

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

شیوا خلیل مقدم^۱، آزاده ابراهیم حبیبی^۲، پروین پاسالار^۳، پریچهره یغمایی^{۳*}، باقر لاریجانی^۲

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های گلیکوزیداز در هضم نشاسته و گلیکوژن در نتیجه افزایش قند خون موثرند. مهارکننده‌های این آنزیم‌ها خصوصاً 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 صحرائی 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 صحرائی 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 صحرائی 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 صحرائی 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 صحرائی

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

مقدمه

آلفا آمیلازها با حدود ۵۰ KD وزن در دسته گلیکوزیل هیدرولازها قرار دارند و با کد آنزیمی 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 کنفورمسیون آنومری آلفا را حفظ می‌کنند [۳-۱]. علی‌رغم تشابه ساختاری زیاد بین گونه‌های مختلف آلفا آمیلاز، همسانی توالی بین آنها کم است [۴، ۵]. دو نوع اصلی آلفا آمیلاز در پستانداران شامل شکل بزاقی و پانکراسی آن است که تا حد زیادی در توالی آمینو اسیدها مشابه هستند [۶، ۷]. مهار آنزیم‌های گلوکوزیداز می‌تواند در کاهش هضم نشاسته و جذب گلوکز در روده کوچک و کنترل گلوکز خون موثر باشد [۸، ۹] و به این ترتیب به عنوان یک راهکار مطرح در درمان دیابت و چاقی مطرح است [۱۱، ۱۰]. 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 [۱۳، ۱۲].

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 (Rattus RPA) (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 Number 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، AA - OPLAS استفاده گردید. سپس میان‌کنش‌های بهترین حالت قرارگیری لیگاند در جایگاه فعال آنزیم مورد نظر، مورد بررسی قرار گرفت.

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 بالاتر از ۹۱٪ قابل قبول است این نتیجه نشان دهنده قابل قبول بودن مدل به دست آمده است [۱۸]. منحنی رامچاندرا حاصل از MOE نشان می‌دهد که ۹۶/۹۵٪ از باقی مانده‌های 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

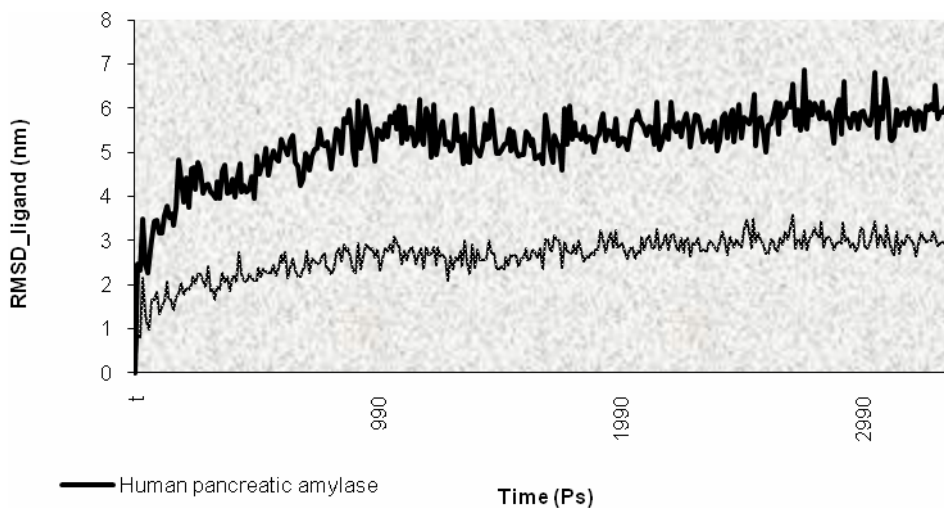
می‌باشد. لویی متشکل از سه آمینو اسید TGS که در موقعیت ۱۴۵ - ۱۴۳ در HPA قرار دارد، در دمین B آنزیم واقع شده و چون معادل این سه آمینو اسید در RPA وجود ندارد، سکانس آمینواسیدی RPA سه آمینو اسید کمتر از HPA دارد.

