مجله دیابت و لیپید ایران. دو ماهنامه مرداد- شهریور ۱۳۹۱؛ دوره ۱۱ (شماره ۶) ۵۱۵-۵۰۵

بررسی آنزیم آلفا آمیلاز پانکراس موش صحرایی به عنوان مدل جهت بررسی تاثیر مهار کننده‌های این آنزیم

شیوا خلیل مقدم[۱]، آزاده ابراهیم حبیبی[۲]، پروین پاسالار[۳]، پریچهره یغمایی*[۱]، باقر لاریجانی[۲]

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های گلیکوزیداز در هضم نشاسته وگلیکوژن در نتیجه افزایش قند خون موثرند. مهارکننده‌های این آنزیم‌ها خصوصا مهارکننده‌های آلفا آمیلاز به علت نداشتن عوارض جانبی مهار کننده‌های آلفا گلوکوزید از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و به عنوان ابزاری با ارزش در درمان دیابت مطرح هستند. جستجوی ابتدایی برای یافتن چنین ترکیباتی با کمک مدل‌های in vitro و in vivo صورت می‌پذیرد. در مورد مهار کننده‌های آلفا آمیلاز، از آنجا که موش صحرایی به صورت متداول به عنوان مدل فارماکولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد، در این مطالعه، مدل ساختار آنزیم این حیوان مورد بررسی قرار گرفته است. از آنجا که ساختار کریستالی این آنزیم‌ها موجود نمی‌باشد مطالعه مدلسازی مولکولی به منظور مقایسه آنزیم‌های آمیلاز پانکراسی موش صحرایی و انسان انجام گردید.

روش‌ها: بررسی ترادف آمینواسیدی و مدل‌سازی ساختار آنزیم موش با استفاده از برنامه Blast، Clustal W و SWISS MODEL انجام شد. جهت یافتن جایگاه احتمالی برهم کنش مهارکننده‌های آنزیم، ترکیب شش زیر واحدی قندی که مهار کننده گزارش شده برای آنزیم انسانی است با استفاده از روش جایگیری (داکینگ) در مدل قرار داده شد و برای بررسی بیشتر برهم کنش ترکیب با آنزیم از شبیه سازی دینامیک مولکولی کوتاه مدت استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده تفاوت جزئی آنزیم موش صحرایی با آنزیم انسان است. در عین حال اسید آمینه‌های مهم در برهم کنش مهار کننده‌های قندی و آنزیم تا حدودی شناسایی شده‌اند.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم اینکه می‌توان از آنزیم آلفا آمیلاز پانکراس موش صحرایی به عنوان مدل جهت بررسی اولیه و کلی تاثیر ترکیبات مهار کننده استفاده کرد، باید به تفاوت موجود در ساختار آن توجه کرد و بنابراین نتایج به دست آمده از مدل را در موارد حساس تر با احتیاط تفسیر نمود.

واژگان کلیدی: آلفا آمیلاز، مدلسازی مولکولی، مهارکننده، موش صحرایی

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* ***نشانی:*** تهران، پونک، حصارک، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۹۱۲۲۰۱۰۲۲۲، پست الکترونیک: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۱/۰۱/۲۶ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۱/۰۳/۱۴** **تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۴/۲۸**

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]

مقدمه

آلفا آمیلازها با حدود ۵۰ KD وزن در دسته گلیکوزیل هیدرولازها قرار دارند و با کدآنزیمی EC:3.2.1.1 شناسایی می‌شوند. تمام آلفا آمیلازها اندوگلیکوزیداز هستند، بنابراین عمل هیدرولیز را از داخل مولکول نشاسته یا گلیکوژن انجام می‌دهند و کنفورماسیون آنومری آلفا را حفظ می‌کنند [۳-۱]. علی‌رغم تشابه ساختاری زیاد بین گونه‌های مختلف آلفا آمیلاز، همسانی توالی بین آنها کم است [۵،۴]. دو نوع اصلی آلفا آمیلاز در پستانداران شامل شکل بزاقی و پانکراسی آن است که تا حد زیادی در توالی آمینو اسیدها مشابه هستند [۷،۶]. مهار آنزیم‌های گلوکوزیداز می‌تواند در کاهش هضم نشاسته و جذب گلوکز در روده کوچک و کنترل گلوکز خون موثر باشد [۹،۸] و به این ترتیب به عنوان یک راهکار مطرح در درمان دیابت و چاقی مطرح است [۱۰،۱۱]. از میان این مهار کننده‌ها، مهار کننده‌های آنزیم آلفا آمیلاز، از توجه بیشتری برخوردارند زیرا به نظر می‌رسد عوارض جانبی گوارشی شدید حاصل از مهار کننده‌های آلفا گلوکوزید را ایجاد نمی‌نمایند [۱۲،۱۳].

اثر مهار کننده‌های مورد نظر، ابتدا به شکل in vitro بر روی آنزیم‌های آلفا آمیلاز بررسی می‌گردد و در مرحله بعد، از حیوانات آزمایشگاهی برای بررسی اثر مهار کننده‌های مورد نظر استفاده می‌گردد [۱۴]. موش صحرایی یک مدل آزمایشگاهی رایج برای بررسی‌های دیابت و چاقی است، لیکن این مسئله که نتایج به دست آمده از آزمایش بر حیوانات آزمایشگاهی تا چه حد قابل تعمیم به انسان است نیز قابل تامل می‌باشد. از آنجایی که ساختار کریستالی از آمیلاز این حیوان در دست نیست، استفاده از مدل‌سازی مولکولی ساده‌ترین روش برای تهیه مدلی از ساختار آنزیم می‌باشد [۱۵]. از مدل ایجاد شده به منظور مقایسه و تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های آمیلاز پانکراسی موش (RPA)، با آمیلاز پانکراسی انسان (HPA) که هدف اصلی طراحی مهار کننده‌های آنزیم است، استفاده گردید.

