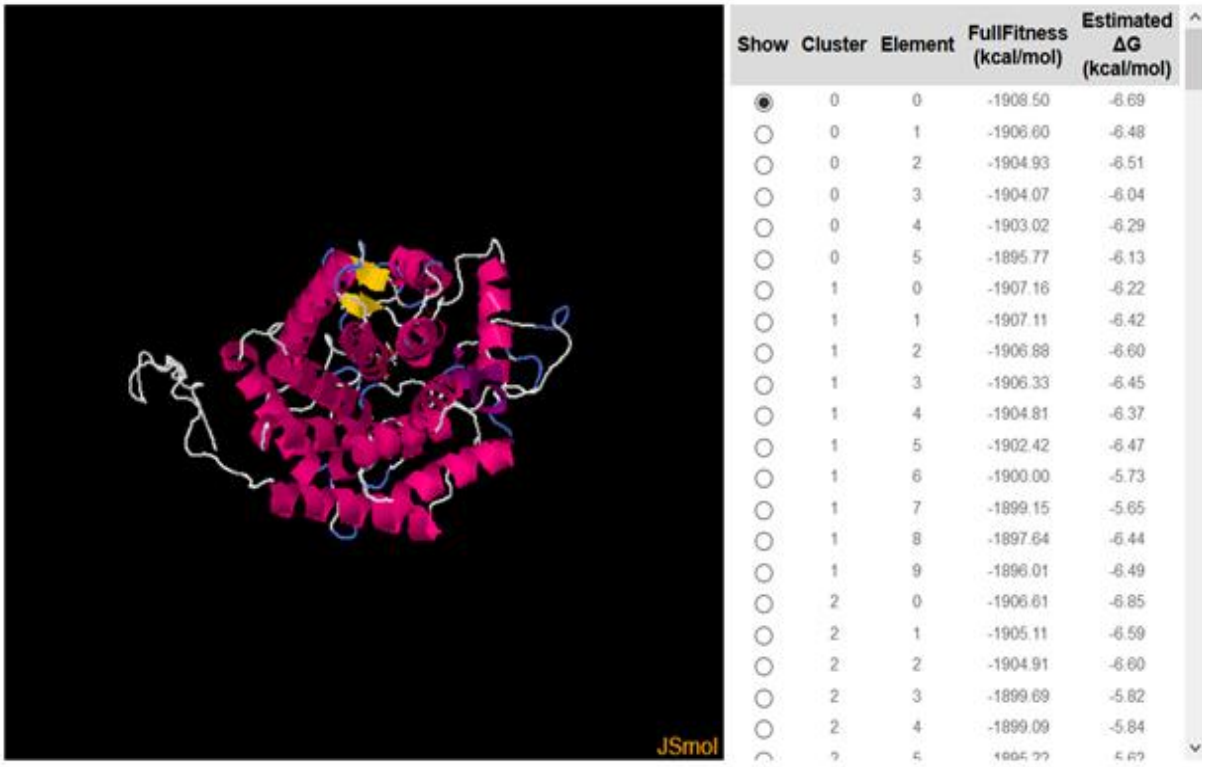
Figure 5: 2D structures of ligands proposed by ZINC website.

پس از انتخاب لیگاند مناسب داکینگ با استفاده از سرور SWISSDOCK انجام شد (شکل ۵). مدل ارائه شده زیر به دلیل اینکه دارای کمترین Δ G یا سطح انرژی می‌باشد کمپلکس پایدار و مطلوب به شمار می‌آید.

بحث

از چرخش‌های متوالی صفحات بتا، ۳۲درصد از همه باقی‌مانده زنجیره‌های جانبی خود را در سطح یا در داخل مارپیچ B موازی تراز وسط قرار دارد. باقیمانده‌های هم‌تراز در سطح توسط ترئونین، اسید آسپارتیک و آسپاراژین غالب می‌شوند، در حالی که والین، لوسین و ایزولوسین اغلب در داخل آن یافت می‌شوند. یک حفره آب‌گریز بسیار بزرگ در داخل مارپیچ B موازی یافت می‌شود. محل فعال بالقوه یک شیار است که تقریباً عمود بر محور مارپیچ قرار دارد و شامل یک خوشه از سه باقی‌مانده اسید آسپارتیک و یک باقی‌مانده اسید گلوتامیک است. آنزیم به شدت گلیکوزیله است. دو سایت گلیکوزیلاسیون متصل به N و هجده محل گلیکوزیلاسیون O-link در ساختار یافت می‌شود (۱۷). این آنزیم با اثرگذاری بر پکتین‌های موجود در دیواره‌ی گیاهی موجب تجزیه آن می‌شود.

ساختار آنزیم به گونه‌ای پیچش می‌خورد که جایگاه فعال در معرض پکتین قرار می‌گیرد. لذا برهم کنش بین سوبسترا - آنزیم با توجه به داکینگ انجام شده با کمترین مقدار انرژی در جایگاه مناسب قرار می‌گیرد.