برای بررسی تفاوت‌ها و شباهت‌های بین HPA و RPA از مهار کننده‌ای با قدرت مهار 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 زیر جایگاه را در جایگاه فعال آنزیم HPA اشغال نماید. بنابراین می‌تواند نقش مهار موثری را ایفا نماید.

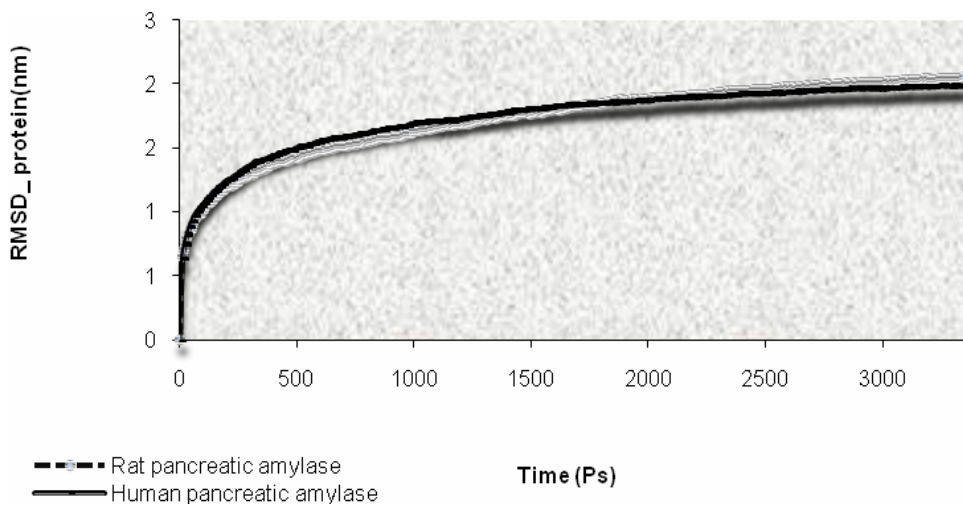
بر اساس نتایج حاصل از آزمایش بر روی قدرت مهار آکاربوز و IO_3 Acarviostatin قدرت مهار حاصل تقسیم K_i آکاربوز به K_i IO_3 است [۱۷].

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.

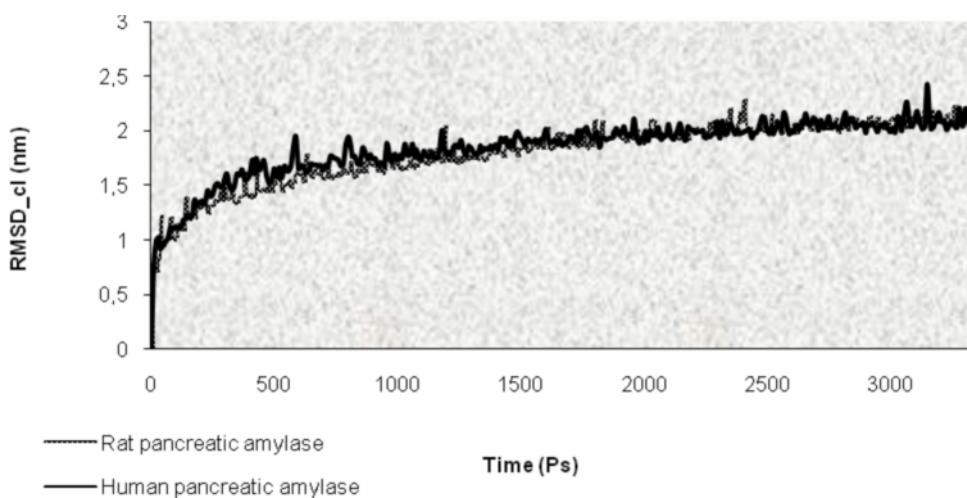
میان‌کنش آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم HPA و RPA با IO_3 در مراحل ۱۰۰ پیکوثانیه، ۴۰۰۰ پیکوثانیه، حداکثر انرژی سیستم و حداقل انرژی سیستم بررسی گردید (جدول ۱ و ۲).