روش‌ها

بررسی ترادف آمینواسیدی و مدل‌سازی

توالی آمینو اسیدی آنزیم موش صحرایی RPA (Rattus Norvegicus) از طریق پایگاه اطلاعات NCBI به دست آمد (www.ncbi.nlm.nih.gov). از برنامه Blast (پایگاه اطلاعات NCBI) و Clustal W [۱۶] برای بررسی ترادف توالی RPA و HPA استفاده گردید. برای مدل‌سازی ساختار آنزیم موش از SWISS MODEL استفاده شد (http://www.expasy.ch/swissmod/SWISSmodel).

ساختار کریستالوگرافی HPA با کد 3OLD .pdb به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت.

جایگیری (داکینگ)

جایگیری ترکیبات، با برنامه Auto Dock 3.0 5 انجام شد. برای نسبت دادن بار به پروتئین از بارهای Kollman استفاده شد و برای لیگاند بار Gasteiger در نظر گرفته شد. جعبه (Grid) به کار رفته برای محدود کردن منطقه جایگیری، شامل کل حجم پروتئین بود. برای انجام جایگیری از الگوریتم ژنتیک استفاده شد و حداکثر موارد بررسی (Maximum Mumber of evals) ۲۵۰۰۰ عدد در نظر گرفته شد. مولکول‌های اضافی همراه آنزیم، مانند حلال پیش از docking از فایل PDB آنزیم حذف گردید.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

بهترین حالت لیگاند به دست آمده از Docking برای شبیه‌سازی استفاده گردید. از شبیه‌سازی دینامیکی موجود در برنامه MOE 2008 برای شبیه‌سازی‌های ۴۰۰۰ پیکو ثانیه‌ای در دمای T=300K استفاده شد. ابتدا سیستم در حلال آب قرار گرفت و شبیه‌سازی مقدماتی، با شرایط دمای 300 K و زمان ۱۰۰ پیکو ثانیه به منظور ایجاد تعادل در سیستم انجام گردید. لازم به ذکر است در تمام مراحل شبیه‌سازی از Force field ، OPLAS – AA استفاده گردید. سپس میانکنش‌های بهترین حالت قرارگیری لیگاند در جایگاه فعال آنزیم مورد نظر، مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]

یافته‌ها و بحث

در این تحقیق از مدل ایجاد شده به منظور مقایسه و تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های RPA، با HPA، که هدف اصلی تحقیقات است، استفاده گردید. شکل ۱ نتایج مقایسه توالی‌های آنزیم‌های RPA و HPA توسط BLAST را نشان می‌دهد که شامل ۹۲٪ تشابه و ۸۵٪ یکسان بودن اسید آمینه‌ها این دو آنزیم است.

اولین قدم در مرحله مدل‌سازی مولکولی انتخاب الگوی مناسب برای مدل‌سازی است که در این تحقیق برای مدل‌سازی آمیلاز موش، از HPA (3OLD.pdb) استفاده شد. همراه این ساختار مهار کننده Acarviostatin (IO_3) قرار داشت. این مهار کننده کربوهیدراتی، شش زیر واحد دارد و قدرت مهار کنندگی آن نیز از آکاربوز بیشتر است (شکل ۲) [۱۷].

از Swiss modeller برای مدل‌سازی RPA استفاده شد و مدل ساخته شده توسط MOE، از نظر انرژی بهینه شد. در بررسی کیفیت مدل توسط Errat فاکتور کیفیت ۹۳/۶۷۱٪ را نشان می‌دهد. از آنجایی که فاکتور کیفیت Errat بالاتر از ۹۱٪ قابل قبول است این نتیجه نشان دهنده قابل قبول بودن مدل به دست آمده است [۱۸]. منحنی راماچاندران حاصل از MOE نشان می‌دهد که ۹۶/۹۵٪ از باقی‌مانده‌های آمینواسیدی در محدوده مجاز قرار دارند (شکل ۳) که این عامل نیز خود دلیل بر قابل قبول بودن مدل ساخته شده است.

در شکل ۴ اسکلت دو آنزیم HPA و RPA روی یکدیگر قرار داده شده است. در این شکل سه دمین A , B , C مجموعاً بر هم منطبق هستند ولیکن سه آمینواسیدی که در HPA بیشتر از RPA وجود دارد به شکل لوپ دیده می‌شود.

HPA دارای ۴۹۶ آمینو اسید و RPA دارای ۴۹۳ آمینو اسید می‌باشد. لوپی متشکل از سه آمینو اسید TGS که در موقعیت ۱۴۵ – ۱۴۳ در HPA قرار دارد، در دمین B آنزیم واقع شده و چون معادل این سه آمینو اسید در RPA وجود ندارد، سکانس آمینواسیدی RPA سه آمینو اسید کمتر از HPA دارد.

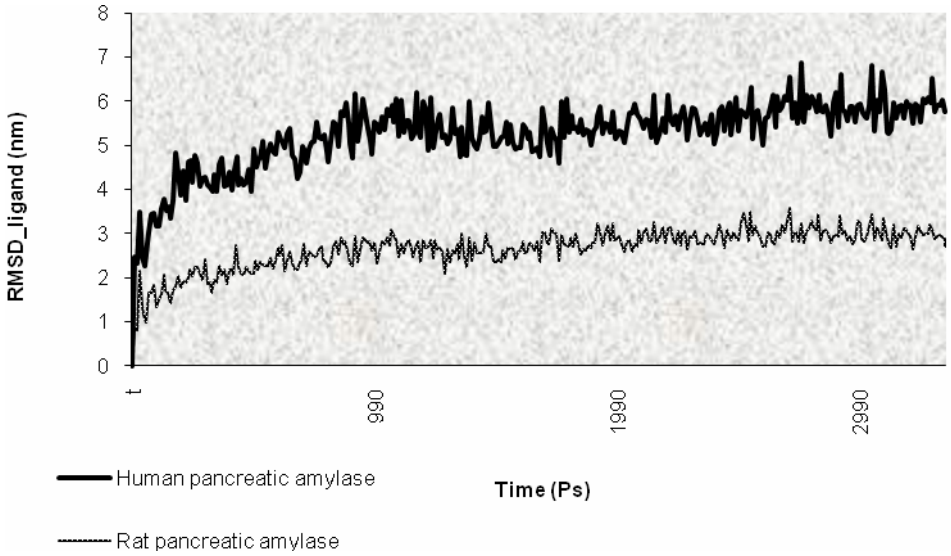
برای بررسی تفاوت‌ها وشباهت‌های بین HPA و RPA از مهار کننده‌ای با قدرت مهاری قابل قبول استفاده گردید. همانطور که اشاره شد مشتقات Acarviostatin مهار کننده‌های قوی برای HPA به شمار می‌آید. از آنجایی که این مهار کننده ۶ زیر واحد دارد قادر است که ۶ زیرجایگاه را در جایگاه فعال آنزیم HPA اشغال نماید. بنابراین می‌تواند نقش مهاری موثری را ایفا نماید.