Show	Cluster	Element	FullFitness (kcal/mol)	Estimated ΔG (kcal/mol)
◉	0	0	-1908.50	-6.69
○	0	1	-1906.60	-6.48
○	0	2	-1904.93	-6.51
○	0	3	-1904.07	-6.04
○	0	4	-1903.02	-6.29
○	0	5	-1895.77	-6.13
○	1	0	-1907.16	-6.22
○	1	1	-1907.11	-6.42
○	1	2	-1906.88	-6.60
○	1	3	-1906.33	-6.45
○	1	4	-1904.81	-6.37
○	1	5	-1902.42	-6.47
○	1	6	-1900.00	-5.73
○	1	7	-1899.15	-5.65
○	1	8	-1897.64	-6.44
○	1	9	-1896.01	-6.49
○	2	0	-1906.61	-6.85
○	2	1	-1905.11	-6.59
○	2	2	-1904.91	-6.60
○	2	3	-1899.69	-5.82
○	2	4	-1899.09	-5.84

شکل ۵: داکینگ آنزیم رامنوگالاکتورونیداز و سوبسترای پکتین. نواحی قرمز رنگ آنزیم و نواحی زرد رنگ پکتین می‌باشند.

Figure 5: Docking of rhamnogalacturonidase enzyme and pectin substrate. Red areas are enzymes and yellow areas are pectin.

بررسی‌ها نشان داد که ۹۷/۶ درصد اسیدآمینه‌ها در ناحیه مطلوب، ۱/۹درصد اسیدآمینه‌ها در ناحیه مجاز و ۰/۵درصد در ناحیه غیرمجاز قرار دارند و مدل ارائه شده ساختار خوبی دارد. اسیدهای آمینه‌ی (ASN, TYR, LYS, ASP, GLY و SER) مهم که در برهم کنش بین پروتئین و پکتین درگیرند در همین نواحی مجاز و مطلوب قرار گرفته‌اند.

با توجه به نتایج بدست آمده از داده‌های انرژی، حالت با کمترین انرژی به منظور برهم کنش بهتر آنزیم - سوبسترا انتخاب شد و بررسی گردید. چرا که انرژی کمتر نشان دهنده‌ی پایداری بیشتر ساختار است.

نتیجه‌گیری

آنزیم رامنوگالاکتورونیداز A اولین ساختار سه بعدی آنزیمی است که پیوندهای گلیکوزیدی را در ستون فقرات رامنوگالاکتورونان یک هیدرولیز می‌کند. شیار بزرگ که محل فعال بالقوه آنزیم است در ساختارهای پکتات لیازها نیز دیده می‌شود. دو باقیمانده اسید آسپارتیک کاتالیزوری، که پیشنهاد شده است نقش کاتالیزوری داشته باشند، در این ناحیه از آنزیم قرار دارند. گروه‌های گلیکان متصل به آنزیم برای پایداری کریستال مهم هستند، زیرا بخش کربوهیدرات در بیشتر پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی دخیل است. در واقع علم بیوانفورماتیک راهی نوین را برای یافتن دستاوردهای علمی جدید به روی ما گشوده و سبب صرفه جویی در زمان و هزینه‌ها شده است. می‌توان با پیش بینی ساختارهای سه بعدی و عملکرد پروتئین‌ها به طراحی پروتئین‌هایی با ویژگی‌های خاص پرداخت. در پروژه حاضر هم از سایت‌ها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی و پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین رامنوگالاکتورونیداز در باکتری *باکتروئیدس زیلانوسالونس* استفاده شد. بررسی‌ها سبب شناسایی اسیدآمینه‌های مهم در اتصال آنزیم به پکتین شد و نتایج نشان داد که مدل ارائه شده جهت بررسی میان‌کنش آنزیم - سوبسترا، مدل مطلوبی می‌باشد. با قیاس برهم کنش آنزیم با سوبستراها دیگر با توجه به مقدار انرژی کمینه‌ی هر ساختار بعد از تشکیل کمپلکس آنزیم - سوبسترا پی به ایجاد بر همکنش قوی‌تر سوبسترای پکتین نسبت به دیگر سوبستراها