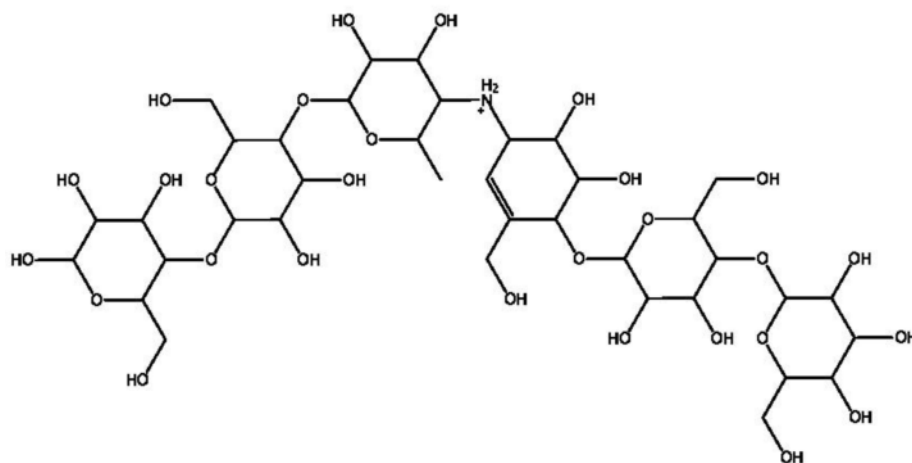
نمودار ۱- مقایسه RMSD لیگاند در آمیلاز انسان و موش در طول شبیه سازی



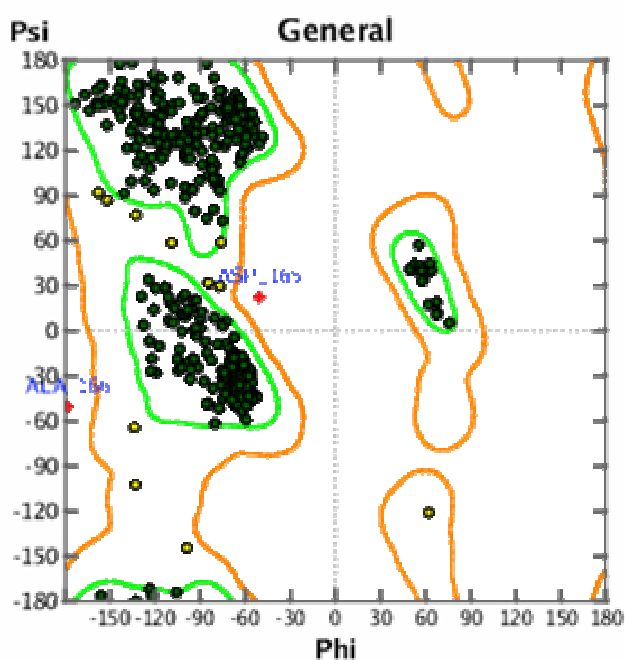
نمودار ۲- مقایسه RMSD پروتئین در آمیلاز انسان و موش در طول شبیه سازی



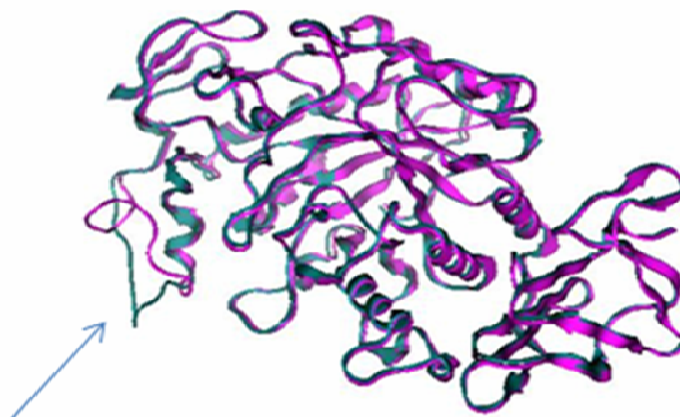
نمودار ۳- مقایسه RMSD کلر در دو آنزیم آمیلاز موش و انسان طی شبیه سازی