براساس نتایج حاصل از آزمایش بر روی قدرت مهاری آکاربوز و IO_3 Acarviostation قدرت مهاری Acraviostatin IO_3 دو برابر آکاربوز است. (قدرت مهاری حاصل تقسیم K_i آکاربوز به IO_3 K_i است[۱۷].

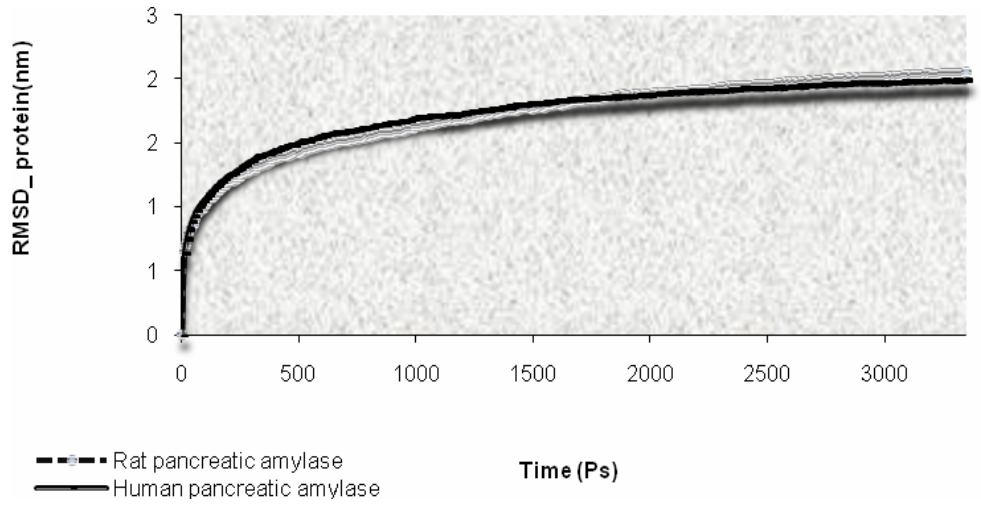
با استفاده از Auto dock ۳/۰۵ مکان قرارگیری IO_3 تعیین گردید. در مرحله بعد از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به مدت 4000 ps استفاده گردید تا قادر باشیم میان‌کنش‌های برقرار شده بین لیگاند و آمینواسیدهای جایگاه فعال آنزیم که انعطاف پذیر است و در حلال قرار دارد را بررسی کنیم. نمودارهای ۲،۱، ۳ و ۴ حاصل از شبیه‌سازی تغییر محسوسی در موقعیت اتم کلسیم، اتم کلر و پروتئین نشان نمی‌دهد و طی مراحل شبیه‌سازی تنها جابجایی لیگاند مشهود است.

میان‌کنش آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم HPA و RPA با IO_3 در مراحل ۱۰۰ پیکوثانیه، ۴۰۰۰ پیکوثانیه، حداکثر انرژی سیستم وحداقل انرژی سیستم بررسی گردید (جدول ۱ و۲).

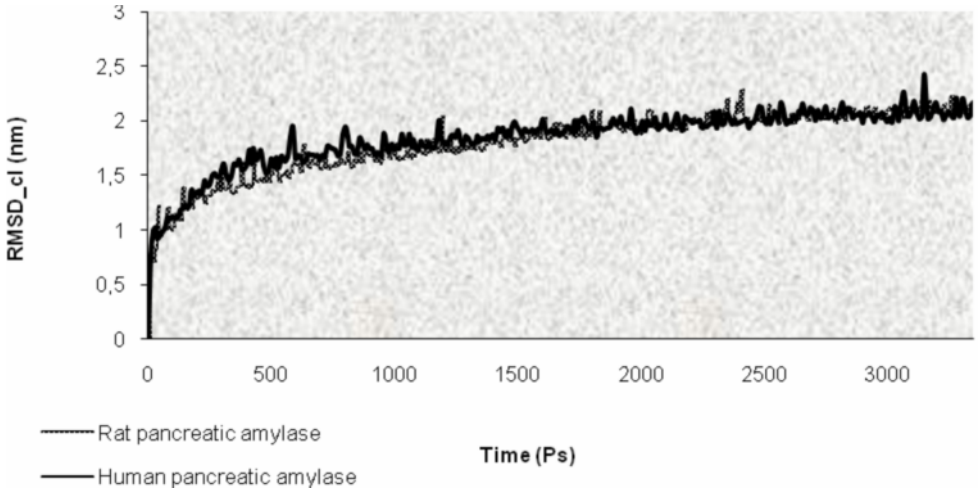
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]