شدیم. آنزیم با اسیدآمینه‌های ARG, LYS, ASP و GYS موجود در جایگاه سوبسترا به پکتین اتصال برقرار می‌کند که از لحاظ انرژی آزاد گیبس و پایداری تعامل آنزیم - سوبسترا مطلوب بوده است. اسیدهای آمینه‌ی گلوتامات و اسپارتیک اسید دارای گروه‌های کربوکسیلیک هستند که با گروه‌های هیدروکسیل یا کربوکسیلیک موجود در پکتین پیوندهای هیدروژنی و یونی برقرار می‌کنند. آرژنین و لیزین دارای یک گروه آمینی مثبت هستند که با گروه‌های منفی در پکتین در تعامل هستند. فنیل آلانین و والین در تعاملات آب‌گریز بین آنزیم - پکتین نقش دارند. همچنین انرژی منفی پیوند، گواه بر تعاملات پیوندی قوی در بر همکنش بین آنزیم - پکتین می‌باشد. در واقع داکینگ، شناسایی دقیق‌تر اسیدهای آمینه کلیدی در سایت فعال گالاکتورونیداز و نحوه تعامل آن‌ها با پکتین را روشن می‌سازد. این نتایج استفاده‌ی این آنزیم جهت تجزیه پکتین در گیاهان را پیشنهاد می‌کند و زمینه‌ی طراحی این آنزیم با ویژگی‌های جدید و مطلوب برای تعاملات بیوشیمیایی و کاربردهای صنعتی آن در کشاورزی و صنایع غذایی را امید بخش می‌سازد. بر همکنش آنزیم رامنوگالاکتورونیداز از میکروبیوتای معده با سوبسترا پکتین یک فرایند پیچیده و چندوجهی است که می‌تواند به عنوان یک هدف تحقیقاتی مهم در زمینه بهبود سلامت گوارش و توسعه راهکارهای تغذیه‌ای و پتانسیل کاربردی آن در طراحی مکمل‌های غذایی و دارویی جدید مورد توجه قرار گیرد.

References

1. Mak L-Y, Liu K, Chirapongsathorn S, Yew KC, Tamaki N, Rajaram RB, et al. Liver diseases and hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region: burden, trends, challenges and future directions. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2024:1-18. doi: 10.1038/s41575-024-00967-4.
2. Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2024:1-19. doi: 10.1038/s41580-024-00703-5.
3. Zhou Q, Meng Y, Li D, Yao L, Le J, Liu Y, et al. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2024;9(1):55.doi: 10.1038/s41392-024-01769-5.
4. Qu L, He X, Tang Q, Fan X, Liu J, Lin A. Iron metabolism, ferroptosis, and lncRNA in cancer: knowns and unknowns. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. 2022;23(10):844-62. doi: 10.1631/jzus.B2200194.
5. Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Basic biology and therapeutic implications of lncRNA. Advanced drug delivery reviews. 2015;87:15-24. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.012
6. Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2014;1839(11):1097-109. doi:10.1016/j.bbagrm.2014.08.012.
7. Wang X, Tan X, Zhang J, Wu J, Shi H. The emerging roles of MAPK-AMPK in ferroptosis regulatory network. Cell Communication and Signaling. 2023;21(1):200. doi: 10.1186/s12964-023-01170-9.
8. Zhu J, Guo J, Liu Z, Liu J, Yuan A, Chen H, et al. Salvianolic acid A attenuates non-alcoholic fatty liver disease by regulating the AMPK-IGFBP1 pathway. Chemico-Biological Interactions. 2024;400:111162. doi: 10.1016/j.cbi.2024.111162
9. Xia G, Wu S, Luo K, Cui X. By using machine learning and in vitro testing, SERPINH1 functions as a novel tumorigenic and immunogenic gene and predicts immunotherapy response in osteosarcoma. Frontiers in Oncology.2023;13:1180191. doi: 10.3389/fonc.2023.1180191
10. Li Y, Peng Q, Wang L. EphA2 as a phase separation protein associated with ferroptosis and immune cell infiltration in colorectal cancer. Aging (Albany NY). 2023;11;15(22):12952. doi: 10.18632/aging.205212
11. Yuan X, Wang Y, Jiao S, Gao H, Zhang M, Wang X, et al. Identification of SLC7A11-AS1/SLC7A11 pair as a ferroptosis-related therapeutic target for hepatocellular carcinoma. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2024;28(13):e18496. doi: 10.1111/jcmm.18496.
12. Xie Y, Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R. DUSP1 blocks autophagy-dependent ferroptosis in pancreatic cancer. Journal of pancreatology. 2020;3(3):154-60. doi:10.1097/JP9.0000000000000054
13. Liu B, Li X, Wang D, Yu Y, Lu D, Chen L, et al. CEMIP promotes extracellular matrix-detached prostate cancer cell survival by inhibiting ferroptosis. Cancer Science.2022;113(6):2056-70. doi: 10.1111/cas.15356.
14. Shi Y, Xu N, Liu B, Ma Y, Fu X, Shang Y, et al. Mifepristone protects acetaminophen induced liver injury through NRF2/GSH/GST mediated ferroptosis suppression. Free Radical Biology and Medicine. 2024. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.06.014.
15. Shrestha R, Nassar ZD, Hanson AR, Iggo R, Townley SL, Dehairs J, et al. ACSM1 and ACSM3 regulate prostate cancer fatty acid metabolism to promote tumour growth and constrain ferroptosis. Cancer Research. 2024 Jul 15;84(14):2313-3. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-1489.

16. Tifoun N, De las Heras JM, Guillaume A, Bouleau S, Mignotte B, Le Floch N. Insights into the roles of the sideroflexins/SLC56 family in iron homeostasis and iron-sulfur biogenesis. Biomedicines.2021;9(2):103. doi:10.3390/biomedicines9020103.