شکل ۲- ساختار (IO₃) Acarviostatin



شکل ۳- منحنی رامچاندرا ن مدل ساخته شده



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

جدول ۱- تعداد و طول پیوندها بین آمینواسیدهای تعیین شده در HPA و مهارکننده IO₃ (بر حسب آنکستروم) در مراحل مختلف شبیه‌سازی

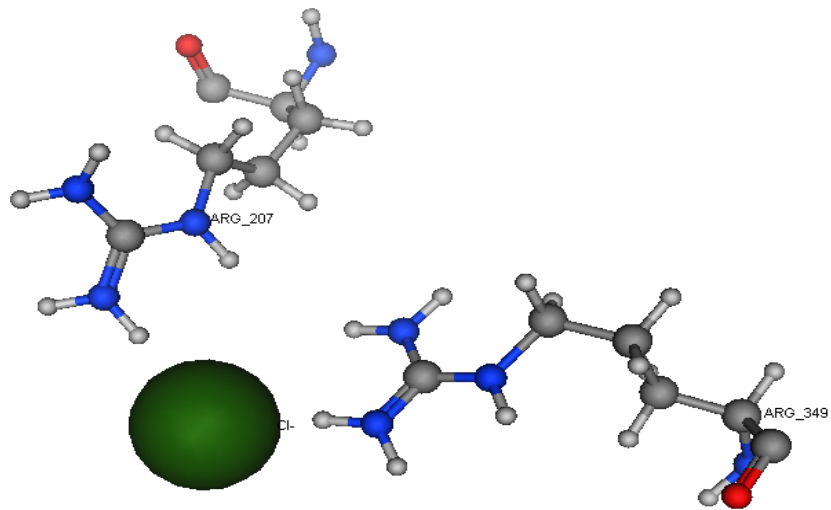
His ۱۰۱	TRP ۵۹	ASP ۱۹۷	Ala ۱۰۶	THR ۱۶۳	GLN ۶۳	HIS ۲۰۱	GLU ۲۳۳	HIS ۲۹۹	ASP ۳۰۰	
۲/۳۵	۲/۰۹	۱/۶۲		۲/۴۸	۱/۷۹	۲/۵۶ ۲/۱۱	۱/۶۲	۲/۳۴	۱/۶۴ ۱/۶۱	۱۰۰ پیکوتانیه
۲/۸۵	۲/۳۵	۱/۶۲	۲/۰۲	۱/۵۵	۲/۳۶	۲/۴۹	۲	۲/۴۹	۱/۶۲ ۱/۷۵	۴۰۰۰ پیکوتانیه
۲/۳۵	۲/۰۹	۱/۶۲		۲/۴۸	۱/۷۹	۲/۵۶ ۲/۱۱	۱/۶۲	۲/۳۴	۱/۶۴ ۱/۶۱	ماکزیمم انرژی کل سیستم
۲/۳۸	۱/۸۶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

جدول ۲- تعداد و طول پیوندها بین آمینواسیدهای تعیین شده در RPA و مهارکننده IO₃ (بر حسب آنکستروم) در مراحل مختلف شبیه‌سازی