نمودار ۱- مقایسه RMSD لیگاند در آمیلاز انسان و موش در طول شبیه سازی

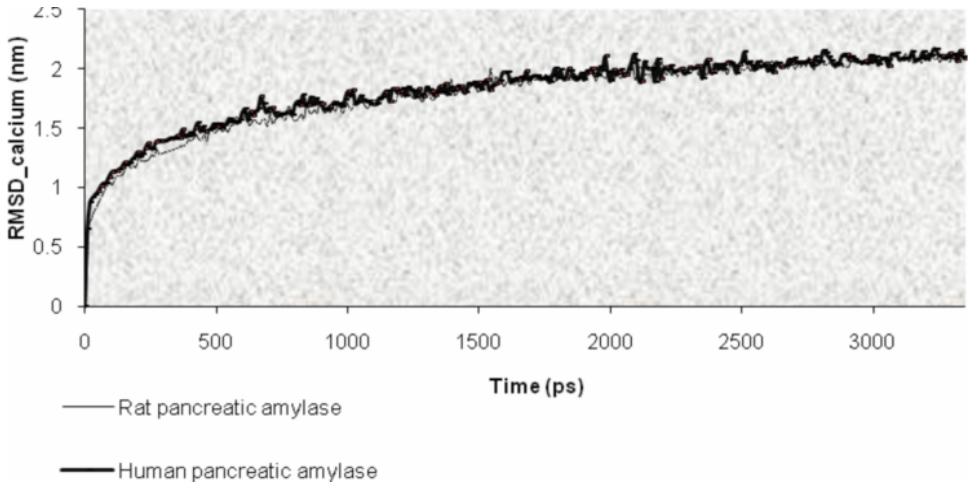


نمودار ۲- مقایسه RMSD پروتئین در آمیلاز انسان و موش در طول شبیه سازی



نمودار ۳- مقایسه RMSD کلر در دو آنزیم آمیلاز موش و انسان طی شبیه سازی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]

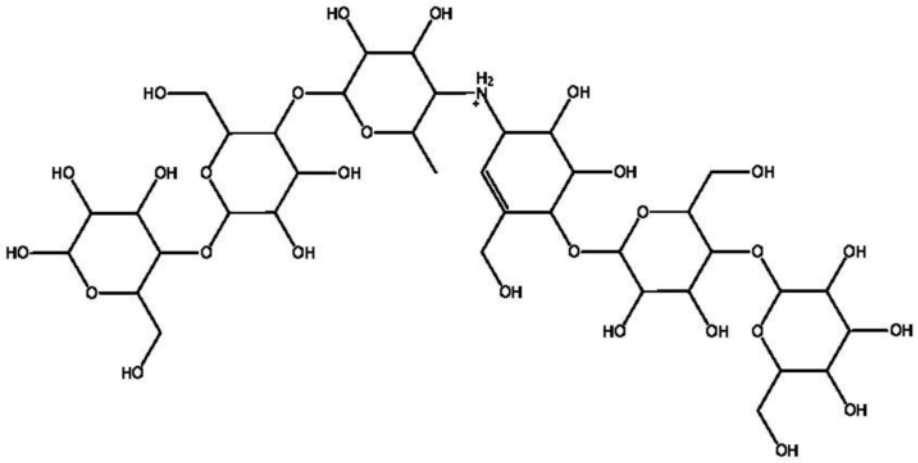


نمودار ۴- مقایسه RMSD کلسیم در دو آنزیم آمیلاز موش و انسان طی شبیه سازی.

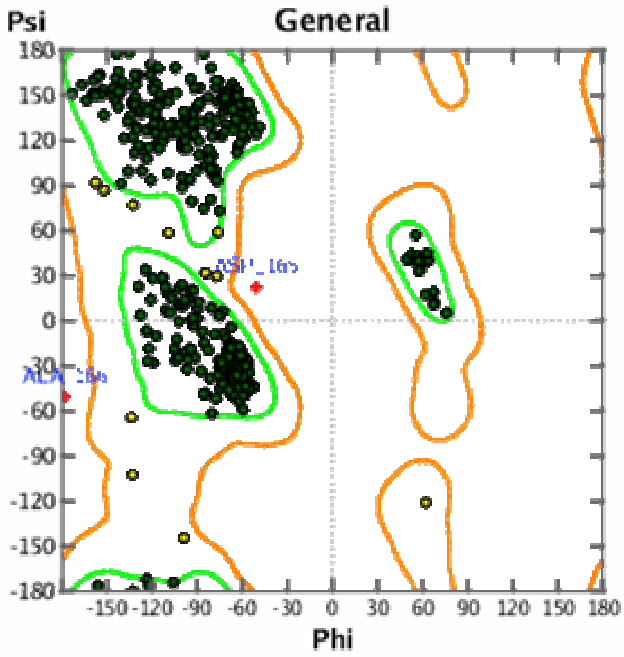
```
sp|P04746|AMYP_HUMAN      MKFFLLLFTIGFCWAQYSPNTQQGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLAPKGFGGVQVSPP 60
sp|P00689|AMYP_RAT        MKFVLLLSLIGFCWAQYDPHTADGRTAIVHLFEWRWADIAKECERYLAPKGFGGVQVSPP 60
                          ***.***  ********.*:* :***:*********.*** ******************

sp|P04746|AMYP_HUMAN      NENVAIYNPFRPWWERYQPVSYKLCTRSGNEDEFRNMVTRCNNVGVRIYVDAVINHMCGN 120
sp|P00689|AMYP_RAT        NENIIINNPSRPWWERYQPISYKICSRSGNENEFKDMVTRCNNVGVRIYVDAVINHMCGS 120
                          ***: * ** *********:***:*:*****:**::**********************.

sp|P04746|AMYP_HUMAN      AVSAGTSSTCGSYFNPGSRDFPAVPYSGWDFNDGKCKTGSGDIENYNDATQVRDCRLTGL 180
sp|P00689|AMYP_RAT        GNSAGIHSTCGSYFNPNNREFSAVPYSAWYFNDNKCN---GEINNYNDANQVRNCRLSGL 177
                          . **** *********..*:*.*****.* ***.**:   *:*:*****.***:***:**

sp|P04746|AMYP_HUMAN      LDLALEKDYVRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRLDASKHMWPGDIKAILDKLHNLNSNWFPAG 240
sp|P00689|AMYP_RAT        LDLALDKDYVRTKVADYMNNLIDIGVAGFRLDAAKHMWPGDIKAVLDKLHNLNTKWFSQG 237
                          *****:*****:*:*:***:**********:**********:*********::**. *

sp|P04746|AMYP_HUMAN      SKPFIYQEVIDLGGEPIKSSDYFGNGRVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGEGWG 300
sp|P00689|AMYP_RAT        SRPFIFQEVIDLGGEAIKGSEYFGNGRVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLKNWGEGWG 297
                          *:***:*********.**.*:**************************************

sp|P04746|AMYP_HUMAN      FVPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKMAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWP 360
sp|P00689|AMYP_RAT        FVPTDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARMYKMAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRRT 357
                          ***:*********************************:********************** .

sp|P04746|AMYP_HUMAN      RQFQNGNDVNDWVGPPNNNGVIKEVTINPDTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVIFRNVVDGQP 420
sp|P00689|AMYP_RAT        RNFQNGKDVNDWIGPPNNNGVIKEVTINPDTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVAFRNVVNGQP 417
                          *:****:*****:******** *************************** *****:***

sp|P04746|AMYP_HUMAN      FTNWYDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNNDDWSFSLTLQTGLPAGTYCDVISGDKINGNCTGI 480
sp|P00689|AMYP_RAT        FANWWDNGSNQVAFSRGNRGFIVFNNDDWALSSTLQTGLPAGTYCDVISGDKVNGNCTGL 477
                          *:**:*********.**************::* ********************:******:

sp|P04746|AMYP_HUMAN      KIYVSDDGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKL 511
sp|P00689|AMYP_RAT        KVNVGSDGKAHFSISNSAEDPFIAIHADSKL 508
                          *: *..**********************:***
```

شکل ۱- مقایسه توالی RPA و HPA توسط برنامه Clustal W

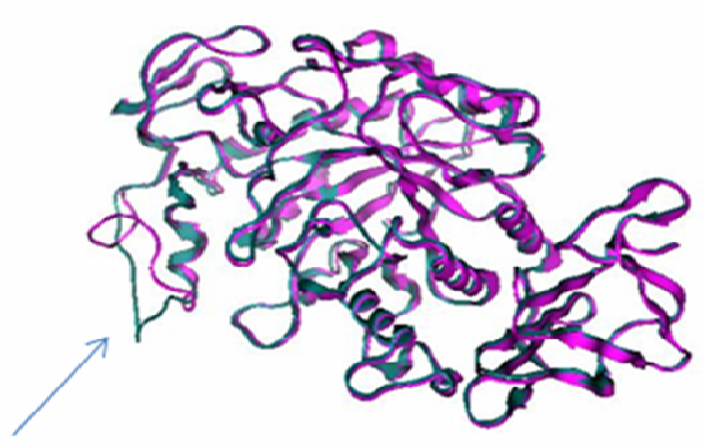
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]



شکل ۲- ساختار Acarviostatin (IO_3)



شکل ۳- منحنی راماچاندران مدل ساخته شده



شکل ۴- اسکلت دو آنزیم HPA و RPA در حالت Superpose

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]

جدول ۱- تعداد و طول پیوندها بین آمینواسیدهای تعیین شده در HPA و مهارکننده IO_3 (بر حسب آنگستروم) در مراحل مختلف شبیه‌سازی

	ASP ۳۰۰	HIS ۲۹۹	GLU ۲۳۳	HIS ۲۰۱	GLN ۶۳	THR ۱۶۳	Ala ۱۰۶	ASP ۱۹۷	TRP ۵۹	His ۱۰۱
۱۰۰ پیکوثانیه	۱/۶۴ ۱/۶۱	۲/۳۴	۱/۶۲	۲/۵۶ ۲/۱۱	۱/۷۹	۲/۴۸		۱/۶۲	۲/۰۹	۲/۳۵
۴۰۰۰ پیکوثانیه	۱/۶۲ ۱/۷۵	۲/۴۹	۲	۲/۴۹	۲/۳۶	۱/۵۵	۲/۰۲	۱/۶۲	۲/۳۵	۲/۸۵
ماکزیمم انرژی کل سیستم	۱/۶۴ ۱/۶۱	۲/۳۴	۱/۶۲	۲/۵۶ ۲/۱۱	۱/۷۹	۲/۴۸		۱/۶۲	۲/۰۹	۲/۳۵
مینیمم انرژی کل سیستم	۱/۶۱ ۱/۶۶		۱/۶۷	۲/۷۱	۲/۰۵	۱/۹۲	۲/۳۷	۱/۴۴	۱/۸۶	۲/۳۸

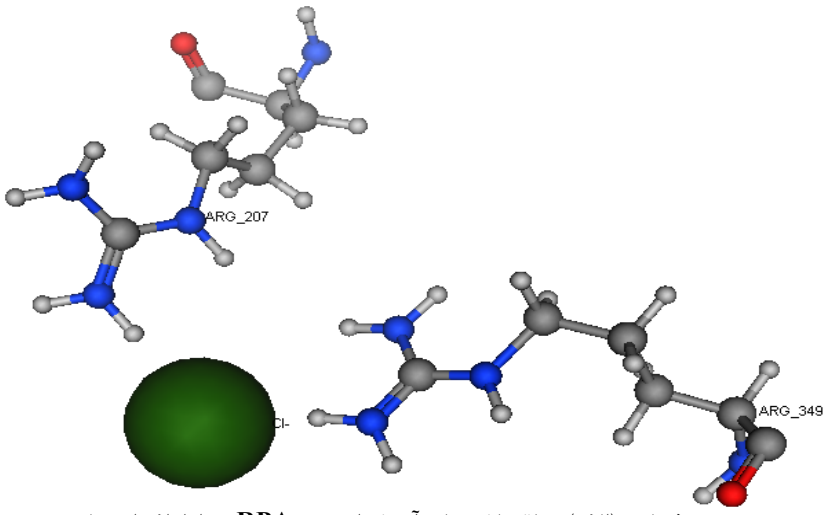
جدول ۲- تعداد و طول پیوندها بین آمینواسیدهای تعیین شده در RPA ومهارکننده IO_3 (بر حسب آنگستروم) در مراحل مختلف شبیه‌سازی