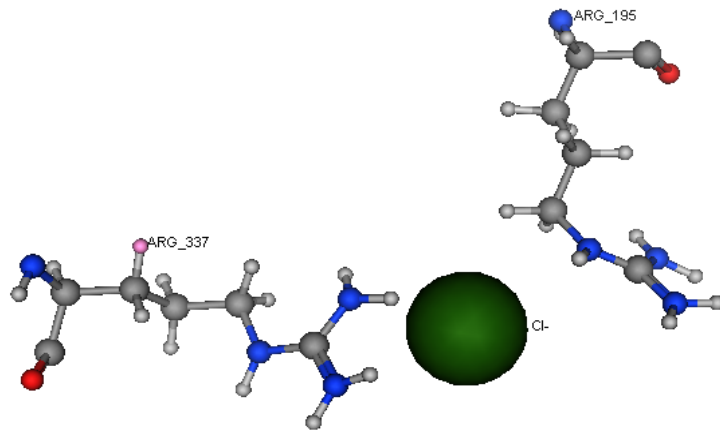
Ser ۱۰۵	His ۱۰۱	Lys ۱۹۷	His ۱۹۸	His ۲۹۶	Trp ۵۹	Gln ۶۳	Gly ۱۰۶	Ser ۱۶۰	Asp ۱۹۴	Glu ۲۳۰	
	۲/۲۹	۱/۷۴	۲/۷۸ ۲/۹۳	۲/۷۶	۲/۰۹	۱/۶۰	۲/۱۳	۱/۹۲ ۲/۲۰	۱/۷۲	۱/۵۶ ۲/۷۳	۱۰۰ پیکوتانیه
۲/۹۷		۱/۷۸	۲/۰۶ ۲/۶۲	۲/۱۵ ۲/۸۳	۲/۹۳	۱/۹۸	۲/۶۲	۲/۱۳ ۱/۶۵	۱/۶۳	۱/۷۶ ۱/۵۷	۴۰۰۰ پیکوتانیه
	۲/۲۹	۱/۷۴	۲/۷۸ ۲/۹۳	۲/۷۶	۲/۰۹	۱/۶۰	۲/۱۳	۱/۹۲ ۲/۲۰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

مقایسه مکان قرارگیری کلر و کلسیم در دو آنزیم نیز نشان دهنده شباهت بین آنهاست. در ساختار RPA آمینو اسیدهای پیوند دهنده با کلر عبارتند از R₃₃₄ و R₁₉₂. با بررسی ساختار HPA مشاهده می‌شود که آمینو اسیدهای معادل، یعنی R₃₃₇ و R₁₉₅ نیز در پیوند با کلر نقش دارند. (شکل ۵ الف و ۵ ب). آمینواسیدهای پیوند دهنده با کلسیم در ساختار RPA عبارتند از R₁₅₅، R₁₃₇، D₁₆₄، H₁₉₈ و N₁₀₀ و آمینو اسیدهای موجود در HPA R₁₅₈، N₁₃₇، D₁₆₇ و N₁₀₀ می‌باشند که دلیل بر شباهت دو آنزیم می‌باشد. (شکل ۶ الف و ۶ ب). این موضوع به خصوص از جهت اهمیت نقش کلر و کلسیم در فعالیت آنزیم [۲۰، ۲۱] مورد توجه است.