	Glu ۲۳۰	Asp ۱۹۴	Ser ۱۶۰	Gly ۱۰۶	Gln ۶۳	Trp ۵۹	His ۲۹۶	His ۱۹۸	Lys ۱۹۷	His ۱۰۱	Ser ۱۰۵
۱۰۰ پیکوثانیه	۱/۵۶ ۲/۷۳	۱/۷۲	۱/۹۲ ۲/۲۰	۲/۱۳	۱/۶۰	۲/۰۹	۲/۷۶	۲/۷۸ ۲/۹۳	۱/۷۴	۲/۲۹	
۴۰۰۰ پیکوثانیه	۱/۷۶ ۱/۵۷	۱/۶۳	۲/۱۳ ۱/۶۵	۲/۶۲	۱/۹۸	۲/۹۳	۲/۱۵ ۲/۸۳	۲/۰۶ ۲/۶۲	۱/۷۸		۲/۹۷
ماکزیمم انرژی کل سیستم	۱/۵۶ ۲/۷۳	۱/۷۲	۱/۹۲ ۲/۲۰	۲/۱۳	۱/۶۰	۲/۰۹	۲/۷۶	۲/۷۸ ۲/۹۳	۱/۷۴	۲/۲۹	
مینیمم انرژی کل سیستم	۱/۵۳ ۲/۵۰	۱/۶۳	۱/۶۵ ۲/۱۳	۲/۴۶	۱/۶۶	۲/۸۱	۲/۱۵ ۲/۹۸	۲/۴۷ ۱/۹۸	۱/۷۹	۲/۵۷	

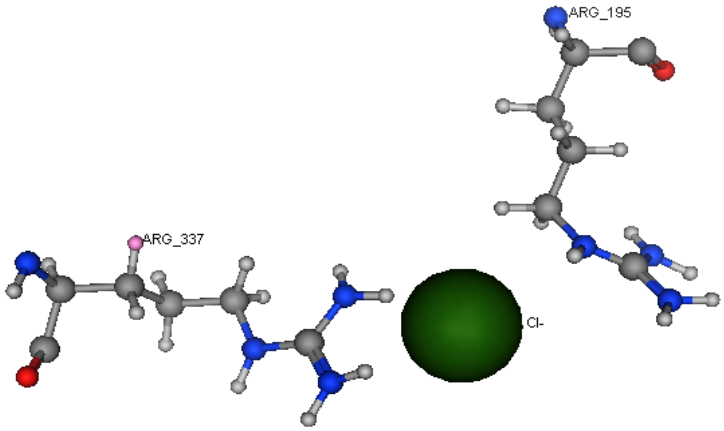
در این بین نقش تعدادی از آمینواسیدها برجسته‌تر است. از میان آنها می‌توان به $D_{۳۰۰}$ در HPA اشاره نمود که در تمام مراحل دو پیوند هیدروژنی پایدار ایجاد نموده است، $D_{۱۹۷}$ در HPA و $D_{۱۹۴}$ در RPA نیز در تمام مراحل، پیوند هیدروژنی پایداری ایجاد نموده‌اند $E_{۲۳۳}$ در HPA و $E_{۲۳۰}$ در RPA هم در مراحل بررسی شده پیوندهای هیدروژنی پایداری ایجاد نموده‌اند. علاوه بر آمینواسیدهای ذکر شده K_{197}، S_{160} و Q_{63} نیز در RPA پیوندهایی با پایداری بالا ایجاد می‌کنند. با توجه به نتایج فوق اهمیت این آمینواسیدها در طراحی مهارکننده های جدید محرز می‌باشد. نکته قابل توجه در اینجا آمینو اسیدهای ۱۶۰ و ۶۳ هستند که جزو باقی‌مانده‌های کاتالیتیک نمی‌باشند [۱۹].

مقایسه مکان قرارگیری کلر و کلسیم در دو آنزیم نیز نشان دهنده شباهت بین آنهاست. درساختار RPA آمینو اسیدهای پیوند دهنده با کلر عبارتند از R_{192} و R_{334}. با بررسی ساختار HPA مشاهده می‌شود که آمینو اسیدهای معادل، یعنی R_{195} و R_{337} نیز در پیوند با کلرنقش دارند. (شکل ۵ الف و۵ ب). آمینواسیدهای پیوند دهنده با کلسیم در ساختار RPA عبارتند از R_{155}، N_{137} D_{164}، H_{198} N_{100} و آمینو اسیدهای موجود در HPA R_{158}، N_{137} D_{167}، N_{100} H_{201} می‌باشند که دلیل بر شباهت دو آنزیم می‌باشد. (شکل۶ الف و ۶ ب). این موضوع به خصوص از جهت اهمیت نقش کلر و کلسیم در فعایت آنزیم [۲۰،۲۱] مورد توجه است.