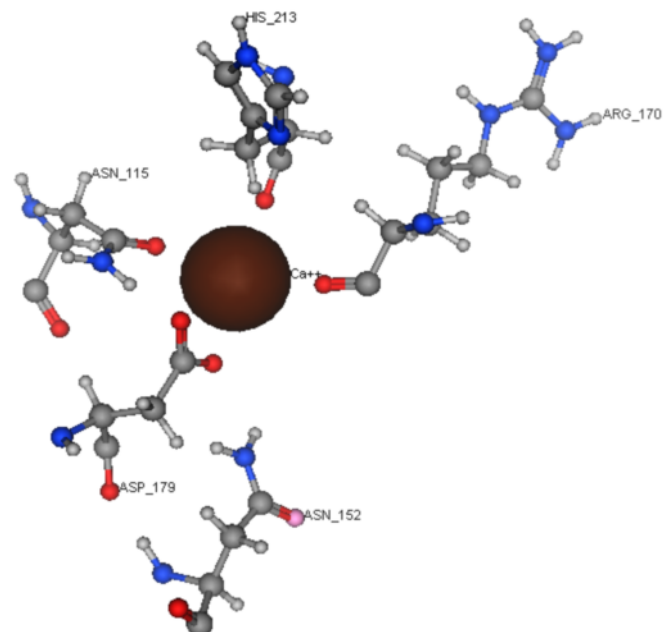
در این بین نقش تعدادی از آمینواسیدها برجسته‌تر است. از میان آنها می‌توان به D_{۳۰۰} در HPA اشاره نمود که در تمام مراحل دو پیوند هیدروژنی پایدار ایجاد نموده است، D_{۱۹۷} در HPA و D_{۱۹۴} در RPA نیز در تمام مراحل، پیوند هیدروژنی پایداری ایجاد نموده‌اند E_{۲۳۳} در HPA و H_{۳۰} در RPA هم در مراحل بررسی شده پیوندهای هیدروژنی پایداری ایجاد نموده‌اند. علاوه بر آمینواسیدهای ذکر شده S₁₆₀، K₁₉₇ و Q₆₃ نیز در RPA پیوندهایی با پایداری بالا ایجاد می‌کنند. با توجه به نتایج فوق اهمیت این آمینواسیدها در طراحی مهارکننده‌های جدید محرز می‌باشد. نکته قابل توجه در اینجا آمینو اسیدهای ۱۶۰ و ۶۳ هستند که جزو باقی‌مانده‌های کاتالیتیک نمی‌باشند [۱۹].



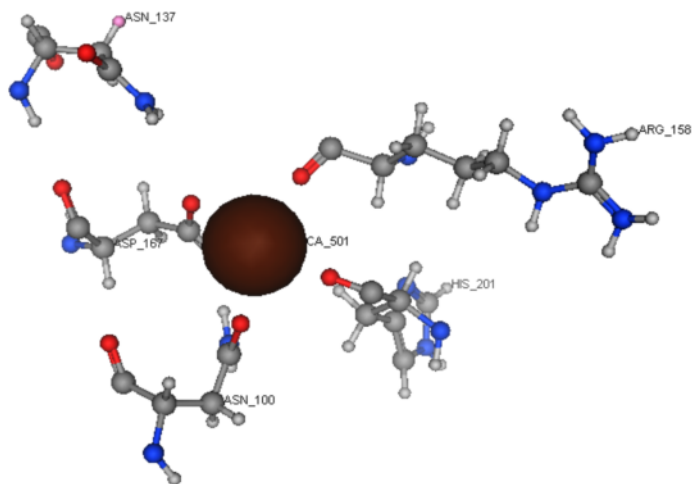
شکل ۵ (الف) - باقیمانده‌های آمینو اسیدی RPA در اطراف اتم کلر (شماره آمینواسیدها با ۱۵ آمینواسید پتید نشانه محاسبه گردیده است)



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



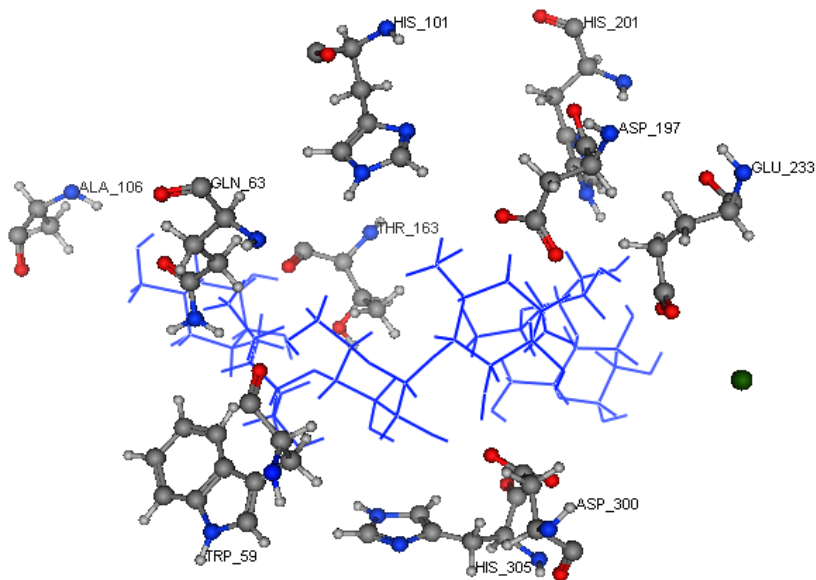
شکل ۶ (الف) - باقیمانده‌های آمینو اسیدی در اطراف کلسیم ساختار RPA (شماره آمینواسیدها با ۱۵ آمینواسید پتید نشانه محاسبه گردیده است)



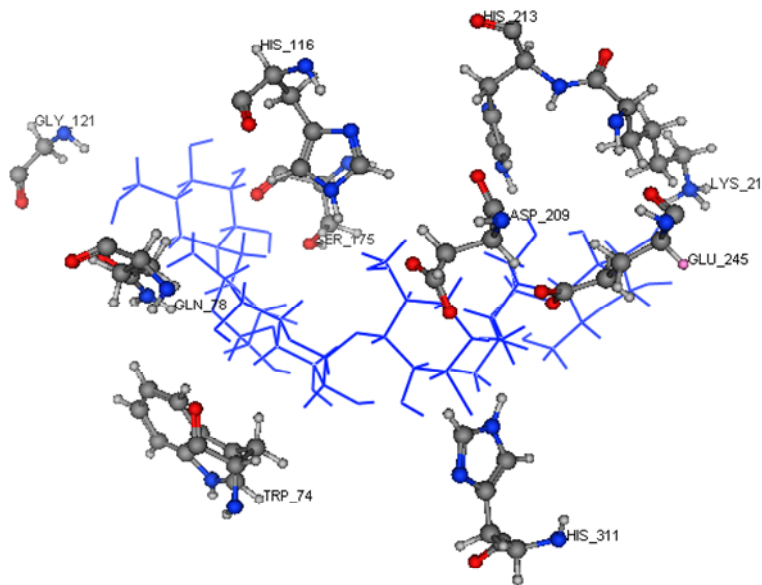
شکل ۶ (ب)- باقیمانده‌های آمینو اسیدی HPA در اطراف کلسیم

می‌دهند مشابه هم هستند. آمینو اسیدهای موجود در HPA عبارتند از: H₃₀₅، H₁₀₁ و H₂₀₁، D₃₀₀، E₂₃₃، W₅₉، D₁₉₇، T₁₆₃ و A₁₀₆، Q₆₃، S₁₆₀، E₂₃₀ و W₅₉، D₁₉₄، RPA عبارتند از: K₁₉₇ و H₁₀₁ و H₁₉₈ و H₂₉₆ و Q₆₃ و G₁₀₆

شکل ۷ الف و ۷ ب میان‌کنش بین آمینو اسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم‌های HPA و RPA را با IO₃ نشان می‌دهد. با مقایسه آمینو اسیدهایی که در این دو آنزیم با IO₃ میان‌کنش داده‌اند دیده شده، تعدادی از آمینو اسیدهای موجود در جایگاه فعال دو آنزیم که با IO₃ میان‌کنش



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



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)

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 آمینو 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.

از میان ۱۰ آمینو اسید شرکت کننده در میانکنش با IO_3 ، 4 آمینو اسید در هر دو آنزیم HPA و RPA متفاوت هستند. S₁₆₀ در RPA مشابه T₁₆₃ در HPA است. یک آمینو اسید قطبی، جانشین آمینو اسید قطبی دیگر شده است با این تفاوت که T₁₆₃ زنجیره جانبی حجیم‌تری نسبت به S₁₆₀ دارد. به علاوه G₁₀₆ در RPA جایگزین A₁₀₆ در HPA شده است. در این مورد نیز گلايسين 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

مآخذ

- 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.

- 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 α -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, DiMugno 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 acarviosatins: 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.