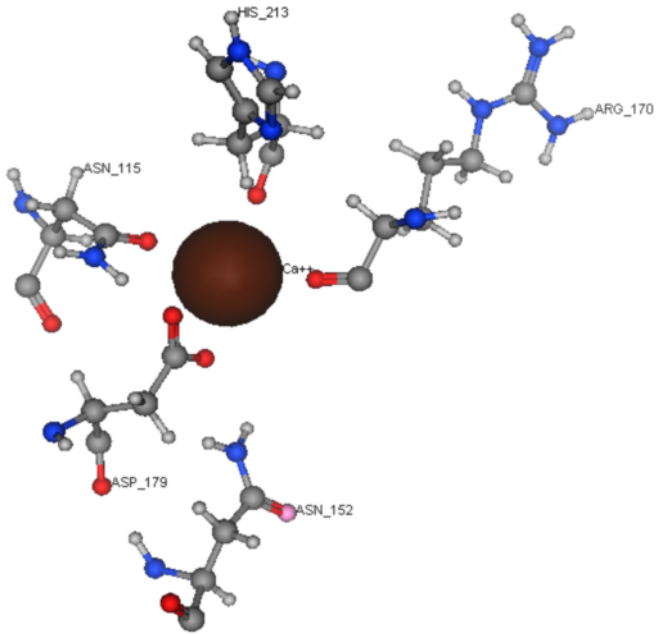
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]



شکل ۵ (الف)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی RPA در اطراف اتم کلر
(شماره آمینواسیدها با ۱۵ آمینواسید پتید نشانه محاسبه گردیده است)

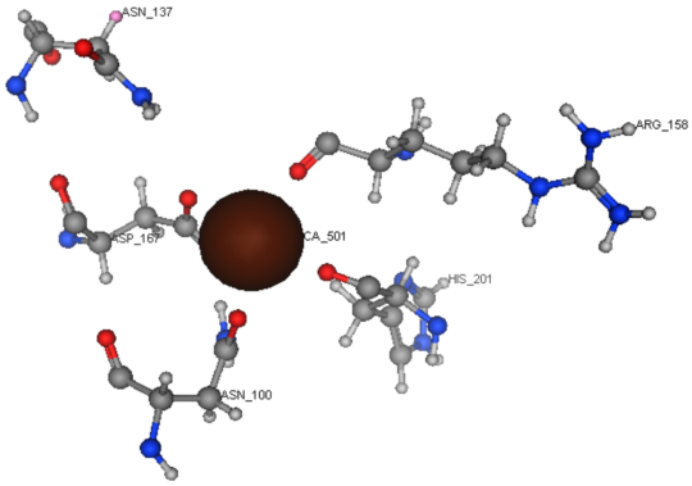


شکل ۵ (ب)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی HPA در اطراف اتم کلر



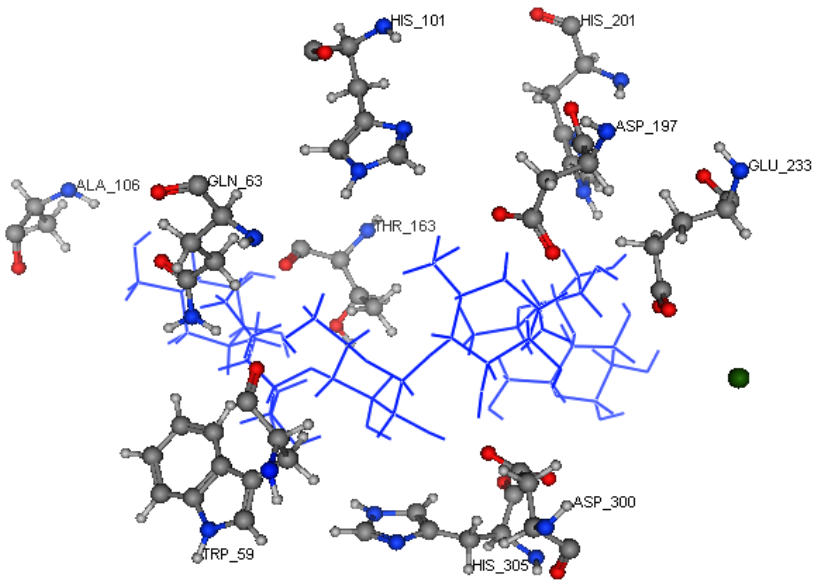
شکل ۶ (الف)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی در اطراف کلسیم ساختار RPA
(شماره آمینواسیدها با ۱۵ آمینواسید پتید نشانه محاسبه گردیده است)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]



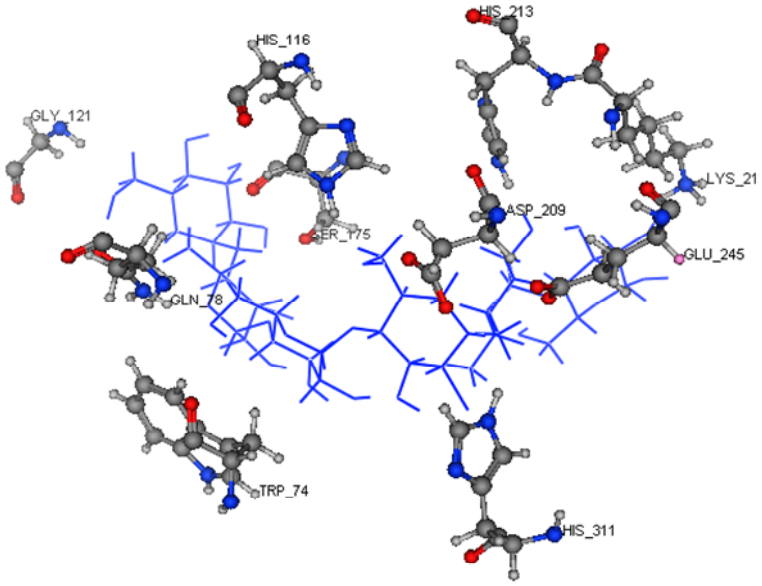
شکل ۶ (ب)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی HPA در اطراف کلسیم

شکل۷ الف و ۷ ب میان‌کنش بین آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم‌های HPA و RPA را با IO_3 نشان می‌دهد. با مقایسه آمینواسیدهایی که در این دو آنزیم با IO_3 میانکنش داده‌اند دیده شده، تعدادی از آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال دو آنزیم که با IO_3 میانکش می‌دهند مشابه هم هستند. آمینو اسیدهای موجود در HPA عبارتند از D_{197}، W_{59}، E_{233}، D_{300}، H_{201} و H_{101} ، H_{305}، Q_{63}، A_{106} و T_{163}. در مقایسه با HPA، آمینو اسیدهای جایگاه فعال RPA عبارتند از: D_{194}، W_{59} و E_{230}، S_{160}، G_{106} و Q_{63} و H_{296} و H_{198} و H_{101} و K_{197}.



شکل ۷ (الف)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی HPA که قابلیت ایجاد میانکنش با لیگاند را دارند

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]



شکل ۷ (ب)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی RPA که قابلیت ایجاد میانکنش با لیگاند را دارند (شماره آمینواسیدها با ۱۵ آمینواسید پتید نشانه محاسبه گردیده است)

از میان ۱۰ آمینو اسید شرکت کننده در میانکنش با IO_3، 4 آمینو اسید در هر دو آنزیم HPA و RPA متفاوت هستند. S_{160} در RPA مشابه T_{163} در HPA است. یک آمینو اسید قطبی، جانشین آمینو اسید قطبی دیگر شده است با این تفاوت که T_{163} زنجیره جانبی حجیم‌تری نسبت به S_{160} دارد. به علاوه G_{106} در RPA جایگزین A_{106} در HPA شده است. در این مورد نیز گلایسین که فاقد زنجیره جانبی است، جانشین آمینو اسید الیفاتیک شده است. در این مورد، تفاوت بیشتری نسبت به مورد قبلی وجود دارد، زیرا حذف زنجیر جانبی این اسید آمینه می‌تواند جایگاه کمی بزرگتری را در آنزیم موش فراهم آورد.

به طور خلاصه، میزان شباهت‌های این دو آنزیم در اندازه‌ای هست که بتوان در مطالعات غربالگری جهت یافتن ترکیبات مهار کننده، از آنزیم موش استفاده کرد. لیکن در طراحی ترکیبات اختصاصی‌تر، می‌بایست متوجه تفاوت‌های این دو آنزیم بود، چرا که حذف سه آمیتو اسید در آنزیم موش، و نیز تفاوت‌های جزئی جایگاه فعال ممکن است موجب تفاوت رفتاری آن با آنزیم انسان باشد.

سپاسگزاری

در این مطالعه از نرم‌افزارهای مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده گردید.

مأخذ

1- Numao S, Damager I, Li C, Wrodnigg TM, Begum A, Overall CM, Brayer GD, Withers SG. In Situ Extension as an Approach for Identifying Novel alpha Amylase Inhibitors. *J Biological Chemistry* 2004, 279(46): 48282-48291.
2- Qian M, Haser R, Payan F. Carbohydrate binding sites in a pancreatic a-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 A resolution. *Protein Science* 1995, 4.p747-755.
3- Qian M, Nahoum V, Bonicel J, Bischoff H, Henrissat B, Payan F. Enzyme-Catalyzed Condensation Reaction in a Mammalian Alpha-Amylase. High-Resolution Structural Analysis of an Enzyme-Inhibitor Complex *Biochemistry*, 2001, 40.p 7700-7709.
4- Jespersen HM, MacGregor EA, Sierks MR, Svensson B Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem J* 1991; 280: .p51–55.
5- Nakajima R, Imanaka T, and Aiba S, Comparison of amino acid sequences of eleven different alpha-amylases *Appl Microbiol Biotechnol* 1986; 23: p355-360.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]

6- Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, and Chou CJ. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human r-Amylase. *J Med Chem* 2008; 51: p3555–3561.
7- Meisler MH and Ting C-N .The Remarkable Evolutionary History of the Human Amylase Genes Critical Reviews in *Oral Biology and Medicine* 1993; 4: p503-509.
8- Boivin M, Flourie B, Rizza RA, Go VL, DiMagno EP .Gastrointestinal and metabolic effects of amylase inhibition in diabetics. *Gastroenterology* 1998; 94: p387–394.
9- Darlington, G J, Tsai C C, Samuelson L C, Gumucio D L, and Meisler M H. Simultaneous expression of salivary and pancreatic amylase genes in cultured mouse hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1986; 6(4): .p 969-975.
10- Tundis, R; Loizzo, M. R; Menichini, F. Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes. *Med Chem* 2010; 10: (4).p 315-31.
11- Funke I, Melzig MF. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α-amylase activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16(1): p1-5.
12- Aoki, K.; Muraoka, T.; Ito, Y.; Togashi, Y.; Terauchi, Y., Comparison of adverse gastrointestinal effects of acarbose and miglitol in healthy men: a crossover study. *Intern Med* 2010; 49 (12): p1085-7.
13- Randhir R , Shetty K. Improved α-amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using Rhizopus oligosporus. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 (3); p382-392.
14- Jo S-H, Ka E-H, Lee H-S, Apostolidis E, Jang H-D and Kwon Y-I Comparison of Antioxidant Potential and Rat intestinal α-Glucosidases inhibitory Activities of Quercetin, Rutin,and IsoQuercetin International. *Journal of Applied Research in Natural Products* 2010; 2 (4): p 52-60.
15- Ginalski K, Comparative modeling for protein structure prediction. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16: p172-177.
16- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23 (21): p2947-8.
17- Qin, X.; Ren, L.; Yang, X.; Bai, F.; Wang, L.; Geng, P.; Bai, G.; Shen, Y., Structures of human pancreatic alpha-amylase in complex with acarviostatins: Implications for drug design against type II diabetes. *J Struct Biol* 2011; 174 (1): p 196-202.
18- Colovos, C.; Yeates, T. O., Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci* 1993**;** 2 (9): p 1511-9.
19- Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis-Mouren G, Desseaux V.On the mechanism of alpha-amylase. *Eur J Biochem* 2003; 270(19): p3871-9.
20- Aghajari N, Feller G, Gerday C, and Haser R. Structural basis of alpha-amylase activation by chloride. *Protein Sci* 2002; 11: p1435-41.
21- Kayamori Y, Katayama Y.Enzymatic method for assaying calcium in serum and urine with porcine pancreatic alpha-amylase. *Clin Chem* 1994 40(5): p781-4.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-21]